



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

Efectos del extracto de Aliáceas y butirato de sodio en la digestibilidad ileal, salud intestinal, productividad y severidad de la infección por *Eimeria* spp en pollo de engorda

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA
GONZALO VILLAR PATIÑO

TUTOR PRINCIPAL:
AURORA HILDA RAMÍREZ PÉREZ, FMVZ-UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
GABRIELA GÓMEZ VERDUZCO, FMVZ-UNAM
GUILLERMO TÉLLEZ ISAÍAS, UNIVERSITY OF ARKANSAS

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, MAYO 2024.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mis hijos por que desde que nacieron le dieron un sentido formidable a mi existencia.

A mi esposita por haber decidido ser mi compañera de vida, y que de manera incondicional me ha ayudado durante todo este proceso de obtención de grado académico.

A mis padres por ser un ejemplo de calidez humana y guiarme en mi formación personal y profesional.

A mis hermanos por compartir nuestra niñez, adolescencia y madurez.

A mi familia por permitirme estar y no estar sin que ello afecte el amor que nos tenemos.

A mi familia política por siempre demostrarme su cariño y permitirme ser un integrante más.

A mis amigos por los momentos de alegría que nos brinda nuestra amistad.

A mis compañeros de trabajo quienes me ayudan a materializar tantas ideas y proyectos.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por darme la oportunidad de superarme y aspirar a ser un mejor profesionalista. Es un honor haberme formado profesionalmente en esta grandiosa casa de estudios.

A mi tutora por creer en mí, por guiarme y corregirme para lograr los objetivos del presente trabajo.

A mi comité tutorial por acompañarme 4 años en este proyecto, recomendando, corrigiendo, sugiriendo, aportando valor con cada una de sus observaciones.

Al jurado de candidatura que dedico tiempo a mi evaluación y que realizó importantes observaciones al trabajo.

A Grupo Nutec por el completo financiamiento y permisos para la ejecución de estos estudios, además de darme la oportunidad de poderlo compaginar con mi trabajo día a día.

A SANUREN (Specialized Animal Nutrition Research Network) y el personal que ahí labora por la ayuda en la ejecución de los procedimientos de experimentación.

A los investigadores del Laboratorio de Biología Molecular de NUTEC, por su colaboración en el diseño del estudio, la ejecución y control que se tuvo en la implementación de este, pero sobre todo en la ejecución de pasos críticos como la constatación de la calidad del inóculo, la medición de los activos fitoquímicos y el control de la funcionalidad de estos en los animales.

A la documentalista de Grupo Nutec quien ayudó en la búsqueda de información actualizada y relacionada a cada tema.

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Eimeriosis	3
2.2. <i>Eimeria</i> spp.	4
2.2.1. Ciclo de vida de la <i>Eimeria</i> .	4
2.2.2. Inmunidad	9
○ Inmunidad innata	9
○ Inmunidad adaptativa	9
○ Inmunidad celular	10
○ Inmunidad humoral	10
2.3. Prevención y control de Eimeriosis	11
2.3.1. Vacunas	11
2.3.2. Anticoccidianos	11
2.3.3. Ionóforos y resistencia	12
2.4. Regulación de aditivos en la alimentación de animales de producción	13
2.5. Nuevos anticoccidianos	14
2.5.1. Fitoquímicos	14
2.5.2. El género <i>Allium</i> .	16
2.5.3. Compuestos órgano-sulfurados (COS) del <i>Allium</i> spp.	19
2.5.4. Tiosulfonatos	20
2.5.5. <i>Allium sativum</i> e infección por <i>Eimeria</i> spp.	21
2.5.6. Ácido butírico, butirato y butirato de sodio	23
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVO GENERAL	27
5.1. Objetivos específicos	27
6. EXPERIMENTOS	29

	Página
6.1. Experimento 1 <i>Efecto del propilpropano tiosulfonato encapsulado en la digestibilidad ileal aparente y el comportamiento productivo en pollos de engorda</i>	29
6.2. Experimento 2 <i>Efecto del extracto encapsulado de Aliáceas en el desempeño productivo, salud y microbiota intestinales en pollos de engorda desafiados con Eimeria spp.</i>	41
6.3. Experimento 3 <i>Efecto de un extracto encapsulado de Aliáceas y de butirato de sodio en el desempeño productivo, salud intestinal y pigmentación de pollos infectados con Eimeria spp. En preparación....</i>	61
• Resumen	62
• Abstract	63
• Introducción	64
• Material y métodos	66
○ Norma ética	66
○ Animales y diseño experimental	66
○ Desafío con <i>Eimeria</i> spp.	67
○ Extracto encapsulado de Aliáceas y dietas	67
○ Rendimiento productivo	69
○ Cuantificación de ooquistes y lesiones intestinales	69
○ Índice anticoccidiano (IAC)	70
○ Morfología intestinal	71
○ Xantofilas en plasma sanguíneo	71
○ Pigmentación de piel	72
○ Análisis estadísticos	72
• Resultados	73
○ Rendimiento productivo	73
○ Severidad de la infección	76
▪ Excreción fecal de ooquistes de <i>Eimeria</i> spp.	76

	Página
▪ Lesiones intestinales	77
▪ Índice anticoccidiano	80
○ Morfología intestinal	82
○ Xantofilas en plasma sanguíneo	87
○ Amarillamiento de la piel de pollo vivo y canal fría	89
• Discusión	92
• Conclusiones	96
• Referencias	97
7. SINOPSIS	103
8. DISCUSIÓN GENERAL	104
9. CONCLUSIONES GENERALES	113
10.REFERENCIAS	114
11.ANEXOS	127
• PCR y secuenciación Sanger del inóculo de <i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> y <i>E. tenella</i> , facultad de Química de la UAQ.	127
• Titulación, diferenciación y nivel de esporulación del inóculo analizado en la FMVZ de la UNAM.	128

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Región intestinal afectada, grados de severidad de las lesiones en la escala de Jonhson y Reid para <i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> y <i>E. tenella</i> .	8
Cuadro 2. Mecanismo de acción de anticoccidianos utilizados en aves.	12
Cuadro 3. Composición nutrimental y contenido energético de dientes de <i>Allium sativum</i> fresco	18
Cuadro 4. Efectos del uso del propilpropano tiosulfinato (PTS) y del propilpropano tiosulfonato (PTSO) en la eimeriosis experimental en pollos de engorda	23
Experimento 3 cuadro 1. Ingredientes y composición química calculada (g/kg) y energía metabolizable (EM, Mcal/kg) de las dietas basales.	68
Experimento 3 cuadro 2. Peso vivo inicial (PVI, g), ganancia diaria de peso (GDP, g), consumo diario de alimento (CDA, g) y conversión alimenticia (CA, g/g) de pollos de engorda Ross 308, no desafiados (NC) o desafiados (C) con <i>Eimeria</i> spp, alimentados con una dieta maíz-soya suplementada con extracto encapsulado de Aliáceas (Ae; 0, 250, 500; g/t de alimento), butirato de sodio (B, 1000 g/t de alimento), o salinomicina (Ion, 60 g/t de alimento).	75
Experimento 3 cuadro 3. Medianas y rangos (Q25 – Q75) de ooquistes por gramo de heces (OPG) en pollos de engorda Ross 308, no desafiados (NC) o desafiados (C) con <i>Eimeria</i> spp, alimentados con una dieta maíz-soya suplementada con extracto encapsulado de Aliáceas (Ae; 0, 250, 500; g/t de alimento), butirato de sodio (B; 1000 g/t de alimento), o salinomicina (Ion, 60 g/t de alimento).	78
Experimento 3 cuadro 4. Medianas y rangos (Q25 – Q75) del puntaje de las lesiones en diferentes segmentos del intestino y totales (TMLs) en pollos de engorda Ross 308, no desafiados (NC) o desafiados (C) con <i>Eimeria</i> spp, alimentados con una dieta maíz-soya suplementada con	79

extracto encapsulado de Aliáceas (Ae; 0, 250, 500; g/t de alimento), butirato de sodio (B; 1000 g/t de alimento), o salinomicina (Ion; 60 g/t de alimento)

	Página
Experimento 3 cuadro 5. Peso vivo relativo (rPV), tasa de sobrevivencia (TS), total de lesiones intestinales (TLSM), valor de ooquistes por gramo de heces (OPG) e índice anticoccidiano (IAC), de pollos de engorda Ross 308, de 21 días edad, no desafiados (NC) o desafiados (C) con <i>Eimeria</i> spp, alimentados con una dieta maíz-soya suplementada con extracto encapsulado de Aliáceas (Ae; 0, 250, 500; g/t de alimento), butirato de sodio (B, 1000 g/t de alimento), o salinomicina (Ion, 60 g/t de alimento)	81
Experimento 3 cuadro 6. Longitud de vellosidades (V; um), profundidad de criptas (C; um), y relación V/C en pollos de engorda Ross 308, no desafiados (NC) o desafiados (C) con <i>Eimeria</i> spp, alimentados con una dieta maíz-soya suplementada con extracto encapsulado de Aliáceas (Ae; 0, 250, 500; g/t de alimento), butirato de sodio (B; 1000 g/t de alimento), o salinomicina (Ion; 60 g/t de alimento)	85
Experimento 3 cuadro 7. Correlaciones ρ de Spearman de ganancia de peso (GDP), conversión alimenticia (CA), ooquistes por gramo de heces (OPG), total de lesiones intestinales (TLSM), longitud de vellosidades (V), y profundidad de criptas intestinales (C) de duodeno (D) y yeyuno (Y), relación V/C, a diferentes días (21, 28, 35) de edad de pollos de engorda Ross 308, sin o con desafío con <i>Eimeria</i> spp alimentados con una dieta maíz-soya y suplementada con extracto encapsulado de Aliáceas y/o butirato de sodio, o salinomicina	86
Experimento 3 cuadro 8. Concentración plasmática de xantofilas (ug/ml) en pollos de engorda Ross 308, no desafiados (NC) o desafiados (C) con <i>Eimeria</i> spp, alimentados con una dieta maíz-soya suplementada con extracto encapsulado de Aliáceas (Ae; 0, 250, 500; g/t de alimento), butirato de sodio (B; 1000 g/t de alimento), o salinomicina (Ion; 60 g/t de alimento)	88

Experimento 3 cuadro 9. Amarillamiento y diferencial de amarillamiento (Δb^*) cutáneo en vivo a diferentes días (d) y en la canal fría (CF) de pollos de engorda Ross 308, no desafiados (NC) o desafiados (C) con *Eimeria* spp, alimentados con una dieta maíz-soya suplementada con extracto encapsulado de Alíáceas (Ae; 0, 250, 500; g/t de alimento), butirato de sodio (B; 1000 g/t de alimento), o salinomicina (Ion; 60 g/t de alimento)

Página

91

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Fases de <i>Eimeria</i> spp	5
Figura 2. Formación de compuestos azufrados a partir de la hidrólisis por la alinasa de L-cisteína sulfóxidos.	20
Figura 3. Formación de propilpropano tiosulfinato (PTS) y propilpropano tiosulfonato (PTSO) y sulfuros.	21

Abreviaturas y siglas usadas

PTSO	Propil propano tiosulfonato
PTS	Propilpropano tiosulfinato
B	Butirato de sodio
Ba	Ácido butírico
GDP	Ganancia diaria de peso
CDA	Consumo diario de alimento
CA	Conversión alimenticia
PAMPs	Patrones moleculares conservados asociados a patógenos
NK	Células asesinas naturales
TLRs	Receptores de reconocimiento tipo Toll
MIF	Factor inhibidor de la migración de macrófagos
L	Linfocitos
IL-1	Interleucina-1
LThCD4+	Linfocitos T cooperadores CD4+
LTcCD8+	Linfocitos T citotóxicos CD8+
FNT	Factor de necrosis tumoral
TGI	Tracto gastrointestinal
PCI	Peso corporal inicial
PC	Peso corporal
LS	Puntuación de Lesión intestinal
TMLS	Promedio acumulado de todas las lesiones intestinales
OPG	Ooquiste por gramo de heces
b*	Amarillamiento
Δb^*	Diferencial ganado en amarillamiento
C	Desafiado
NC	No desafiado
AGCC	Ácido graso de cadena corta
COS	Compuestos órgano sulfurados
p.i.	Postinfección
CF	Canal fría

RESUMEN

Se realizaron tres experimentos en pollos de engorda (Cobb 500, experimentos 1 y 2; Ross 308, experimento 3), con el fin de estudiar el efecto de un extracto encapsulado de Aliáceas (Ae, con 12 % de PTSO como compuesto órgano sulfurado mayoritario) en la digestibilidad de nutrientes en pollos de engorda sanos; además de estudiar en pollos desafiados con *Eimeria acervulina* (1×10^5), *Eimeria maxima* (2×10^4) y *Eimeria tenella* (2×10^4): 1) las variables productivas (ganancia de peso, GDP; consumo de alimento, CDA y conversión de alimento, CA), 2) severidad de la infección (ooquistes por gramo de heces, OPG; puntaje de lesiones intestinales, LS; índice anticoccidiano, IAC y morfología intestinal), 3) microbiota, 4) xantófilas en plasma sanguíneo y 5) pigmentación cutánea. Se usaron diferentes dosis de Ae (0, 250, 500 y 750 g/t de alimento), además de controles experimentales: control no desafiado sin tratamiento (NC0); control desafiado sin tratamiento (C0); control desafiado con ionóforo (Clon). En el experimento 3 se utilizó butirato de sodio en combinación con Ae.

Los resultados mostraron los efectos negativos del desafío con *Eimeria* spp.: aumento de OPG, LS y en abundancia de enteropatógenos; lo que afectó negativamente GDP, CA y pigmentación de los pollos de engorda. En general, los ionóforos y el Ae mejoraron los resultados de las variables estudiadas respecto a C0, mostrando ambos un mejor IAC. También se observó que Ae promovió el crecimiento de *Ruminococcus*, *Firmicutes* e *Intestinimonas* en intestino. En tanto, el butirato y el Ae mostraron efecto positivo en la elongación de vellosidades y relación vellosidad/cripta, lo que podría explicar la mejora en digestibilidad de aminoácidos y energía observada con el uso de Ae. De lo anterior se concluye que: el programa anticoccidiano y el uso de Ae mejoran los resultados en comparación con C0 en pollos bajo desafío de *Eimeria* spp.

Palabras clave: pollos de engorda, coccidiosis, propil propano tiosulfonato (PTSO), anticoccidianos, butirato, microbiota, morfología intestinal, digestibilidad ileal aparente.

ABSTRACT

Three experiments were carried out in broiler chickens (Cobb 500, experiments 1 and 2; Ross 308, experiment 3), in order to study the effect of an encapsulated extract of *Alliaceae* (Ae, with 12% PTSO as the main sulfur compound) on the digestibility of nutrients in healthy broiler chickens; in addition, to study in chickens challenged with *Eimeria acervulina* (1×10^5), *Eimeria maxima* (2×10^4) and *Eimeria tenella* (2×10^4) the effects of Ae on: 1) productive performance (weight gain, GDP; feed intake CDA; and feed efficiency, CA), 2) severity of infection (oocysts per gram of feces, OPG; intestinal lesion score, LS; anticoccidial index, IAC; and intestinal morphology), 3) microbiota, 4) xantophils in blood plasma, and 4) skin pigmentation. Several doses (0, 250, 500 and 750 g/t of feed) of Ae were used, in addition to the follow experimental controls; a control not challenged with *Eimeria* spp. without treatment (NC0); a challenged control without treatment (C0); a control challenged with ionophore addition (Clon). In experiment 3, sodium butyrate was used in combination with Ae.

The results showed the negative effects of the challenge with *Eimeria* spp.: increased OPG, intestinal injury, and the abundance of enteropathogens; these had a negative impact on GDP, CA, and pigmentation of broiler chickens. Compared to C0, ionophores and Ae had better results in the variables studied, both with higher IAC. It was also observed that Ae promoted the growth of *Ruminococcus*, *Firmicutes* and *Intestinimonas*. In the intestine. Meanwhile, butyrate and Ae showed its positive effect on intestinal morphology (villus length and villus/crypt ratio), which could explain the increase in the digestibility of amino acids and energy observed on Ae groups. From the above, it is concluded that: the anticoccidial program and the use of Ae obtained better results compared to C0 in chickens under *Eimeria* spp challenge.

Keywords: broiler chickens, coccidiosis, propyl propane thiosulfonate (PTSO), anticoccidials, butyrate, microbiota, intestinal morphology, apparent ileal digestibility.

1. INTRODUCCIÓN

La avicultura en México representa alrededor del 50 % de la producción ganadera (CONAFAB, 2022); históricamente ha proveído de proteína de alto valor biológico a un menor costo respecto a la proveniente de otras especies pecuarias. La industria avícola está en constante cambio para lograr una mayor eficiencia en la producción. Sin embargo, la alta densidad poblacional de aves que prevalece en las unidades de producción ha representado un riesgo constante para la salud de los animales. Un problema sanitario causado por algún agente infeccioso se propaga rápidamente entre las aves por el elevado número de individuos por unidad de superficie en los alojamientos. Esto puede causar pérdidas económicas dependiendo del alcance patológico del agente.

La coccidiosis o eimeriosis es una parasitosis intestinal altamente contagiosa que menoscaba la economía de la industria avícola, es un problema serio de salud para los sistemas intensivos de países como México, en donde existe una industria importante dedicada a la producción de pollo de engorda para consumo humano (Cuellar-Saenz, 2022). Las especies de *Eimeria* que afectan más al pollo de engorda son: *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* y *Eimeria tenella*; en la mayoría de los brotes de la enfermedad se presenta una elevada morbilidad; pero, baja mortalidad. El costo actual de la prevención y del control de la coccidiosis (fármacos o vacunas) es elevado (Blake y col, 2020a). Un efecto importante de esta enfermedad es que tanto el consumo de alimento como la conversión alimenticia del ave se incrementan. Es decir, se requiere mayor cantidad de alimento para alcanzar el peso vivo necesario para el abasto. Durante mucho tiempo se ha convivido con la eimeriosis; aunque hay vacunas, el uso de fármacos anticoccidianos ha sido la estrategia más utilizada para prevenir y/o controlar la enfermedad. Sin embargo, estas sustancias han generado resistencia, por lo que se buscan alternativas inocuas para prevenir y/o controlar la enfermedad, para que la industria siga produciendo volúmenes importantes de proteína animal de alto valor biológico para el consumo humano. La investigación al respecto ha permitido

encontrar plantas y sus derivados que pudieran sustituir a los tratamientos convencionales. Los bulbos de *Allium sativum* (ajo) se han utilizado desde 2700 a. C. como agentes terapéuticos (Petrovska y Cekovska, 2010). En la actualidad se han identificado numerosos fitoquímicos contenidos en el género *Allium* o bien derivados del mismo; entre ellos están los compuestos azufrados como el propilpropano tiosulfonato (PTSO) al cual se le ha identificado un efecto anticoccidiano entre otras numerosas propiedades. Por otra parte, el uso de butirato de sodio ($C_4H_7NaO_2$) en pollos de engorda se utiliza como un aditivo que promueve la salud intestinal, con la finalidad de mejorar el desempeño productivo.

Así, este trabajo de investigación fue planeado para evaluar el efecto dietario de un extracto encapsulado de aliáceas (Ae) valorado por su contenido de PTSO en la digestibilidad de nutrientes en el pollo de engorda. También, para evaluar en pollos de engorda infectados con *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella*, el efecto de la inclusión dietaria de diferentes dosis del extracto mencionado sólo o juntamente con butirato de sodio (B) en la severidad de la infección (ooquistes por gramo de heces (OPG), lesiones intestinales (LS), índice anticoccidiano (IAC) y afectación en la morfología intestinal), microbiota intestinal, rendimiento productivo, xantofilas en sangre y pigmentación de la piel. Se supuso que en función de las dosis usadas del Ae mejoraría la digestibilidad de nutrientes. Además, las dosis de Ae sólo o en combinación con B podrían reducir el grado de severidad de la infección por las especies de *Eimeria* utilizadas para la infección experimental, preservar la salud y la microbiota intestinales; así como mejorar el rendimiento productivo y mantener la pigmentación del ave de forma no diferente a grupos manejados bajo un tratamiento convencional con anticoccidianos (Clon); pero, mejor con respecto a un grupo control no infectado con *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella*, sin tratamiento alguno (C0). Sin embargo, se requiere mayor investigación sobre el efecto del Ae en la respuesta inmune del ave, precisar su mecanismo de acción, las dosis y periodos más adecuados de uso, la posible interacción con los nutrimentos y otros aditivos (fitobióticos y/o acidificantes), y con programas de vacunación.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Eimeriosis

La eimeriosis o coccidiosis es una enfermedad parasitaria que ha acompañado desde siempre a la crianza de aves. En 1981 los franceses Raillet y Lucet identifican a un agente causal de la coccidiosis ya que observaron ooquistes en el ciego de gallinas, llamando al parásito *Coccidium tenellum*, el cual a partir de 1913 fue llamado *Eimeria tenella* (Chapman, 2014). En 1929 se reportaron las especies *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. mitis* (Tyzzer, 1929), mientras que *E. necatrix* y *E. praecox* se reportaron en 1932 por Tyzzer y col. En 1942, Levine identificó a *E. brunetti* (González-Robles, 2021). Recientemente, se han reportado tres nuevos genotipos de *Eimeria* que afectan a las aves; los nombres sugeridos para estas especies son: *E. lata*, *E. nagambie* y *E. zaria* que ya están presentes a nivel mundial (Blake y col., 2021). Así, desde hace siglos, la eimeriosis ha menoscabado la rentabilidad de la producción avícola tanto a nivel nacional como global. Blake y col. (2020a) estiman las pérdidas anuales por coccidiosis aviar en 10,362 millones de libras esterlinas \pm 25.6% (220,500 millones de MXN; 21.28 MXN tipo de cambio); la mortalidad, la afectación en las variables productivas (ganancia de peso, eficiencia alimenticia), los gastos para la prevención y/o control de la enfermedad, así como la posible asociación con otras enfermedades como la enteritis necrótica, explican las enormes pérdidas económicas.

2.2. *Eimeria* spp.

Las coccidias son específicas del hospedero animal; las especies de *Eimeria* más estudiadas causantes de coccidiosis en el pollo de engorda son *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella* (Chapman, 2014; Elkhtam y col., 2014). Taxonómicamente las coccidias están clasificadas (Blake y col., 2020b) de la siguiente forma:

Reino	<i>Protozoa</i>
Phylum	<i>Apicomplexa</i>
Clase	<i>Sporozoa</i>
Orden	<i>Eucoccia</i>
Suborden	<i>Eimerionina</i>
Familia	<i>Eimeriidae</i>
Género	<i>Eimeria</i>

Estos protozoarios dañan al epitelio intestinal porque se multiplican intracelularmente, afectando más a las aves jóvenes ya que su sistema inmune es inmaduro, en tanto, las aves adultas pueden persistir como portadores asintomáticos (Gazoni, 2020). La entrada de los ooquistes esporulados de *Eimeria* spp. es por vía oral, las aves infectadas pueden desarrollar un cuadro subclínico o clínico, que suele ir acompañado de daños a la mucosa intestinal, lo que provoca alteraciones en la digestibilidad y en la absorción de nutrimentos. Dichas alteraciones afectarán negativamente las variables productivas, el crecimiento y el desarrollo (Williams, 2005; Hafez, 2008), así como la pigmentación del ave.

2.2.1. Ciclo de vida de la *Eimeria*.

La duración del ciclo de vida de este parásito (figura 1) es de 5 a 7 días dependiendo de la especie. Dentro de la caseta de las aves existen factores que favorecen su ciclo de vida, entre ellos: el incremento de la humedad relativa (alrededor del 75%), una pobre ventilación, el aumento en la temperatura que puede ir de 21 a 32°C.

Todas estas condiciones favorecen que los ooquistes eliminados a través de las heces del ave esporulen, y con ello adquieran su capacidad de infectar para comenzar el desarrollo de un ciclo de vida complejo, que comprende fases extra- e intracelulares; de reproducción asexual y sexual.

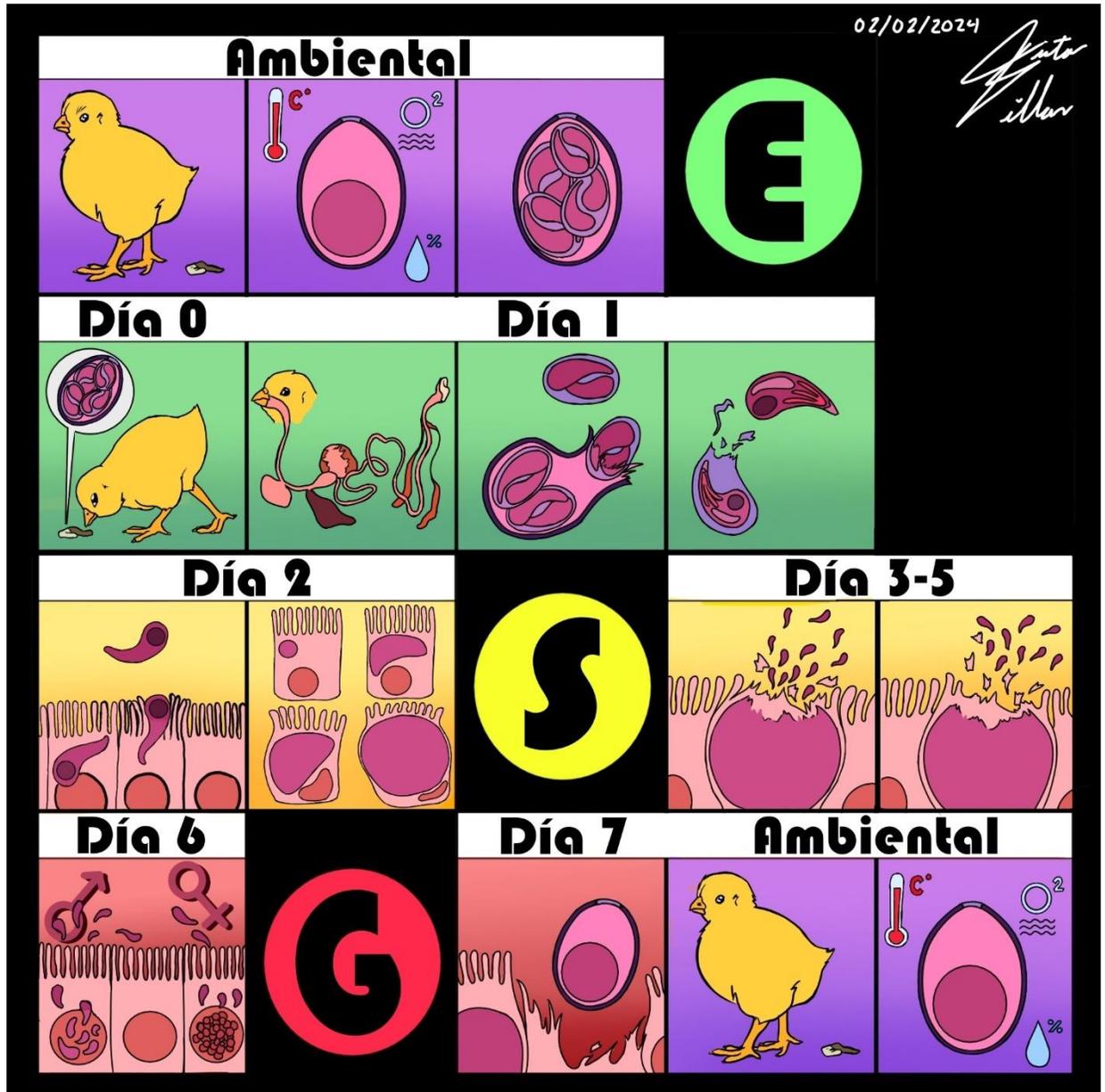


Figura 1 Fases de *Eimeria* spp. **E**, esporogonia, esporulación por condiciones de temperatura y humedad ambientales. **S**, esquizogonia, reproducción asexual. **G**, gametogonia, reproducción sexual (elaborado por Villar-Pérez VH, 2024).

El ooquiste que esporuló (infeccioso) contiene cuatro esporocistos con dos esporozoitos cada uno (8 esporozoitos en cada ooquiste). **Día 0-1**, los ooquistes esporulados son ingeridos por el ave, reciben la acción químico-biológica de las secreciones gástricas del proventrículo y mecánica de la musculatura del ventrículo, lo que favorece la liberación de los ocho esporozoitos, mismos que se adhieren a las células epiteliales del intestino. **Día 2-3**, en el intestino por acción del complejo apical de los esporozoitos, estos ingresan a las células para continuar su desarrollo a trofozoítos. Los trofozoítos se dividen rápidamente de manera asexual formando esquizontes de primera generación que contienen grandes cantidades de merozoitos resultantes de la división del trofozoíto. **Día 3-5**, los merozoítos maduran y salen de las células, para reinfectar otras células; así, de manera sucesiva se forma la segunda y tercera generación de esquizontes y merozoitos. Durante la salida de la célula intestinal de los merozoitos ocurre el mayor daño a la integridad de la mucosa intestinal, por lo que la digestión y absorción de nutrimentos se afectan considerablemente, y en consecuencia, la productividad del ave. **Día 6**, posteriormente, los merozoitos de segunda o tercera generación abandonan los enterocitos, transformándose en microgametocitos y macrogametocitos, o células masculinas y femeninas, respectivamente. Con lo que inicia la fase de reproducción sexual que concluye en la generación de ooquistes no esporulados, los cuales son eliminados a través de las heces de las aves, **Día 7**, contaminando la cama. Bajo los factores ambientales ya mencionados, los ooquistes esporularán adquiriendo su capacidad de infectar (López-Osorio y col., 2020). De acuerdo con Gazoni (2020) *“Todas las fases celulares del ciclo del coccidio ocasionan la destrucción de la célula intestinal, resultando en 2048 células destruidas por cada ooquiste ingerido.”*

El tipo de lesiones y su distribución en el intestino dependen de la(s) especie(s) de *Eimeria* spp. involucradas en la infección de las aves. En este trabajo se utilizaron *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella* para la infección experimental.

E. acervulina causa enteritis catarral, con presencia de estrías transversales y/o parches ovalados o alargados, ambos de color blanquecino. La excreción máxima por ave es de 432 000 000 de ooquistes; bajo las condiciones ideales climáticas la esporulación del 50 % de ellos se alcanza en 11 h aproximadamente (Gazoni, 2020).

E. maxima provoca dilatación y adelgazamiento de la pared intestinal, hemorragias petequiales, genera exudado viscoso de color rosado a rojizo. Las aves excretan un máximo de 36 000 000 de ooquistes; mientras que el 50 % de esporulación se presenta posterior a 38 h en condiciones de temperatura y humedad adecuadas (Gazoni, 2020).

E. tenella causa tiflitis hemorrágica, engrosamiento de la pared intestinal. La excreción máxima de ooquistes por ave es de 65 000 000 de ooquistes; la mitad de ellos esporulará en 21 h si el ambiente es propicio para el protozooario (Gazoni, 2020).

La severidad de las lesiones se puede valorar de acuerdo con escalas como la de Johnson y Reid (1970). El cuadro 1 presenta los sitios intestinales que son afectados por las especies de *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella*, así como los grados de severidad de las lesiones de acuerdo con Johnson y Reid. La respuesta inmune del ave se desarrollará en relación con el ciclo de vida del parásito, presentándose de manera importante en la reinfestación del ave (Swinkees *col*, 2007).

Cuadro 1. Región intestinal afectada, grados de severidad de las lesiones en la escala de Jonhson y Reid para *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella* (Gazoni, 2020).

Especie de <i>Eimeria</i>	Sitio intestinal afectado	Grado de lesiones				
		0	1	2	3	4
<i>E. acervulina</i>	Intestino anterior (duodeno y yeyuno), criptas de la mucosa	Sin lesiones macroscópicas, ni presencia microscópica de formas parasitarias	Parches alargados (50 × 20 mm), blanquecinos	Numerosos parches alargados, aglutinados, blanquecinos	Numerosos parches alargados, aglutinados, blanquecinos, mucosa engrosada, contenido intestinal viscoso	Mucosa grisácea con colonias compactas, muy engrosada, contenido intestinal de aspecto cremoso
<i>E. maxima</i>	Intestino medio, subepitelial y criptas	Sin lesiones macroscópicas, ni presencia microscópica de formas parasitarias	Petequias	Petequias abundantes, mucosa engrosada, contenido intestinal mucoso color naranja	Lesiones sanguinolentas, aglutinadas, mucosa engrosada, contenido intestinal sanguinolento	Lesiones sanguinolentas, coágulos sanguíneos
<i>E. tenella</i>	Ciegos, subepitelial y criptas	Sin lesiones macroscópicas, ni presencia microscópica de formas parasitarias	Petequias escasas	Petequias aglutinadas, con presencia de sangre	Grandes lesiones sanguinolentas, mucosa engrosada, coágulos de fibrina.	Grandes lesiones sanguinolentas, mucosa engrosada, coágulos sanguíneos, sin contenido fecal

2.2.2 Inmunidad. La respuesta inmune del hospedador es específica contra la especie de *Eimeria* que parasita al ave; en la mayoría de los casos se requiere un número importante de ooquistes esporulados (infectantes) para que se genere la respuesta inmune apropiada (Yun y col., 2000). Como ya se describió, el ciclo de vida de la *Eimeria* spp. es complejo, con etapas extra- e intracelulares, con reproducción asexual y sexual, por ello, la respuesta inmune debe ser vasta para combatir las diferentes etapas parasitarias. Así, la respuesta inmune del ave es innata y adaptativa, humoral y celular. Aunque, el papel de la respuesta humoral no está dilucidada del todo (Yuño y Gogorza, 2008).

Inmunidad innata es la primera línea de defensa del ave, se activa cuando receptores de reconocimiento (PRRs, como los Toll (TLRs)) identifican patrones moleculares conservados asociados a patógenos (PAMPs) (Kumar y col., 2011). La profilina es un ligando TLR que expresa el ave en todas las etapas de desarrollo del ciclo de vida de la *Eimeria* spp. (Fetterer y col., 2004); los ligandos inducen una respuesta innata robusta como la proliferación de células inmunitarias (heterófilos, macrófagos, células asesinas naturales (NK), células dendríticas, linfocitos intraepiteliales y de la lámina propia (Lillehoj y Dalloul, 2004). La citocina proinflamatoria conocida como factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) tiene un papel fundamental en la mediación de la inmunidad innata en la coccidiosis (Kim y col., 2019).

Inmunidad adaptativa es específica al antígeno evitando la colonización y el crecimiento del patógeno dentro del hospedero, está representada por los linfocitos (L) que son los leucocitos predominantes (80 %) en el intestino (Yuño y Gogorza, 2008). Existen dos tipos principales de linfocitos: los B (productores de anticuerpos) y los T (LThCD4+, cooperadores, localizados en la lámina propia; LTcCD8+, citotóxicos, presentes en el epitelio y en la lámina propia). Los LT del tejido linfoide asociado a mucosas son los principales participantes de la respuesta inmune adaptativa anticoccidia de las aves (Lillehoj, 1998).

Inmunidad celular se caracteriza por la activación de varias células inmunes como las T, macrófagos y células *natural killers* (NK). Los LTcCD8+ intraepiteliales incrementan su número ante la infección por coccidias. Los esporozoitos vivos ingresan a los LTcCD8+, un número importante de ellos han sido observados cercanos a estos linfocitos y a macrófagos a las 24 h post primoinfección con *E. acervulina*; mientras que, a las 48 h las células LTcCD8+ son escasas. Sin embargo, 48 h después de una infección secundaria el número de LTcCD8+ es elevado, estando en contacto con las células infectadas (Yuño y Gogorza, 2008). Se considera que el aumento de las células LTcCD8+ indica la mejora de la respuesta inmune adquirida (Lillehoj, 1994). Bajo condiciones *In vitro*, tanto los esporozoitos como los merozoitos de *E. tenella* promueven que los macrófagos que llegan al intestino formen un factor parecido al factor de necrosis tumoral (FNT). Además, sintetizan interleucina-1 (IL-1), FNT- α y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (CSF-GM), lo que se ha observado por infección con *E. tenella* o *E. maxima*. Ante la eimeriosis, las aves producen interferón gamma (IFN γ) cuya función no está dilucidada (Yuño y Gogorza, 2008). Con infecciones primarias o secundarias se observa un gran número de esporozoitos cerca de los macrófagos. El número y la actividad de las células NK, tanto del bazo como intraepiteliales incrementa en presencia de eimeriosis, lo que concurre con la eliminación de los parásitos (Yuño y Gogorza, 2008).

Inmunidad humoral. En el suero y en las secreciones intestinales se han identificado anticuerpos anticoccidia (Girard *col.*, 1997). Sin embargo, los estudios de agotamiento de linfocitos B (Lillehoj, 1987) indican que los anticuerpos pueden no desempeñar un papel específico en la inmunidad contra este parásito. Entre la segunda y tercer semana post-primoinfección, las aves producen inmunoglobulinas (Ig): IgM (bilis), IgA, IgG (lumen intestinal) específicas contra *Eimeria* spp., cuando las aves se reinfectan las concentraciones de Ig son menores. (Yuño y Gogorza, 2008).

Yuño y Gogorza (2008) mencionan que los anticuerpos pueden actuar en los estadios extracelulares (junto con las células inmunitarias: fagocíticas o citotóxicas) o en los intracelulares debido a la permeabilidad incrementada de la membrana de las células intestinales, causada por la infección parasitaria. Los mismos autores señalan que bajo condiciones *in vitro* los anticuerpos contra *E. tenella* atraviesan las membranas de la célula intestinal y alcanzan al parásito.

2.3 Prevención y control de la Eimeriosis

Las prácticas convencionales tanto para la prevención como para el control de la coccidiosis se basan en las buenas prácticas de higiene de la caseta, así como el uso de anticoccidianos (ionóforos o sintéticos) administrados a través del alimento, y en los últimos años la vacunación (Dalloul y Lillehoj, 2006).

2.3.1 Vacunas. Las vacunas comerciales existentes están constituidas con base en ooquistes vivos atenuados ya sea por precocidad o por su cultivo en embrión de pollo, aunque también existen las vacunas no atenuadas (Mora-Gonzales, 2022). La primera vacuna fue no atenuada y se aplicó en 1952, en Estados Unidos. En la década de los 70's se atenuó por precocidad una cepa de *E. tenella* (González-Robles, 2021), con lo que se abrió la posibilidad de elaborar este tipo de vacunas. Bajo ciertas condiciones, las vacunas no inducen la inmunidad deseada, por lo que los programas de vacunación deben basarse en una metodología rigurosa para que sean efectivos y no causen efectos negativos en la mucosa intestinal, lo que provocaría retraso en el crecimiento y mayor susceptibilidad a un brote (Wu *col.*, 2004; Garcia *col.*, 2008; Peek y Landman, 2011).

2.3.2 Anticoccidianos. Estos fármacos son más tóxicos para las células parasitarias que para las del hospedero, afectan procesos vitales de la *Eimeria* spp., se utilizan en la prevención (profilácticos) y/o control (terapéuticos) de la coccidiosis. Los anticoccidianos idóneos debieran contar con las siguientes características:

amplio espectro, amplio margen de seguridad, facilidad y seguridad en su uso, compatibilidad con otras drogas, no alterar el producto final (carne y huevo), además, de un consumo seguro, estabilidad en el medio ambiente, mínimo tiempo de retiro, rentabilidad, no generar resistencia (Edgar, 1970; Gómez-Osorio, 2021). Existen dos tipos de anticoccidianos: sintéticos (químicos) e ionóforos. Los primeros afectan el metabolismo de la *Eimeria*, mientras que los ionóforos alteran el equilibrio osmótico (Tewari y Maharana, 2011). El cuadro 2 presenta el mecanismo de acción de los anticoccidianos utilizados en las aves.

Cuadro 2. Mecanismo de acción de anticoccidianos utilizados en aves (A partir de Gómez-Osorio, 2021)

Anticoccidiano	Mecanismo de acción en la <i>Eimeria</i>
Sintéticos	
Decoquinato, Clopidol	Inhiben la respiración mitocondrial
Sulfonamidas	Inhiben la síntesis del ácido fólico
Amprolio	Inhibición competitiva de la tiamina
Nicarbazina, Diclazuril, Halofuginona, Robenidina	Desconocido
Ionóforos	
Monensina, Salinomycin, Narasina	Forman complejos liposolubles con sodio (Na ⁺) y potasio (K ⁺). Causan ruptura de la membrana parasitaria
Maduramicina, Semduracina	Alteran el metabolismo de sodio (Na ⁺) y potasio (K ⁺) principalmente
Lasalocida	Forman complejos liposolubles con sodio (Na ⁺), potasio (K ⁺), calcio (Ca ²⁺), magnesio (Mg ²⁺). Causan ruptura de la membrana parasitaria

2.3.3. Ionóforos y resistencia. Desde 1970, los ionóforos han sido ampliamente utilizados en la prevención y/o control de la coccidiosis (Chapman, 2014); el mecanismo de acción de estos antibióticos poliéter es básicamente el de inhibir aspectos metabólicos del parásito (cuadro 2). Estos fármacos modifican la presión osmótica del parásito al facilitar la entrada de iones a través de su membrana celular, alterando el gradiente osmótico, destruyendo los esporozoitos y los

merozoitos. Algunos ionóforos transportan cationes monovalentes (Na^+ , K^+ ; monensina, salinomocina, narasina, maduramicina, semduracina), otros pueden transportar cationes bivalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} ; lasalocida) (Gómez-Osorio, 2021). La principal ventaja del uso de ionóforos sobre los anticoccidianos sintéticos (químicos) es el desarrollo de la inmunidad en el huésped después de la primera exposición. Esto se debe a que los ionóforos no suprimen completamente el desarrollo del parásito (Chapman y col., 2013), debido a la resistencia demostrada (Jeffers, 1974; Chapman, 1989; Abbas y col., 2011) a los ionóforos más utilizados (lasalocida, monensina, narasina, salinomocina). Se menciona que *“El uso de un coccidiostato químico seguido por un ionóforo parece ser el tipo de programa que controla mejor la coccidiosis”* (Martínez, 2015). La resistencia a los anticoccidianos ha incentivado la búsqueda de alternativas para reducir los brotes de la enfermedad en las parvadas de pollos (Dalloul y Lillehoj, 2006).

2.4 Regulación de aditivos en la alimentación de animales de producción

En las últimas décadas, la regulación en la producción animal destinada al consumo humano se ha modificado para garantizar la salud del consumidor y el bienestar animal, considerando que la salud es parte del bienestar. En este sentido, a partir del año 2002 se prohibió en el uso de anticoccidianos como aditivos alimenticios; entre ellos se encuentran el amprolio, amprolio + etopabato, metil clopidol, metil clopidol + metil benzocuat, dimetridazol, nicarbazina (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2001). En 2006, también se prohibió en la Unión Europea el uso de antibióticos como promotores de crecimiento en las especies de interés pecuario (Castanon, 2007) incluidas las aves. En la última década, los Estados Unidos de Norte América se sumaron a estas regulaciones; en cuanto al contexto nacional, México se perfila para seguir estos cambios en la regulación sanitaria que permita ofrecer productos cárnicos competitivos tanto nacional como internacionalmente. Los cambios en la forma de producir alimento de origen animal

para consumo humano van de la mano con la necesidad de generar nuevos aditivos que optimicen el desempeño productivo de los animales. Por otro lado, el interés de los consumidores en adquirir productos de origen animal inocuos y con alto valor biológico, apoya la necesidad de buscar alternativas naturales que aseguren su producción.

2.5 Nuevos anticoccidianos

En la actualidad, se buscan productos alternativos a los anticoccidianos y a los promotores de crecimiento que tengan los mismos o mejores efectos sobre la salud y el comportamiento productivo de las aves. Por ello, desde hace más de una década diversos equipos de investigación han estudiado el efecto de diferentes aditivos como: probióticos, prebióticos, simbióticos, ácidos orgánicos, minerales arcillosos, anticuerpos de yema de huevo, enzimas exógenas y recombinantes, nucleótidos, ácidos grasos poliinsaturados, y recientemente fitoquímicos (aceites esenciales, polvos, o extractos) sobre la salud y el comportamiento productivo de los animales (Pirgozliev y *col.*, 2019).

2.5.1. Fitoquímicos. Son metabolitos secundarios no nutricionales sintetizados por las plantas, en respuesta a diferentes tipos de estímulos como lo son infecciones, depredadores, radiación ultravioleta, estrés hídrico o salino (Wink, 2004). Se clasifican en cinco grupos: 1) terpenoides (carotenoides y esteroides), 2) compuestos fenólicos (flavonoides como los fitoestrógenos o la quercetina, y no flavonoides), 3) fitoesteroides, 4) alcaloides y 5) los compuestos tiólicos (Somani y *col.*, 2015). Los fitoquímicos difieren en vegetal de origen, etapa de crecimiento de la planta, parte del vegetal donde están presentes, estructura química y actividad biológica; los métodos de extracción y las condiciones de almacenamiento también los hacen diferir (Dhami y Mishra, 2015). La actividad biológica de los fitoquímicos

depende de su estructura química (Hashemi y Davoodi, 2010); pero, sus mecanismos de acción no están completamente esclarecidos. Existe una gran cantidad de plantas que sintetizan fitoquímicos; el ajo (*Allium sativum*), alcachofa (*Cynara scolymus*), canela (*Cinnamomun verum*), cebolla (*Allium cepa*), chile (*Capsicum spp.*), clavo (*Syzygium aromaticum*), pimiento (*Capsicum annum*), orégano (*Origanum vulgare*), romero (*Salvia rosmarinus*), uva (*Vitis vinifera*), yuca (*Manihot esculenta*), etc., están entre las más estudiadas (Kleessen *col.*, 2003; Hashemi y Davoodi, 2010; Mathlouthi *col.*, 2012; Bozkurt *col.*, 2013).

Los fitoquímicos son considerados fuentes naturales de aditivos alimentarios y generalmente son reconocidos como seguros (GRAS, acrónimo de la frase en inglés “*Generally Recognized As Safe*”) (Hashemi y *col.*, 2008), se adicionan a los alimentos en forma de polvos, extractos o aceites esenciales (Puvača *col.*, 2013), han llamado la atención ya que se han reportado diferentes efectos sobre la salud y el desempeño productivo de los animales (Hashemi y Davoodi, 2010; Puvača *col.*, 2013). Algunos de los efectos son: capacidad antimicrobiana, antioxidante y reguladores de radicales libres (Wink, 2004; Agbor y *col.*, 2011). También se ha observado que modulan la microbiota intestinal, mejoran la eficiencia alimenticia, así como la digestibilidad de nutrimentos (Amad y *col.*, 2011) y como consecuencia promueven la salud de los animales (Windisch y *col.*, 2008). En los seres humanos se ha demostrado (Barbieri y *col.*, 2017) que los fitoquímicos son efectivos como parte del protocolo de tratamiento de algunas enfermedades; además de tener una larga historia de utilización, antiguamente, como la planta o parte de ella y en la actualidad bajo forma de extractos, aceites esenciales o principios químicos.

En aves, el uso de fitoquímicos como aditivos alimenticios mejora el rendimiento productivo (incremento en el peso vivo, mejor conversión alimenticia) y la salud. Lo que se ha atribuido parcialmente a las propiedades antimicrobianas de algunos metabolitos secundarios, y a la capacidad de modular la multiplicación de poblaciones bacterianas que favorecen la homeostasis intestinal (Hashemi *col.*, 2009). Lo que se debe a la capacidad prebiótica de algunos fitoquímicos, modulando

el crecimiento de microbiota beneficiosa por encima de la patógena (Cencic y Chingwaru, 2010; Laparra y Sanz, 2010). En este sentido, se ha visto que los fitoquímicos reducen poblaciones de *Escherichia coli*, además de incrementar la actividad de enzimas intestinales como la tripsina y amilasa (Jang y col., 2007). También se ha reportado la capacidad antioxidante de algunos fitoquímicos (Pourali y col., 2014), así como la capacidad de promover la respuesta inmune del ave (Chowdhury y col., 2017). Sin embargo, aun cuando los beneficios del uso de fitoquímicos son numerosos, la magnitud de sus efectos está condicionada por la alimentación, estado de salud y medio ambiente donde se crían las aves (Giannenas y col., 2003).

2.5.2. El género *Allium*. Dentro de las plantas productoras de fitoquímicos se encuentran las pertenecientes al género *Allium*, que comprende 1250 especies, algunas de ellas utilizadas en la alimentación humana como: el poro (*A. ampeloprasum* var. *porrum*), el chalote (*A. ascalonicum*), el cebollín (*A. schoenoprasum*) y las más difundidas son la cebolla (*A. cepa*) y el ajo (*A. sativum*); ambas han sido históricamente utilizadas y ampliamente estudiadas (Tsao y Yin, 2001; Luengo, 2007; Hall y col., 2017) por sus efectos en la prevención y el tratamiento de patologías en seres humanos y animales.

Dado que los derivados del ajo (*A. sativum*) son objeto de estudio en esta investigación, se describe la composición química y las propiedades farmacológicas de la especie. El cuadro 3 presenta la composición nutrimental y el aporte energético de 100 g de ajo fresco; los carbohidratos (almidón, sacarosa, glucosa, fructosa; Subramanian y col., 2020) representan el mayor nutrimento aportado (Germosén-Robineau, 2005; Subramanian y col., 2020; USDA, 2019; Botas y col., 2019). En 100 g de ajo fresco hay 1.2 g de aminoácidos; leucina, arginina, ácidos glutámico, aspártico, lisina, histidina, treonina, glutamina, prolina, glicina, cisteína, alanina, valina, metionina, isoleucina, triptófano, y fenilalanina (Batiha y col., 2020), más de

20 ácidos grasos saturados e insaturados, de cadena mediana y larga, (Kovarovič y col., 2019), entre ellos destacan los ácidos palmítico (C16:0), oleico (C18:1⁹), linoleico (C18:2^{9,12}) y linolénico (C18:3^{9,12,15}) (Kovarovič y col., 2019; Subramanian y col., 2020). Sin embargo, su aporte nutrimental en la dieta es reducido debido a que el ajo es utilizado en cantidades mínimas como especie aportadora de sabor y aroma.

Cuadro 3. Composición nutrimental y contenido energético de dientes de *Allium sativum* fresco

Ítem	g / 100 g	Referencia
Humedad (materia seca)	58.6	USDA (2019)
	65.0 (35.0)	Subramanian y col. (2020)
	67.8 (32.2)	Germosén- Robineau (2014)
	55.0 (45.0) – 76.0 (24.0)	Botas y col. (2019)
Proteína	2.0	Subramanian y col. (2020)
	3.5	Germosén- Robineau (2014)
	6.36	USDA (2019)
	5.1 – 8.0	Botas y col. (2019)
Grasa	0.3	Germosén- Robineau (2014)
	0.5	USDA (2019)
	0.47 – 0.76	math y col. (2022)
Fibra	0.7	Germosén- Robineau (2014)
	1.5	Subramanian y col. (2020)
Cenizas	1.0	Germosén- Robineau (2014)
	2.1	USDA (2019)
	1.56 – 3.0	Botas y col. (2019)
Carbohidratos	27.4	Germosén- Robineau (2014)
	28.0	Subramanian y col. (2020)
	33.1	USDA (2019)
	16.0 – 30.0	Botas y col. (2019)
Energía bruta (kcal / 100 g)	117.0	Germosén- Robineau (2014)
	149.0	USDA (2019)
	91.0 – 149.0	Botas y col. (2019)
Factores Atwater generales	143.0	USDA (2019)
Micronutrientos		
Minerales		
	mg / 100 g	
Potasio	373	Germosén- Robineau (2014)
	401	USDA (2019)
Sodio	18	Germosén- Robineau (2014)
	17	USDA (2019)
Calcio	18	Germosén- Robineau (2014)
	181	USDA (2019)
Fósforo	88	Germosén- Robineau (2014)
	153	USDA (2019)
Magnesio	25	USDA (2019)
Hierro	1.5	Germosén- Robineau (2014)
	1.7	USDA (2019)
Zinc	1.16	
Selenio	0.0098	
Vitaminas		
	mg / 100 g	
Tiamina	0.24	Germosén- Robineau (2014)
	0.2	USDA (2019)
Riboflavina	0.05	Germosén- Robineau (2014)
	0.11	USDA (2019)
Niacina	0.4	Germosén- Robineau (2014)
	0.7	USDA (2019)
Ácido ascórbico	10	Germosén- Robineau (2014)
	31.2	USDA (2019)
Vitamina B6	1.24	
Colina	23.2	
Ácido pantoténico	0.596	
Alfa tocoferol	0.08	

A los compuestos bioactivos del ajo se les atribuye sus propiedades farmacológicas contra agentes infecciosos (bacterias, protozoarios, hongos, y virus), especies químicas (oxidantes), agentes físicos (trombos), inflamación, enfermedades como diabetes, obesidad, hipertensión arterial, enfermedad de Alzheimer, y cáncer (Tudu y col., 2022; Okoro y col., 2023). Principalmente los dientes contienen los numerosos compuestos; entre ellos están los fenoles, flavonoides, esteroides, terpenos, saponinas, lectinas, y los más destacables son los compuestos órgano sulfurados (COS) (Ozma y col., 2022).

2.5.3 Compuestos órgano-sulfurados (COS) del *Allium* spp.

Los compuestos órgano-sulfurados (COS) son abundantes en el ajo, contienen azufre unidos al grupo cianato ($\text{O}^- - \text{C} \equiv \text{N} \leftrightarrow \text{O} = \text{C} = \text{N}^-$) o al carbono, ya sea de manera cíclica o no cíclica (Barba y Orlina, 2017). Se menciona la presencia de más de 20 (Okoro y col., 2023) o hasta una cantidad mayor que 33 (Kovarovič y col., 2019) COS en el ajo. Los principales COS pertenecen a uno de dos grupos: los péptidos γ -glutamil y los L-cisteína sulfóxidos (Higdon, 2005).

A partir de azufre, el género *Allium*, sintetiza cisteína que utiliza para la formación de péptidos γ -glutamil (Randle y Lancaster, 2002), siendo los más importantes en el ajo: γ -glutamil-trans-(+)-S-(1-propenil)-cisteína, γ -glutamil-S-alil cisteína y γ -glutamil-S-metil cisteína (Lawson, 1996). A partir de estos péptidos se sintetizarían los L-cisteína sulfóxidos (ACSO), de los que se han identificado cuatro:

- | | | |
|----|---|----------------------|
| 1. | (+)-S-metil-L-cisteína sulfóxido | (MCSO, metiina) |
| 2. | (+)-S-propil-L-cisteína sulfóxido | (PCSO, propiina) |
| 3. | Trans-(+)-S-(1 propenil)-L-cisteína sulfóxido | (1-PECSO, isoaliina) |
| 4. | (+)-S-(2 propenil)-L-cisteína sulfóxido | (2-PECSO; aliina) |

Los ACSO se encuentran en el citosol y son los precursores del sabor y olor particulares del género *Allium*. Cuando se daña el diente de ajo (cortado, picado o

aplastado) o el bulbo, se permite que la alinasa (EC 4.4.1.4) presente en vacuolas entre en contacto con los ACSO (Claudia y *col.*, 2011) formando nuevos compuestos sulfurados (figura 2). Las sustancias volátiles azufradas son las que proporcionan el olor característico de los bulbos del género *Allium* (Boelens y *col.*, 1971).

Los compuestos órgano-sulfurados se categorizan en hidro- y liposolubles (Batiha y *col.*, 2020). En general los primeros corresponden a los compuestos derivados de la cisteína (cisteína, aliina, S-acetil cisteína, S-alil mercapto cisteína) y los solubles en aceites a los derivados de los ACSO (alicina, dialil sulfuro, dialil disulfuro, dialil trisulfuro, dialil tetrasulfuro).

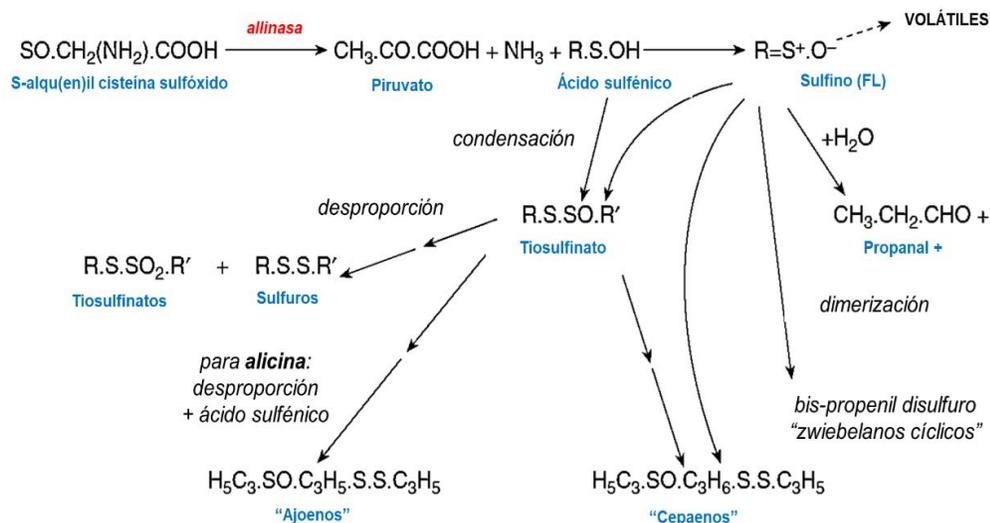


Figura 2 Formación de compuestos azufrados a partir de la hidrólisis por la alinasa de L-cisteína sulfóxidos. **R**, metil, propil, 2-propenil(alil) y 1-propenil; **LF**, factor lacrimógeno (Tomado de Randle y Lancaster, 2002)

2.5.4. Tiosulfatos. Son compuestos derivados de la degradación natural de la propiina ((+)-S-propil-L-cisteína sulfóxido, figura 3) (Subramanian y *col.*, 2020, Sorlozano-Puerto y *col.*, 2018), son muy reactivos, lo que depende de la temperatura y pH (Córdova, 2010). Lawson (1993, citado por Córdova, 2010)

consigna las siguientes proporciones respecto al total de tiosulfinatos presentes en el ajo:

- | | |
|---|-------------|
| 1. alicina, | 70 % |
| 2. alil-SS(O)-metil, | 6 – 16 % |
| 3. metil-SS(O)-alil, | 3 – 9 % |
| 4. trans-1-propenil-SS(O)-alil, | 1 – 7 % |
| 5. alil-SS(O)-trans-1-propenil, | 0.2 – 4 % |
| 6. trans-1-propenil-SS(O)-metil y metil-SS(O)-trans-1-propenil, | 0.1 – 2.5 % |
| 7. metil-SS(O)-metil, | 2 % |

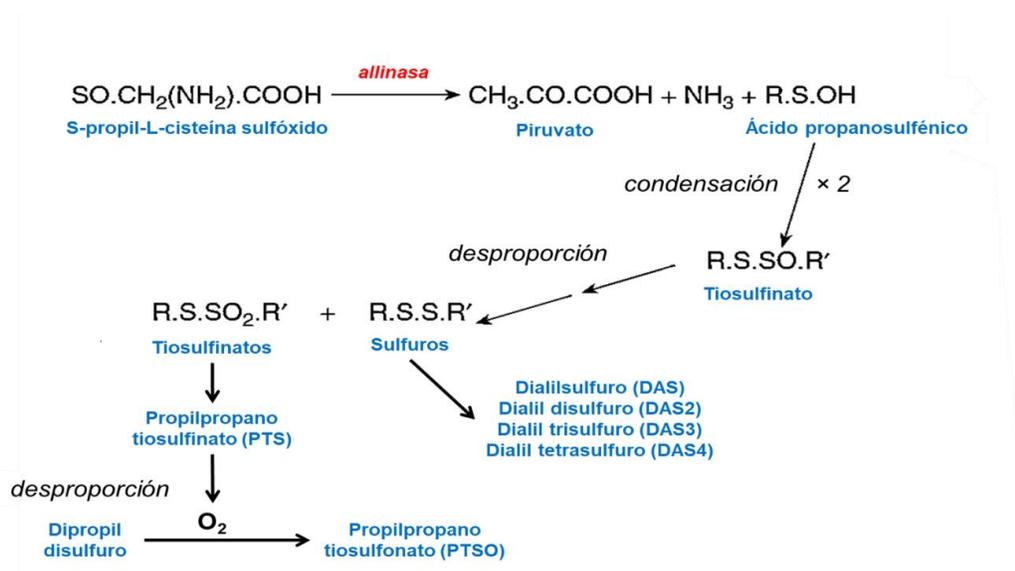


Figura 3 Formación de propilpropano tiosulfinato (PTS) y propilpropano tiosulfonato (PTSO) y sulfuros (Con información de Albertuz (2021) y de Randle y Lancaster (2002))

2.5.5. *Allium sativum* e infección por *Eimeria* spp. El estudio de revisión de Adjei-Mensah y Atuahene (2022) sobre el efecto potencial como anticoccidiano del ajo muestra que los trabajos de investigación han utilizado diversas preparaciones, lo que influye en la presencia de sus compuestos derivados. Sin embargo, el efecto general *in vitro* de: ajo en polvo (DAS, aliina, alicina), extractos acuosos (DAS, DADS, DATS), extractos en metano (sulfóxido de S-alil-cisteína, fenoles,

flavonoides), productos con propilpropano tiosulfinato (PTS) y propilpropano tiosulfonato (PTSO), es la disminución de la esporulación de ooquistes en función de las dosis utilizadas. Mientras que los efectos *in vivo* del uso de polvo de ajo, extractos acuosos y en metanol y productos con PTS/PTSO mejoran en diferente magnitud las variables productivas: ganancia de peso (GDP) y conversión alimenticia (CA); además disminuyen la severidad de la infección experimental por *Eimeria* spp: número de ooquistes en heces (OPG), signos clínicos, grado de severidad de las lesiones (LS).

La actividad antimicrobiana del PTS y del PTSO han sido ampliamente estudiadas (Albertuz, 2021). Ambos compuestos han demostrado que bajo condiciones *In vitro* reducen la viabilidad de los esporozoítos de *E. acervulina*, estimulan la proliferación de las células esplénicas, mejorando la respuesta inmune innata (Kim y col., 2011; Kim y col., 2013a; Pourali y col., 2014; Alnassan y col., 2015), e inhibe la esporulación de *E. tenella* (Pourali y col., 2014). Sin embargo, el uso del PTSO es más promisorio, debido a su mayor estabilidad química respecto a otros COS del *Allium*, aunque su insolubilidad en agua, requiere de la utilización de un vehículo para incrementar su viabilidad biológica y absorción (Abad y col., 2019). Sin embargo, los mecanismos de acción anticoccidiana de los principios azufrados no se han elucidado completamente. En el cuadro 4 se presentan resultados de trabajos de investigación sobre los efectos *in vitro* e *in vivo* de PTS y/o PTSO en *Eimeria* spp.

Cuadro 4. Efectos del uso del propilpropano tiosulfinato (PTS) y del propilpropano tiosulfonato (PTSO) en la eimeriosis experimental en pollos de engorda.

<i>Eimeria</i>	Efecto	Autores
<i>In vitro</i>		
<i>E. acervulina</i>	PTS-PTSO, reducción de la viabilidad de los esporozoitos	Kim y col., 2013
<i>E. acervulina</i>	PTS o PTSO, inhibición de la penetración celular (MDBK*) de los esporozoitos (acción sobre la célula MDBK y sobre el esporozoito)	Aguinaga-Casañas y col., 2022
<i>E. tenella</i>	Inhibe la esporulación	Pourali y col., 2014
<i>E. tenella</i>	Inhibe la esporulación	Alnassan y col., 2015
<i>In vivo</i>		
<i>E. acervulina</i>	PTS-PTSO, mejoramiento de la respuesta inmune innata. Incremento de la transcripción del interferón gamma, interleucina-4, super familia 15 de ligandos del factor de necrosis tumoral, enzimas antioxidantes (catalasa y paraoxonasa 2). Disminución de interleucina-10	Kim y col., 2013
<i>E. acervulina</i>	Incremento en la ganancia de peso y una disminución en la excreción de ooquistes, así como una mejor respuesta vacunal contra coccidia	Lillehoj y col., 2011

* MDBK, Madin-Darby Bovine Kidney cells

Los resultados del uso de PTS/PTSO apuntan a que el uso de estos compuestos es una alternativa al uso de fármacos para la prevención y control de la eimeriosis en la producción comercial de aves de corral.

2.6 Ácido butírico, butirato y butirato de sodio

En la búsqueda de la salud intestinal junto a los fitoquímicos se han utilizado ácidos orgánicos (McKnight y col., 2019). El ácido butírico ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$) es un ácido graso de cadena corta (4C), generado principalmente en el ciego y colon del ave, donde la microbiota lo sintetiza a partir de la fermentación de carbohidratos no

amiláceos, es la principal fuente energética de los colonocitos, mantiene la salud intestinal regulando la diferenciación y proliferación de las células epiteliales (Gálfi y Neogrády, 2001) y favoreciendo la apoptosis de células con alteraciones genéticas (Le Leu y col., 2009). Estimula la expresión de la zónula *occludens*, lo que ayuda a la función de la barrera intestinal (Guilloteau y col., 2010; Wu y col., 2018). El ácido butírico (Ba) regula también la microbiota intestinal, es considerado como posbiótico con numerosos beneficios para el tracto digestivo. Cuando el Ba pierde un H⁺ se forma el ion butirato (CH₃(CH₂)₂CO₂), el butirato de sodio (Na (CH₃(CH₂)₂CO₂)) es la sal sódica del (Ba); donde el Na⁺ sustituye a un H⁺ de un grupo OH. El butirato de sodio (B) en la alimentación animal es una fuente de Ba, su estado sólido facilita su inclusión en el alimento, es más estable; con las ventajas de ser menos volátil y oloroso (Elnesr y col., 2020). El B puede proporcionarse en forma libre o bien protegido con grasa vegetal; en el primer caso se utilizará en el tracto digestivo anterior, absorbiéndose en el ingluvis (Van der Wielen, 2002), en forma protegida será mejor utilizado en los intestinos; considerándose como óptimo un tiempo de liberación del B entre 2.5 y 4 h (Elnesr y col., 2020).

El B es ingerido por el ave, al llegar al proventrículo el pH ácido permite que se libere el Na⁺ reconstituyéndose el Ba, el cual contribuye a disminuir el pH del órgano, favoreciendo la activación de los pepsinógenos a pepsinas mejorando la digestión de las proteínas. Los beneficios de la suplementación con B se han identificado ampliamente: incrementa la masa y la longitud (Aghazadeh y Tahayazdi, 2012) del tracto gastrointestinal (TGI), mejora la estructura de la mucosa intestinal incrementado la longitud de las vellosidades hasta 55 % en pollos de 21 días de edad (Mallo y col., 2012), a su vez contribuye a mantener la barrera intestinal. Además, de promover la síntesis de moco, podría estimular la irrigación del TGI y la producción de hormonas gastrointestinales (Elnesr y col., 2019). El B modula la microbiota (Guilloteau y col., 2010; Wu y col., 2018), incrementa las poblaciones bacterianas deseables (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) y disminuye las indeseables (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *Clostridium perfringens*),

reduce la colonización bacteriana de la mucosa intestinal, por lo que se considera un alternativa al uso de antibióticos. Se ha observado que cuando se utiliza B juntamente con aceites esenciales en pollos desafiados con coccidia y *Clostridium perfringens* se modifica positivamente la diversidad bacteriana (Bortoluzzi y col., 2018). Entre los beneficios en la producción, el uso de B mejora la digestibilidad de proteína y energía, lo que puede atribuirse al efecto sobre la estructura del TGI (Elnesr y col., 2020).

3. JUSTIFICACIÓN

Desde hace mucho tiempo, la eimeriosis, parasitosis de rápida propagación en las unidades de producción, con la que se ha convivido en la avicultura provoca pérdidas económicas muy importantes alcanzando anualmente hasta 220,500 millones de MXN (Blake y col., 2020a) La prevención y control representan un desafío por la resistencia de los parásitos a los fármacos anticoccidianos (sintéticos e ionóforos) existentes; además, la regulación sanitaria en el uso de fármacos en los alimentos para consumo animal será más restrictiva cada vez, en la visión de producir alimentos inocuos y de alto valor biológico para consumo humano. Por ello, la investigación sobre nuevos productos que puedan utilizarse como anticoccidianos es una prioridad para la industria avícola. Estos productos deberían no generar resistencia, no alterar las características fisicoquímicas de los alimentos para los animales y la carne para el consumo humano, ser seguros en su operación y para el medio ambiente, y ser rentables. En este marco se planteó este proyecto de investigación donde se usó en la dieta un extracto encapsulado de Alíáceas valorado por su contenido de PTSO para estudiar sus efectos en la digestibilidad de nutrientes de pollos sanos. Además, en las variables productivas, la microbiota y salud intestinal y pigmentación en piel de pollos de engorda infectados experimentalmente con *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella*.

4. HIPÓTESIS

El presente proyecto revisó los efectos del extracto de Alíáceas y del butirato de sodio en la digestibilidad ileal de nutrientes, salud intestinal, productividad y severidad de la infección por *Eimeria* spp en el pollo de engorda. Las hipótesis formuladas fueron que: La inclusión dietaria de...

- 1) ...un producto encapsulado de propilpropano tiosulfonato mejora la digestibilidad ileal aparente de los aminoácidos, la energía y el fósforo en una dieta base maíz - soya.

- 2) ...dosis crecientes de un extracto encapsulado de Alíáceas disminuye la excreción fecal de ooquistes y el daño intestinal, previene los cambios en la microbiota intestinal por la infección experimental con *Eimeria* spp. Además, mantiene las variables productivas comparables a las de aves no desafiadas, o tratadas con anticoccidianos convencionales.

- 3) ...dosis crecientes de un extracto encapsulado de Alíáceas, o extracto encapsulado de Alíáceas y butirato de sodio disminuyen la severidad de la infección (excreción fecal de ooquistes y daño intestinal) por infección experimental con *Eimeria* spp. Además, mantienen la morfología intestinal, lo que favorece a que el comportamiento productivo, nivel de xantofilas en plasma sanguíneo, el amarillamiento en vivo y en la canal fría sean equiparables a los de aves no desafiadas o a los de aves tratadas con anticoccidianos convencionales.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos del extracto de Aliáceas y del butirato de sodio en la digestibilidad ileal de nutrientes, salud intestinal, productividad, pigmentación y severidad de la infección por *Eimeria* spp. (*E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*) en el pollo de engorda.

5.1. Objetivos específicos.

Para alcanzar el objetivo general del proyecto y comprobar o rechazar las hipótesis formuladas se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1) Evaluar el efecto de diferentes dosis de producto encapsulado de propilpropano tiosulfonato sobre la digestibilidad ileal aparente de los aminoácidos (arginina (Arg), lisina (Lys), leucina (Leu), treonina (Thr), histidina (His), isoleucina (Ile), valina (Val) y fenilalanina (Phe)), energía y fósforo, en una dieta de maíz y soya, así como sus efectos sobre el crecimiento de pollos de engorda.
- 2) Examinar los efectos de dosis crecientes de extracto encapsulado de Aliáceas en: el desempeño productivo, la eliminación fecal de ooquistes, las lesiones intestinales y la composición de la microbiota intestinal en pollos de engorde desafiados con *Eimeria* spp (*E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*).
- 3) Examinar los efectos de dosis crecientes de extracto encapsulado de Aliáceas o de extracto encapsulado de Aliáceas y butirato de sodio en: el desempeño productivo, pigmentación, morfología intestinal, severidad de la infección (excreción fecal de ooquistes y daño intestinal) en pollos de engorde bajo desafío con *Eimeria* spp. (*E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*).

Los objetivos específicos fueron alcanzados a través de tres experimentos que se presentaron(an) en las siguientes publicaciones.

1. *Efecto del propilpropano tiosulfonato encapsulado en la digestibilidad ileal aparente y el comportamiento productivo en pollos de engorda*

Villar-Patiño, G., Camacho-Rea, M. del C., Olvera-García, M. E., Soria-Soria, A., Baltazar-Vázquez, J. C., Gómez-Verduzco, G., Solano, L., y col. (2023). The Effect of Encapsulated Propyl Propane Thiosulfonate (PTSO) on Apparent Ileal Digestibility and Productive Performance in Broiler Chickens. *Animals*, 13(6), 1123. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/ani13061123>

2. *Efecto de un extracto encapsulado de Aliáceas en el desempeño productivo, salud y microbiota intestinales en pollos de engorda desafiados con Eimeria spp.*

Villar-Patiño, G., Camacho-Rea, M. D. C., Olvera-García, M. E., Baltazar-Vázquez, J. C., Gómez-Verduzco, G., Téllez, G., Labastida, A., Ramírez-Pérez, A. H. (2023). Effect of an Alliaceae Encapsulated Extract on Growth Performance, Gut Health, and Intestinal Microbiota in Broiler Chickens Challenged with *Eimeria* spp. *Animals*, 13(24), 3884. MDPI AG. Retrieved from <https://doi.org/10.3390/ani13243884>

3. *Efecto de un extracto encapsulado de Aliáceas y de butirato de sodio en el desempeño productivo, salud intestinal y pigmentación de pollos infectados con Eimeria spp.*

Gonzalo Villar-Patiño, María del Carmen Camacho-Rea, Myrna Elena Olvera-García, Julio César Baltazar-Vázquez, Gabriela Gómez-Verduzco, Guillermo Téllez, Aurora Hilda Ramírez-Pérez

En preparación para su publicación...

6. EXPERIMENTOS

- 6.1. **EXPERIMENTO 1.** *Efecto del propilpropano tiosulfonato encapsulado en la digestibilidad ileal aparente y el comportamiento productivo en pollos de engorda*

Los derechos de autor © aparecen en el ángulo inferior izquierdo de la primera página del artículo “The Effect of Encapsulated Propyl Propane Thiosulfonate (PTSO) on Apparent Ileal Digestibility and Productive Performance in Broiler Chickens.”

The Effect of Encapsulated Propyl Propane Thiosulfonate(PTSO) on Apparent Ileal Digestibility and Productive Performance in Broiler Chickens© 2023 by Gonzalo Villar-Patiño is licensed under Attribution-ShareAlike 4.0 International.To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>



Article

The Effect of Encapsulated Propyl Propane Thiosulfonate (PTSO) on Apparent Ileal Digestibility and Productive Performance in Broiler Chickens

Gonzalo Villar-Patiño ^{1,2}, María del Carmen Camacho-Rea ³, Myrna Elena Olvera-García ², Arturo Soria-Soria ², Julio César Baltazar-Vázquez ⁴, Gabriela Gómez-Verduzco ⁵, Lourdes Solano ³, Guillermo Téllez ⁶ and Aurora Hilda Ramírez-Pérez ^{5,*}

¹ Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud y de la Producción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Coyoacán, Ciudad de México 04510, Mexico; gvillar@gponutec.com

² Grupo Nutec, El Marqués, Querétaro 76246, Mexico

³ Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, Departamento de Nutrición Animal, Talpan, Ciudad de México 14080, Mexico

⁴ Specialized Animal Nutrition Research Network, Grupo Nutec, San Juan del Río, Querétaro 76814, Mexico

⁵ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Coyoacán, Ciudad de México 04510, Mexico

⁶ Department of Poultry Science, University of Arkansas, Fayetteville, AR 72701, USA

* Correspondence: rpreza@unam.mx; Tel: +52-55-2189-6592



Citation: Villar-Patiño, G.; Camacho-Rea, M.d.C.; Olvera-García, M.E.; Soria-Soria, A.; Baltazar-Vázquez, J.C.; Gómez-Verduzco, G.; Solano, L.; Téllez, G.; Ramírez-Pérez, A.H. The Effect of Encapsulated Propyl Propane Thiosulfonate (PTSO) on Apparent Ileal Digestibility and Productive Performance in Broiler Chickens. *Animals* **2023**, *13*, 1123. <https://doi.org/10.3390/ani13061123>

Academic Editor: Sabine Gebhardt-Henrich

Received: 4 February 2023

Revised: 5 March 2023

Accepted: 20 March 2023

Published: 22 March 2023



Copyright © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: There are currently two main concerns in broiler production. The first concern is the production cost, the key to which is improving feed efficiency; the second relates to the environmental impact. Both are vitally important for business sustainability. Some existing nutritional strategies contribute to improving the use of nutrients to achieve better performance; one of these involves adding plant extract additives, as well as their bioactive compounds, to animal feed. These additives improve digestive processes and nutrient absorption. *Allium* species contain sulfur compounds, such as propyl propane thiosulfonate, which has been studied in broilers and was found to enhance the digestibility of energy, fat, and fiber. Nevertheless, as far as we know, there is no scientific research focused on the digestibility of amino acids and minerals, which play an important role in growth and feed efficiency. Moreover, decreasing the levels of nitrogen and other minerals in feces could reduce the amount of pollutants released into the environment. Our results show that the supplementation of encapsulated propyl propane thiosulfonate in the broiler chicken diet improves the apparent ileal digestibility of amino acids and energy compared to the control diet; a positive trend in the digestibility of phosphorus was also found.

Abstract: This study analyzed the effects of different dietary doses of encapsulated propyl propane thiosulfonate (Pe-PTSO) on the apparent ileal digestibility (AID) of nutrients and productive performance in broilers. A total of 100 one-day-old Cobb 500 were housed in battery cages for 20 days. At 10 days of age, the birds were assigned to one of five diets: negative control (P0), 250 mg/kg of Pe-PTSO (P250), 500 mg/kg of Pe-PTSO (P500), 750 mg/kg of Pe-PTSO (P750), and positive control, nicarbazin–narasin (ION). Titanium dioxide was the external marker, which was added to the diets from day 17 to 20. In the birds fed the P250 diet, there was a significant difference ($p \leq 0.05$) in the AID values for amino acids and energy compared to those that consumed the P0 diet. Furthermore, the P250 diet significantly increased ($p \leq 0.05$) the average daily weight gain compared to the P0 diet. No significant differences were observed between treatments in average daily feed intake and feed conversion ratio. In summary, the inclusion of 250 mg of encapsulated PTSO per kg in broiler chickens diet improved the digestibility of amino acids and energy, as well as weight gain.

Keywords: broilers; propyl propane thiosulfonate; apparent ileal digestibility; amino acids; energy; phosphorus

1. Introduction

Food security for the world population, which will grow by approximately 20% in the next 25 years, challenges the ability to produce food more efficiently and sustainably [1,2]. Poultry production is considered to be an environmentally and economically sustainable activity due to the ability of poultry to convert feed in meat [3]. However, the feed is considered the major economic cost of animal production, therefore, the scientific research to improve the utilization of nutrients by the broiler chicken evolve continuously. Poultry diets are formulated based on both digestibility and nutrient absorption, which allows us to know their utilization rate by the bird [4,5]. Increasing nutrient digestibility in the diet has been shown to enhance the productive performance of broiler chickens [5,6]. Different formulation strategies have been adopted to optimize the growth and improve feed efficiency of birds [7], such as fecal digestibility, true digestibility, standardized ileal digestibility, and apparent ileal digestibility (AID) [8]; all of them quantified digested dietary nutrients [9]. Currently, there are different feed additives, such as enzymes, prebiotic, probiotic, ionophores, and recently, the use of phytochemicals, which contributes to enhance nutrient digestion [10,11]. Narasin and nicarbazin, ionophore coccidiostats, are frequently used as feed additives in broiler diets; it has been reported that their supplementation increased crude protein digestibility and affects intestinal microbiota, improving gut health of broiler chickens [12]. Likewise, narasin has also been found to enhance feed efficiency in birds reared on different production systems, including caged systems without coccidia infection [13]. Scientific research about nutrient digestion using natural additives is increasing. Phytochemicals are natural plant compounds produced as secondary metabolites, which differ in chemical structure, biological activity, and plant origin [14,15]. These secondary metabolites are considered natural sources of feed additives, as well as natural growth promoters [16], which are generally recognized as safe (GRAS) [17]. They possess significant biological activities that affect gut health, improve intestinal morphology [18,19], modulate gut microbiota, and enhance the metabolic activity leading to improvements in both digestibility and nutrient utilization [18–20]. Phytochemicals are categorized into five main groups: terpenoids, polyphenols, phytosterols, alkaloids, and organosulfur compounds [21].

Propyl propane thiosulfonate (PTSO) is an organosulfur compound belonging to the genus *Allium*, derived from the natural degradation of propiin, which is the *Allium* flavor precursor [22,23]. Unlike other sulfur components from this *Allium* genus, PTSO is chemically stable but poorly soluble in water, hence it is necessary to provide it with a specialized carrier to increase its biological availability and absorption [24]. PTSO has been studied as an additive in animal nutrition showing beneficial results on growth performance [25–28]. In addition, it has antimicrobial effects, which have been demonstrated in vitro and in vivo against *Enterobacteriaceae*, such as *Escherichia coli* and *Salmonella* spp., as well as *Campylobacter jejuni* in broilers [26,28]. Moreover, Peinado, et al. [27] reported that PTSO could modulate intestinal microbiota composition. Furthermore, different immunomodulatory effects of PTSO in broiler chickens have been reported [25]. However, there is limited research about the effect of PTSO on nutrient digestibility in poultry. In this sense, Peinado, et al. [27], who supplemented a broiler chickens diet with PTSO, found an increase in the digestibility of energy, fat, and acid-detergent and neutral detergent fibers.

To the best of our knowledge, there are no studies about the effect of PTSO on the digestibility of amino acids and phosphorus in broiler chickens.

We hypothesized that the inclusion of an encapsulated product of propyl propane thiosulfonate (Pe-PTSO) will improve the AID of amino acids, energy, and phosphorus, in a corn-soybean meal diet. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effect of different doses of Pe-PTSO on AID of amino acids (arginine (Arg), lysine (Lys), leucine (Leu), threonine (Thr), histidine (His), isoleucine (Ile), valine (Val), and phenylalanine (Phe)), energy, and phosphorus, in a corn-soybean meal diet, as well as their effects on growth performance of broiler chickens.

2. Materials and Methods

2.1. Animals, Diets, and Experimental Design

A total of 100 one-day-old Cobb 500 broiler chickens were housed in a facility equipped with battery cages (48 cm × 80 cm) and provided with manual feeders and automatic nipple drinkers. The environmental temperature was set to 30 °C during the first week; after that, it was maintained between 26 and 27 °C. Relative humidity was set between 55 and 60%.

From 1 to 20 days of age, the birds were fed a corn–soybean meal basal diet (Table 1) that met or slightly exceeded the nutritional needs of chickens of the Cobb 500 lineage. The pre-experimental period lasted from the first day until 9 days of age. At 10 days of age, the birds were weighed and allocated to 1 of 5 treatments in a completely randomized design, as follows: P0—a negative control (basal diet); P250—basal diet + 250 mg/kg of Pe-PTSO; P500—basal diet + 500 mg/kg of Pe-PTSO; P750—basal diet + 750 mg/kg of Pe-PTSO, and ION—a positive control (basal diet + 50 mg/kg of nicarbazin + 50 mg/kg of narasin).

Table 1. Ingredient and calculated chemical composition (g/kg as fed) and energy (Mcal/kg) of the basal diet.

Ingredient	g/kg
Yellow corn	513.9
Soybean meal	406.0
Vegetable oil	40.5
Calcium carbonate	14.7
Calcium orthophosphate	9.1
Sodium bicarbonate	4.9
Methionine DL	3.6
Refined salt	2.0
L-lysine HCl	2.2
L-Threonine	1.1
Betaine anhydrous	0.6
L-valine	0.2
Biocholine	0.2
Vitamins—mineral premix ¹	0.9
Phytase 5000	0.1
Chemical Composition	g/kg
Dry matter	883.9
Crude protein	239.0
Crude fat	62.0
Gross energy (Mcal/kg)	4.0
Metabolizable energy (Mcal/kg)	3.15
Calcium	10.0
Total phosphorus	5.9
Available phosphorus	4.5
Sodium	2.3
Chloride	2.0
Potassium	9.5
DEB (mEq/kg) ²	300
Arginine	16.2
Lysine	15.0
Leucine	19.3
Threonine	10.2
Histidine	5.9
Isoleucine	10.1
Valine	11.2
Phenylalanine	11.8

¹ Content per kilogram: vitamin A (retinol acetate), 12,000 International Units (IU); vitamin D3, 5000 IU; vitamin E (DL- α -tocopherol acetate), 50 IU; vitamin K, 3 mg; thiamine, 3 mg; riboflavin, 9 mg; pantothenic acid, 15 mg; pyridoxine, 4 mg; biotin, 0.2 mg; folic acid, 2 mg; vitamin B12, 0.02 mg; manganese, 100 mg; zinc 100 mg; iron, 40 mg; copper, 15 mg; iodine, 1 mg; selenium, 0.35 mg. ² Dietary electrolyte balance (DEB).

Each treatment had 5 replicates. The experimental unit was the cage with 4 birds in each; the number of birds and replicates were as those reported in previous studies of ileal and total broiler digestibility [27,29,30]. In addition, access to drinking water and feed was provided ad libitum.

2.2. Pe-PTSO Supplementation

The PTSO used in this study was a product (Pe-PTSO) encapsulated into a matrix of dextrin and lecithin, having a concentration of 12 g/kg, as determined by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). The retention time of the chromatography peak was indicated for the PTSO [31]; the databases of the NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library, version 1.7 (Gaithersburg, MD, USA), were used. The analysis was carried out in the laboratory of the Center for Research in Applied Sciences and Advanced Technology of the National Polytechnic Institute (IPN, Querétaro, Mexico).

2.3. Growth Performance

The body weight (BW) of the birds was recorded at 10 days of age and at the end of the study (20 days of age), and was used to estimate the average daily weight gain (ADG). Feed intake was recorded to calculate the average daily feed intake (ADFI) and the feed conversion ratio (FCR).

2.4. Apparent Ileal Digestibility Study

Titanium dioxide was added to the diets at 5 g TiO₂/kg, as an indigestible marker for the AID study [32]. The diets with TiO₂ were offered from day 17 to 20. At the end of the experiment, all birds were humanely killed by cervical dislocation [5,33,34]. The content of the ileum at 2.0 cm from the ileocecal valve was collected in sterile bags and preserved at −70 °C in an ultra-low temperature freezer (ThermoFisher Scientific, TSX, Waltham, MA, USA) until the analysis. The ileum content was vacuum dried (FreeZone Triad Benchtop Freeze Dryer, Labconco, Kansas City, MO, USA) and pulverized to a particle size of 0.5 mm.

Laboratory Analysis

A titanium dioxide reference curve was developed according to that reported by Short, et al. [32]. It was generated using a UV visible spectrophotometer (Agilent 8453/G1103A, Shanghai, China). The diets and ileal content were previously subjected to acid hydrolysis to quantify the amino acids (Arg, Lys, Leu, Thr, His, Ile, Val, and Phe) by ultra-performance high-resolution liquid chromatography using an ACQUITY UPLC system (Waters H-Class, Milford, MA, USA) equipped with a diode array detector, following the AOAC 994.12 method [35]. The quantification of phosphorus (P) was performed using the photometric methodology suggested by AOAC (965.17) [36], using a spectrophotometer (Agilent 8453/G1103A, Shanghai, China). The energy was quantified using an adiabatic bomb (IKA Model C200 basic, Staufen, Germany) according to the ASTM D2015-66 method [37].

The AID of amino acids, energy, and phosphorus was calculated using the following equation:

$$\text{AID} = [1 - ((\text{TiD} \times \text{NI}) / (\text{ND} \times \text{TiI}))] \times 100$$

where TiD is the concentration of TiO₂ in the diet; NI is the concentration of the nutrient in the ileal digesta; ND is the concentration of the nutrient in the diet; and TiI is the concentration of TiO₂ in the ileal digesta [38].

2.5. Statistical Analysis

The data were subjected to one-way ANOVA using JMP (SAS Institute, Cary, NC, USA, 2019) [39]. Tukey's test was used for the post hoc analysis. The significance level was set at $p \leq 0.05$, and a trend was set among $p > 0.05$ and ≤ 0.10 . The initial body weight (IBW) at 10 days was used as a covariate for ADG, ADFI, and FCR. In addition, to determine whether the effect of the different doses of Pe-PTSO was linear, quadratic, or cubic, a follow-up trend analysis using orthogonal polynomial contrasts was performed for the AID data.

3. Results

3.1. Apparent Ileal Digestibility Study

Table 2 shows the AID of nutrients in broiler chickens fed diets containing different levels of Pe-PTSO. The digestibility of the basal diet used in this study exceeded 90%, which is in concordance with that value reported by An et al. [23], who also used diets based on corn–soybean meal. The AID of Arg, Lys, Leu, Thr, His, Ile, Val, and Phe, as well as energy, was significantly higher ($p \leq 0.01$) in birds fed the P250 diet than in the birds fed the P0 diet. Overall, the average increase in the AID of amino acids was 2.3%; the lowest increment was observed in Arg (1.70%), and the greatest increase was observed in Ile (3.04%). In the P250 diet, the energy digestibility was 0.15 Mcal/kg higher than that in the P0 diet. Moreover, the P250 diet resulted in greater digestibility ($p \leq 0.05$) for Arg, Lys, and Thr, as well as for energy, compared to the P750 diet.

Table 2. Apparent ileal digestibility of amino acids (%), energy (Mcal/kg), and phosphorus (%) in 20-day-old broiler chickens fed a corn–soybean diet supplemented with different inclusions of encapsulated propyl propane thiosulfonate (Pe-PTSO) or ION.

Nutrient ²	Treatment ¹					SEM ³	p Value
	P0	P250	P500	P750	ION		
Arg	94.47 ^b	96.17 ^a	95.04 ^{ab}	94.46 ^b	95.25 ^{ab}	0.30	<0.01
Lys	94.03 ^b	95.90 ^a	95.01 ^{ab}	94.40 ^b	94.80 ^{ab}	0.31	<0.01
Leu	92.22 ^b	94.52 ^a	93.31 ^{ab}	92.75 ^{ab}	93.34 ^{ab}	0.42	0.01
Thr	90.25 ^b	92.56 ^a	91.39 ^{ab}	90.57 ^b	91.68 ^{ab}	0.45	0.01
His	92.97 ^b	95.17 ^a	93.57 ^{ab}	93.68 ^{ab}	93.56 ^{ab}	0.41	0.01
Ile	90.88 ^b	93.92 ^a	92.24 ^{ab}	91.84 ^{ab}	92.06 ^{ab}	0.57	0.02
Val	90.29 ^b	93.16 ^a	91.56 ^{ab}	91.27 ^{ab}	91.28 ^{ab}	0.55	0.02
Phe	92.52 ^b	94.66 ^a	93.58 ^{ab}	92.95 ^{ab}	93.45 ^{ab}	0.47	0.05
Energy	3.39 ^b	3.54 ^a	3.47 ^{ab}	3.40 ^b	3.45 ^{ab}	0.03	0.01
P	73.79	79.49	76.09	72.86	76.70	1.57	0.06

^{a,b} Different letters in the same row indicate significant differences ($p \leq 0.05$). ¹ P0, negative control, corn–soybean basal diet; P250, basal diet + 250 mg/kg Pe-PTSO; P500, basal diet + 500 mg/kg Pe-PTSO; P750, basal diet + 750 mg/kg Pe-PTSO; ION, positive control, basal diet + 50 mg/kg nicarbazin + 50 mg/kg narasin. ² Arginine (Arg), lysine (Lys), leucine (Leu), threonine (Thr), histidine (His), isoleucine (Ile), valine (Val), phenylalanine (Phe), and phosphorus (P). ³ SEM, standard error of the mean, $n = 5$.

Regarding phosphorus digestibility, there was a trend ($p = 0.06$) to improve it when 250 mg/kg Pe-PTSO was added to the diet. The ION and P500 treatments did not show differences ($p > 0.05$) for any nutrient evaluated.

The polynomial contrasts between the treatments are summarized in Table 3. There was a significant cubic positive response ($p \leq 0.05$), rather than a linear or quadratic response, for the digestibility of all nutrients analyzed. As we mentioned above, the P250 diet resulted in the highest values for digestibility in all cases.

Table 3. Orthogonal polynomial contrasts trend analysis of the apparent ileal digestibility of amino acids, energy, and phosphorus in 20-day-old broiler chickens fed a corn–soybean diet supplemented with encapsulated propyl propane thiosulfonate (Pe-PTSO)¹.

Nutrient ²	Linear Trend		Quadratic Trend		Cubic Trend	
	p Value	R ²	p Value	R ²	p Value	R ²
Arg	0.57	0.02	0.02	0.36	0.01	0.52
Lys	0.91	<0.01	0.01	0.40	0.01	0.52
Leu	0.88	<0.01	0.03	0.33	0.02	0.46
Thr	0.94	<0.01	0.03	0.35	0.02	0.45
His	0.84	<0.01	0.17	0.19	0.02	0.45
Ile	0.73	<0.01	0.06	0.28	0.02	0.45
Val	0.69	<0.01	0.03	0.26	0.02	0.44
Phe	0.94	<0.01	0.06	0.28	0.05	0.39
Energy	0.83	<0.01	0.02	0.37	0.02	0.47
P	0.49	0.03	0.04	0.31	0.05	0.37

¹ P0, negative control, corn–soybean basal diet; P250, basal diet + 250 mg/kg Pe-PTSO; P500, basal diet + 500 mg/kg Pe-PTSO; P750, basal diet + 750 mg/kg Pe-PTSO. ² Arginine (Arg), lysine (Lys), leucine (Leu), threonine (Thr), histidine (His), isoleucine (Ile), valine (Val), phenylalanine (Phe), and phosphorus (P).

3.2. Growth Performance

The average initial body weight (IBW) of the chickens at 10 days of age is 286.6 gr.

The ADG was higher ($p \leq 0.05$) in the broilers fed the P250 diet than in those fed the P0 diet, while the P500, P750, and ION groups did not show any differences ($p > 0.05$).

The ADFI showed a similar trend than ADG ($p = 0.06$), the highest value for P250 (74.92 g/d) and the lowest with P0 (67.87 g/d). Nevertheless, this increment against P0 was not observed with P500, P750, or ION birds.

The FCR was not affected ($p > 0.05$) by treatment (Table 4). It should be noted that no bird mortality was observed in the experimental period.

Table 4. Growth performance of broiler chickens fed a corn–soybean diet supplemented with encapsulated propyl propane thiosulfonate (Pe-PTSO) or ION.

Parameters ¹	Treatments ²					SEM ³	p Value
	P0	P250	P500	P750	ION		
IBW (g)	284.2	282.9	286.9	289.2	289.6	2.18	0.16
ADG (g/d)	51.35 ^b	57.33 ^a	53.16 ^{ab}	55.60 ^{ab}	52.07 ^{ab}	1.38	0.03
ADFI (g/d)	67.87	74.92	68.04	69.73	70.05	1.75	0.06
FCR (g/g)	1.32	1.31	1.28	1.26	1.34	0.03	0.23

¹ IBW = initial body weight (10 d), ADG = average daily weight gain, ADFI = average daily feed intake, FCR = feed conversion ratio. ² P0, negative control, corn–soybean basal diet; P250, basal diet + 250 mg/kg Pe-PTSO; P500, basal diet + 500 mg/kg Pe-PTSO; P750, basal diet + 750 mg/kg Pe-PTSO; ION, positive control, basal diet + 50 mg/kg nicarbazin + 50 mg/kg narasin. ³ SEM, standard error of the mean, n = 5. ^{a,b} Different letters in the same row indicate significant differences ($p \leq 0.05$).

4. Discussion

4.1. Apparent Ileal Digestibility

Improving nutrient digestibility in the diets of poultry chickens has shown a positive impact on nutrition, productivity, as well as on the environment. Thus, increasing nutrient digestibility not only improves the optimal use of nutrients, but also constitutes a significant component of sustainable animal protein production [1,7]. The use of phytochemicals as additives in animal nutrition enhances digestive enzyme activity and productive performance [40,41].

It has been reported that PTSO improves the digestibility of energy, fat, and acid detergent and neutral detergent fibers in broiler chickens diets [27]. Nevertheless, to our

knowledge there is not scientific research regarding the effect of PTSO on the digestibility of other nutrients, such as amino acids and phosphorus.

In this study, we observed that P250 was the only dose that positively affects the AID of amino acids and energy. We do not have enough fundamentals to explain why higher doses of PTSO did not increase the AID of nutrients. We could suggest that the responses to PTSO doses appear to behave under the law of diminishing returns, which states that at higher doses, the increases in the response variable lessens, until it reaches a point in which it begins to decrease [42]. Assuming this statement were true, then it is necessary to explore if there is a dose among P250 and P500 that increase the AID of nutrients. Regarding to ION treatment, our data suggests that it has not significant effect on AID.

The beneficial effect of Pe-PTSO on amino acid digestibility is important because amino acids are critical dietary components regulating physiological, metabolic, and structural functions [43]. In this sense, a study conducted by Brzóška, et al. [44], who fed broiler chickens by adding an extract of *Allium sativum* in the feed, an increase in crude protein content in the breast was observed, suggesting that the diet enhanced not only the amino acid digestibility, but also its absorption in the animals.

Furthermore, the increase of 4% (0.15 Mcal/kg) in energy digestibility observed in the current study is in concordance with the results reported by Peinado, et al. [27], who observed a similar magnitude, 3.8%, in the energy digestibility of broiler chickens diet supplemented with 90 mg of PTSO/kg and suggested that PTSO improved the intestinal structure. In addition, phosphorus digestibility showed a similar positive trend when 250 mg/kg of Pe-PTSO was added to the diet. Phosphorus is a non-renewable, expensive, and essential natural resource for agricultural production, so its digestibility must be assessed to reduce its excretion as much as possible. Excesses of N and P are associated with the eutrophication phenomenon that damages rivers, lakes, and oceans [45].

We suggest that improvement in the nutrient digestibility observed in our study could be due to better intestinal health, which has been reported by Peinado, et al. [26] and Ur Rahman, et al. [46], who supplemented broiler diets with *Allium* compounds, finding an increment in height and width of the intestinal villi, as well as a greater surface area, resulting in major absorption of nutrients. Moreover, it has been reported that PTSO modifies the gut microbiota, as the presence of enterobacteria decreased with this treatment, creating a better environment, reducing the negative effect of overgrowth of enterobacteria on the intestinal mucosa, and promoting the absorption of nutrients [27,47,48].

4.2. Productive Performance

Several studies have demonstrated the effects dietary supplementation with *Allium sativum* (garlic) and its secondary metabolites on productive performance and health in animals [22,23,49]. Kothari, et al. [50] supplemented poultry diets with *Allium* extracts; the results showed that the additive positively modulated bird growth, performance indices, lipid metabolism, and the gut ecosystem, as well as the immune response, especially under stressful and disease-challenged conditions. These findings indicate that garlic has a plethora of beneficial effects on the metabolism. Moreover, Brzóška, et al. [44] used a diet supplemented with a liquid garlic extract, and also reported improvements in the weights of broilers.

Not only have complete garlic extracts shown benefits, but also the secondary metabolites have been proven to impact growth performance [25,26]. In this sense, the results observed in our study demonstrate that dietary supplementation with 250 mg/kg of Pe-PTSO resulted in a significant increase in the ADG, compared to P0.

This result is in concordance with those presented by Kim, et al. [25], who offered a diet with 6.7 mg/kg of PTSO and 3.3 mg/kg of propyl-propane thiosulfinate (PTS) to broiler chickens challenged with *Eimeria acervulina* and reported that PTSO/PTS improved ADG and decreased fecal oocyst excretion compared with birds given a non-supplemented diet.

It is important to mention that in our study, the higher doses of Pe-PTSO, P500 and P750, did not show significant difference on ADG compared to P0, which may be explained

because broiler chickens tended to decrease ADFI when the PTSO inclusion was increased from P250 to P500 or P750. Our results agree with Varmaghany, et al. [51], who observed that increasing the dose of garlic and its products reduces feed intake because it has a pungent smell and could reduce diet palatability [52]. Moreover, this effect is not exclusive for garlic and its products. Tahir, et al. [53] observed that using incremental doses of another phytochemical, eugenol, in broiler feed, affected the palatability, decreasing the ADFI while raising the inclusion of eugenol. Regarding to ION birds, our data suggests that it has no significant effect on performance.

Our results indicate that PTSO could enhance the performance of healthy broiler chickens when it is offered in a diet based on a corn–soybean meal. Moreover, Peinado, et al. [26] observed higher ADG when chicken diets were supplemented with 45 mg/kg of PTSO and a better FCR when chicken diets were supplemented with 45 or 90 mg/kg of PTSO. However, our findings did not show significant differences in the FCR. Nevertheless, it is worth mentioning that there are discrepancies between the various studies in which *Allium* derivatives have been used to improve production parameters in poultry nutrition [54–56]. These discrepancies may be caused by a number of reasons; attempting to explain this phenomenon, Ruiz, et al. [28] pointed out that the variation in the productive performance of broilers when fed products derived from garlic (*Allium sativum*) could arise because the chemically stable active compounds in these products were not characterized in all studies.

5. Conclusions

In summary, the inclusion of 250 mg of encapsulated PTSO per kg in the broiler chicken diet improved the digestibility of amino acids and energy, as well as the ADG. However, further research is needed to explain the mode of action and the correct dose of Fe-PTSO.

Author Contributions: Conceptualization, G.V.-P. and M.E.O.-G.; methodology, G.V.-P., M.E.O.-G. and J.C.B.-V.; validation, M.E.O.-G.; formal analysis, G.V.-P., M.d.C.C.-R., M.E.O.-G. and A.S.-S.; investigation, G.V.-P. and M.E.O.-G.; resources, M.E.O.-G.; data curation, G.V.-P.; writing—original draft preparation, G.V.-P. and M.d.C.C.-R.; writing—review and editing A.H.R.-P.; visualization, A.H.R.-P.; supervision, G.G.-V., L.S., G.T. and A.H.R.-P.; project administration, G.V.-P., M.E.O.-G. and J.C.B.-V.; funding acquisition, G.V.-P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was completely funded by Grupo Nutec (Avenida del Marqués 32, Parque Industrial Bernardo Quintana, El Marqués, Querétaro, Mexico, 76246), funding number iiii-2-19-Pi.

Institutional Review Board Statement: This experiment was approved on 5 October 2020, by the Institutional Subcommittee for the Care and Use of Experimental Animals (protocol SICUAE. DC-2020/3-6) of the School of Veterinary Medicine and Zootechnics of the National Autonomous University of Mexico (UNAM), in compliance with the Mexican Official Norm NOM-062-ZOO-1999.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors wish to thank all staff members of the Specialized Animal Nutrition Research Network (SANUREN, Querétaro, México) who contributed to this study.

Conflicts of Interest: At the time of submitting this manuscript, G. Villar-Patiño, M.E. Olvera-García, A. Soria-Soria, and J.C. Baltazar-Vázquez declare a potential direct conflict of interest as they work at Grupo NUTEc. "https://www.gponutec.com/" (accessed on 5 March 2023)." M.C. Camacho-Rea, G. Gómez-Vérduez, G. Téllez, L. Solano, and A.H. Ramírez-Pérez have no conflict of interest.

References

- Gerber, P.J.; Opio, C.I.; Steinfeld, H. *Poultry Production and the Environment—A Review*; Animal Production and Health Division, Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, 2008; pp. 1–27.
- FAO; IFAD; UNICEF; WFP; WHO. *The State of Food Security and Nutrition in the World 2021; Transforming Food Systems for Food Security, Improved Nutrition and Affordable Healthy Diets for All*; FAO: Rome, Italy, 2021. [CrossRef]
- FAO. Greenhouse gas emissions and fossil energy use from poultry supply chains. In *Guidelines for Assessment. Livestock Environmental Assessment and Performance Partnership*; FAO: Rome, Italy, 2016; Volume 1.
- Soomro, R.N.; Hu, R.; Qiao, Y.; El-Hack, M.E.A.; Abbasi, L.H.R.; Mohamed, M.A.E.; Bodinga, B.M.; Alagawany, M.; Yang, X.; Yao, J.; et al. Effect of Dietary Protein Sources and Amino Acid Balances on Performance, Intestinal Permeability and Morphology in Broiler Chickens. *Int. J. Pharmacol.* **2017**, *13*, 378–387. [CrossRef]
- Azizi, M.N.; Loh, T.C.; Foo, H.L.; Akit, H.; Izuddin, W.I.; Shazali, N.; Teik Chung, E.L.; Samsudin, A.A. Chemical Compositions of Brown and Green Seaweed, and Effects on Nutrient Digestibility in Broiler Chickens. *Animals* **2021**, *11*, 2147. [CrossRef] [PubMed]
- Elbaz, A.M.; El-Sheikh, S.E.; Abdel-Maksoud, A. Growth performance, nutrient digestibility, antioxidant state, ileal histomorphometry, and cecal ecology of broilers fed on fermented canola meal with and without exogenous enzymes. *Trop. Anim. Health Prod.* **2023**, *55*, 46. [CrossRef] [PubMed]
- Maharjan, P.; Martínez, D.A.; Weil, J.; Suesuttajit, N.; Umberson, C.; Mullenix, G.; Hilton, K.M.; Beitia, A.; Coon, C.N. Review: Physiological growth trend of current meat broilers and dietary protein and energy management approaches for sustainable broiler production. *Animal* **2021**, *15* (Suppl. S1), 100284. [CrossRef]
- Stein, H.H.; Fuller, M.F.; Moughan, P.J.; Sève, B.; Mosenthin, R.; Jansman, A.J.M.; Fernández, J.A.; de Lange, C.F.M. Definition of apparent, true, and standardized ileal digestibility of amino acids in pigs. *Livest. Sci.* **2007**, *109*, 282–285. [CrossRef]
- Ravindran, V.; Bryden, W.L. Amino acid availability in poultry—In vitro and in vivo measurements. *Aust. J. Agric. Res.* **1999**, *50*, 889–908. [CrossRef]
- Lu, P.; Choi, J.; Yang, C.; Mogire, M.; Liu, S.; Lahaye, L.; Adewole, D.; Rodas-Gonzalez, A.; Yang, C. Effects of antibiotic growth promoter and dietary protease on growth performance, apparent ileal digestibility, intestinal morphology, meat quality, and intestinal gene expression in broiler chickens: A comparison. *J. Anim. Sci.* **2020**, *98*, skaa254. [CrossRef]
- Krysiak, K.; Konkol, D.; Korczynski, M. Overview of the Use of Probiotics in Poultry Production. *Animals* **2021**, *11*, 1620. [CrossRef]
- Kunzel, S.; Borda-Molina, D.; Kraft, R.; Sommerfeld, V.; Kuhn, I.; Camarinha-Silva, A.; Rodehutschord, M. Impact of coccidiostat and phytase supplementation on gut microbiota composition and phytate degradation in broiler chickens. *Anim. Microbiome* **2019**, *1*, 5. [CrossRef] [PubMed]
- Yan, L.; Lv, Z.Z.; An, S.; Xing, K.; Wang, Z.G.; Lv, M.B.; Choct, M.; Guo, Y.M.; Zhou, G.L. Effects of rearing system and narasin on growth performance, gastrointestinal development, and gut microbiota of broilers. *Poult. Sci.* **2021**, *100*, 100840. [CrossRef]
- Wink, M. Phytochemical Diversity of Secondary Metabolites. In *Encyclopedia of Plant and Crop Science*; Universitat Heidelberg: Heidelberg, Germany; Marcel Dekker, Inc.: New York City, NY, USA, 2004.
- Zaynab, M.; Fatima, M.; Abbas, S.; Sharif, Y.; Umair, M.; Zafar, M.H.; Bahadar, K. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microb. Pathog.* **2018**, *124*, 198–202. [CrossRef] [PubMed]
- Hashemi, S.R.; Davoodi, H. Phytochemicals as new class of feed additive In poultry industry. *J. Anim. Vet. Adv.* **2010**, *9*, 2295–2304. [CrossRef]
- Hashemi, S.R.; Zulkifli, I.; Hair Bejo, M.; Farida, A.; Somchit, M.N. Acute Toxicity Study and Phytochemical Screening of Selected Herbal Aqueous Extract in Broiler Chickens. *Int. J. Pharmacol.* **2008**, *4*, 352–360. [CrossRef]
- Jamroz, D.; Wiliczekiewicz, A.; Wiertelcki, T.; Orda, J.; Skorupinska, J. Use of active substances of plant origin in chicken diets based on maize and locally grown cereals. *Br. Poult. Sci.* **2005**, *46*, 485–493. [CrossRef] [PubMed]
- Pirgozliev, V.; Mansbridge, S.C.; Rose, S.P.; Lillehoj, H.S.; Bravo, D. Immune modulation, growth performance, and nutrient retention in broiler chickens fed a blend of phytochemical feed additives. *Poult. Sci.* **2019**, *98*, 3443–3449. [CrossRef]
- Hassan, F.U.; Arshad, M.A.; Ebeid, H.M.; Rehman, M.S.; Khan, M.S.; Shahid, S.; Yang, C. Phytochemical Additives Can Modulate Rumen Microbiome to Mediate Fermentation Kinetics and Methanogenesis Through Exploiting Diet-Microbe Interaction. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7*, 575801. [CrossRef] [PubMed]
- Somani, S.J.; Modi, K.P.; Majumdar, A.S.; Sadarani, B.N. Phytochemicals and their potential usefulness in inflammatory bowel disease. *Phytother. Res.* **2015**, *29*, 339–350. [CrossRef]
- Sorlozano-Puerto, A.; Albetuz-Crespo, M.; Lopez-Machado, I.; Ariza-Romero, J.J.; Banos-Arjona, A.; Exposito-Ruiz, M.; Gutierrez-Fernandez, J. In Vitro Antibacterial Activity of Propyl-Propane-Thiosulfinate and Propyl-Propane-Thiosulfonate Derived from *Allium* spp. against Gram-Negative and Gram-Positive Multidrug-Resistant Bacteria Isolated from Human Samples. *Biomed Res. Int.* **2018**, *2018*, 7861207. [CrossRef]
- Subramanian, M.S.; Nandagopal, M.S.; Amin Nordin, S.; Thilakavathy, K.; Joseph, N. Prevaling Knowledge on the Bioavailability and Biological Activities of Sulphur Compounds from Alliums: A Potential Drug Candidate. *Molecules* **2020**, *25*, 4111. [CrossRef]
- Abad, P.; Arroyo-Marzanares, N.; Rivas-Montoya, E.; Ochando-Pulido, J.M.; Guillamon, E.; García-Campaña, A.M.; Martínez-Ferez, A.; Plaizier, J. Effects of different vehicularization strategies for the allium derivative propyl propane thiosulfonate during dynamic simulation of the pig gastrointestinal tract. *Can. J. Anim. Sci.* **2019**, *99*, 244–253. [CrossRef]

25. Kim, D.K.; Lillehoj, H.S.; Lee, S.H.; Lillehoj, E.P.; Bravo, D. Improved resistance to *Eimeria acervulina* infection in chickens due to dietary supplementation with garlic metabolites. *Br. J. Nutr.* **2013**, *109*, 76–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Peinado, M.J.; Ruiz, R.; Echavarrí, A.; Rubio, L.A. Garlic derivative propyl propane thiosulfonate is effective against broiler enteropathogens in vivo. *Poult. Sci.* **2012**, *91*, 2148–2157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Peinado, M.J.; Ruiz, R.; Echavarrí, A.; Aranda-Olmedo, I.; Rubio, L.A. Garlic derivative PTS-O modulates intestinal microbiota composition and improves digestibility in growing broiler chickens. *Anim. Feed. Sci. Technol.* **2013**, *181*, 87–92. [[CrossRef](#)]
28. Ruiz, R.; Garcia, M.P.; Lara, A.; Rubio, L.A. Garlic derivatives (PTS and PTS-O) differently affect the ecology of swine faecal microbiota in vitro. *Vet. Microbiol.* **2010**, *144*, 110–117. [[CrossRef](#)]
29. Smeets, N.; Nuyens, E.; Van Campenhout, L.; Delezie, E.; Pannecouque, J.; Niewold, T. Relationship between wheat characteristics and nutrient digestibility in broilers: Comparison between total collection and marker (titanium dioxide) technique. *Poult. Sci.* **2015**, *94*, 1584–1591. [[CrossRef](#)]
30. Hernandez, F.; Madrid, J.; Garcia, V.; Orengo, J.; Megias, M.D. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poult. Sci.* **2004**, *83*, 169–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Pawliszyn, J. *Handbook of Soli Phase Microextraction*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands; University of Waterloo: Waterloo, ON, Canada, 2012. [[CrossRef](#)]
32. Short, F.J.; Gorton, P.; Wisema, J.; Boorman, K.N. Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. *Anim. Feed. Sci. Technol.* **1996**, *59*, 215–221. [[CrossRef](#)]
33. Anad, A.A.; Mannner, K.; Wendler, K.R.; Neumann, K.; Zentek, J. Effects of a phytogetic feed additive on growth performance and ileal nutrient digestibility in broiler chickens. *Poult. Sci.* **2011**, *90*, 2811–2816. [[CrossRef](#)]
34. Kim, E.; Barta, J.R.; Lambert, W.; Kiarie, E.G. Standardized ileal digestibility of amino acids in broiler chickens fed single or mixture of feed ingredients-based diets with or without *Eimeria* challenge. *Poult. Sci.* **2022**, *101*, 101839. [[CrossRef](#)]
35. AOAC. Official Method 994.12 Amino Acids in Feeds. Performic Oxidation with Acid Hydrolysis—Sodium Metabisulfite Method. First Action 1994 Final Action 1997. *Off. Method Anal. Anim. Feed.* **2005**, *4*, 9–19.
36. AOAC. Official Method 965.17 Phosphorus in Animal Feed and Pet Food. Photometric Method. First Action 1965 Final Action 1966. *Off. Method Anal. Anim. Feed.* **2005**, *4*, 61.
37. ASTM D2015-96; Standard Test Method for Gross Calorific Value of Solid Fuel by the Adiabatic Bomb Calorimeter. American Society for Testing and Materials: West Conshohocken, PA, USA, 2015; 40 CFR 60.45(f)(5)(ii). pp. 253–261.
38. Mariscal, G.; Reis de Souza, T.C.; Parra, J. Apparent ileal digestibility of protein and aminoacids of canola meal in recently weaned piglets. *Rev. MVZ Córdoba* **2009**, *14*, 1544–1553.
39. SAS Institute. *JMP® Version 15*; SAS Institute: Cary, NC, USA, 2019.
40. Windisch, W.; Schedle, K.; Pflitzner, C.; Kroismayr, A. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *J. Anim. Sci.* **2008**, *86*, E140–E148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Mohammadi Gheisar, M.; Kim, I.H. Phytobiotics in poultry and swine nutrition—A review. *Ital. J. Anim. Sci.* **2017**, *17*, 92–99. [[CrossRef](#)]
42. Darmani kahi, H.; Rezaee, E.; Faridi, A.; France, J.; Mottaghtalab, M.; Kebreab, E. Application of the law of diminishing returns for partitioning metabolizable energy and crude protein intake between maintenance and growth in growing male and female broiler breeder pullets. *J. Agric. Sci.* **2011**, *149*, 385–394. [[CrossRef](#)]
43. Ullah, Z.; Ahmed, G.; Nisa, M.U.; Sarwar, M. Standardized Ileal Amino Acid Digestibility of Commonly Used Feed Ingredients in Growing Broilers. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* **2016**, *29*, 1322–1330. [[CrossRef](#)]
44. Brzóška, F.; Śliwiński, B.; Michalik-Rutkowska, O.; Śliwa, J. The Effect of Garlic (*Allium Sativum* L.) on Growth Performance, Mortality Rate, Meat and Blood Parameters in Broilers. *Ann. Anim. Sci.* **2015**, *15*, 961–975. [[CrossRef](#)]
45. Li, X.; Zhu, T.; He, Y.; Wu, X.; Zhu, Y.; Yang, D. Assessment of eutrophication and nitrogen and phosphorus carrying capacity before and after removing pen culture (2013–2018) in Lake Changhu, China. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2022**, *29*, 5674–5686. [[CrossRef](#)]
46. Ur Rahman, S.; Khan, S.; Chand, N.; Sadique, U.; Khan, R.U. In vivo effects of *Allium cepa* L. on the selected gut microflora and intestinal histomorphology in broiler. *Acta Histochem.* **2017**, *119*, 446–450. [[CrossRef](#)]
47. Kim, G.B.; Seo, Y.M.; Kim, C.H.; Paik, I.K. Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. *Poult. Sci.* **2011**, *90*, 75–82. [[CrossRef](#)]
48. Pelicano, E.R.; Souza, P.A.; Souza, H.B.A.; Figueiredo, D.F.; Boiago, M.M.; Carvalho, S.R.; Bordon, V.F. Intestinal Mucosa Development in Broiler Chickens Fed Natural Growth Promoters. *Braz. J. Poult. Sci.* **2005**, *7*, 221–229. [[CrossRef](#)]
49. El-Saber Batiha, G.; Beshbishy, A.M.; Wasef, L.G.; Elewa, Y.H.A.; Al-Sagan, A.A.; Abd El-Hack, M.E.; Taha, A.E.; Abd-Elhakim, Y.M.; Devkota, H.P. Chemical Constituents and Pharmacological Activities of Garlic (*Allium sativum* L.): A Review. *Nutrients* **2020**, *12*, 872. [[CrossRef](#)]
50. Kothari, D.; Lee, W.D.; Niu, K.M.; Kim, S.K. The Genus *Allium* as Poultry Feed Additive: A Review. *Animals* **2019**, *9*, 1032. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Varmaghany, S.; Karimi Torshizi, M.A.; Rahimi, S.; Lotfollahian, H.; Hassarazadeh, M. The effects of increasing levels of dietary garlic bulb on growth performance, systolic blood pressure, hematology, and ascites syndrome in broiler chickens. *Poult. Sci.* **2015**, *94*, 1812–1820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

52. Chen, Y.J.; Kim, L.H.; Cho, J.H.; Yoo, J.S.; Wang, Q.; Wang, Y.; Huang, Y. Evaluation of dietary l-carnitine or garlic powder on growth performance, dry matter and nitrogen digestibilities, blood profiles and meat quality in finishing pigs. *Anim. Feed. Sci. Technol.* **2008**, *141*, 141–152. [[CrossRef](#)]
53. Tahir, M.; Chuzaem, S.; Widodo, E.; Hafisah. The Performance of Broilers Given Eugenol of Clove Leaf Essential Oil as a Feed Additive. *Russ. J. Agric. Socio-Econ. Sci.* **2019**, *95*, 200–205. [[CrossRef](#)]
54. Choi, L.H.; Park, W.Y.; Kim, Y.J. Effects of dietary garlic powder and (alpha)-tocopherol supplementation on performance, serum cholesterol levels, and meat quality of chicken. *Poult. Sci.* **2010**, *89*, 1724–1731. [[CrossRef](#)]
55. Dey, A.; Samanta, A.R. Effect of feeding garlic (*Allium sativum* Linn.) as a growth promoter in broilers. *Indian J. Anim. Health* **1993**, *32*, 17–19.
56. Javandel, F.; Navidshad, B.; Seifdavati, J.; Pourrahimi, G.H.; Banyaghoub, S. The favorite dosage of garlic meal as a feed additive in broiler chicken ratios. *Pak. J. Biol. Sci.* **2008**, *11*, 1746–1749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

6.2. **EXPERIMENTO 2.***Efecto de un extracto encapsulado de Aliáceas en el desempeño productivo, salud y microbiota intestinales en pollos de engorda desafiados con Eimeria spp.*

Los derechos de autor © aparecen en el ángulo inferior izquierdo de la primera página del artículo “Effect of Alliacea encapsulated extract on growth performance, gut health, and intestinal microbiota in broiler chickens challenged with *Eimeria* spp.”

Effect of an Alliaceae Encapsulated Extract on Growth Performance, Gut Health, and Intestinal Microbiota in Broiler Chickens Challenged with *Eimeria* spp. © 2023 by Gonzalo Villar-Patiño is licensed under Attribution-ShareAlike 4.0 International. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>



Article

Effect of an *Alliaceae* Encapsulated Extract on Growth Performance, Gut Health, and Intestinal Microbiota in Broiler Chickens Challenged with *Eimeria* spp.

Gonzalo Villar-Patiño ^{1,2}, María del Carmen Camacho-Rea ^{3,*}, Myrna Elena Olvera-García ², Julio César Baltazar-Vázquez ⁴, Gabriela Gómez-Verduzco ⁵, Guillermo Téllez ⁶, Aurora Labastida ⁷ and Aurora Hilda Ramírez-Pérez ^{5,*}

- ¹ Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud y de la Producción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Coyoacán, Ciudad de México 04510, Mexico; gvillar@gponutec.com
 - ² Grupo Nutec, Avenida de las Fuentes No. 14, Parque Industrial Bernardo Quintana, El Marqués 76246, Querétaro, Mexico; molvera@gponutec.com
 - ³ Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, Departamento de Nutrición Animal, Tlalpan, Ciudad de México 14080, Mexico
 - ⁴ Specialized Animal Nutrition Research Network, Grupo Nutec, La Valla, San Juan del Río 76814, Querétaro, Mexico; jbaltazar@gponutec.com
 - ⁵ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Coyoacán, Ciudad de México 04510, Mexico; gagove@unam.mx
 - ⁶ Department of Poultry Science, University of Arkansas, Fayetteville, AR 72701, USA; gtellez@uark.edu
 - ⁷ OMICs Analysis, Camino a Xilotepec No. 45, Tepoztlán 62520, Morelos, Mexico; a.labastida@omicanalysis.mx
- * Correspondence: carmen.camachor@incmnsz.mx (M.d.C.C.-R.); rperera@unam.mx (A.H.R.-P); Tel: +52-55-1234-6028 (M.d.C.C.-R.); +52-55-5622-5906 (A.H.R.-P)



Citation: Villar-Patiño, G.; Camacho-Rea, M.d.C.; Olvera-García, M.E.; Baltazar-Vázquez, J.C.; Gómez-Verduzco, G.; Téllez, G.; Labastida, A.; Ramírez-Pérez, A.H. Effect of an *Alliaceae* Encapsulated Extract on Growth Performance, Gut Health, and Intestinal Microbiota in Broiler Chickens Challenged with *Eimeria* spp. *Animals* **2023**, *13*, 3884. <https://doi.org/10.3390/ani13243884>

Academic Editor: Kenneth Bufando

Received: 25 October 2023

Revised: 13 December 2023

Accepted: 15 December 2023

Published: 18 December 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Coccidiosis is caused by an intracellular parasite that damages the intestinal integrity, negatively affecting the digestion and absorption of nutrients and consequently worsening weight gain, feed efficiency, and pigmentation of birds, even causing mortality. Therefore, it has a negative impact on the economy of the poultry industry. Currently, the disease is mainly treated by using anticoccidials drugs added to the diet. The drug resistance, as well as the residue of drugs in the meat, has prompted the development of natural alternatives to combat coccidiosis. The purpose of this research was to determine whether an *Alliaceae* encapsulated extract added to the broiler chickens diet decreased the number of oocysts excreted in feces and the harm caused to the intestinal mucosa, consequently improving the productive performance of broiler chickens challenged with *Eimeria* spp. Under our experimental conditions, both the inclusion of *Alliaceae* extract, as well as the use of conventional anticoccidials (nicarbazin/narasin/salinomycin), diminished the detrimental effect of *Eimeria* spp. Moreover, the *Alliaceae* extract favored the abundance of acid butyric bacteria (*Ruminococcus* spp. and *Intestinimonas* spp.) in the cecum, related to intestinal health. Based on the current findings, the *Alliaceae* extract could be a natural additive used to lessen the effects of coccidiosis infections.

Abstract: This study analyzed the effects of an *Alliaceae* encapsulated extract (AE-e) on daily gain (ADG), feed intake (ADFI), feed conversion ratio (FCR), oocysts per gram of feces (OPG), intestinal lesion (LS), and microbiota composition in broilers challenged with *Eimeria* spp. A total of 4800 one day Cobb-500 were allotted into 10 treatment groups with 12 replicates of 40 birds in a 2 × 4 + 2 factorial arrangement. The first factor was non-challenged (NC) or challenged (C), the second was four levels of AE-e added in the basal diet, 0 (AE0), 250 (AE250), 500 (AE500), and 750 mg·kg⁻¹ (AE750), plus two ionophore controls, non-challenged (NC-Ion) and challenged (C-Ion). No interactions were observed between factors (NC0, NC250, NC500, NC750, C0, C250, C500, and C750), while C-Ion improved FCR at 21 d. The challenge affected negatively ADG and FCR and promoted enteropathogens in cecum. AE750 improved FCR in the finisher and cumulative phases, while C-Ion had fewer total

OPG than C0 and C250. Likewise, at 21d, C250, C500, and C-Ion had fewer LS than C0, while at 28 d, C750 showed lower than C-Ion. In the cecum microbiota, C500 had more *Ruminococcus*, *Firmicutes b*, and *Intestinimonas* than C-Ion. In summary, AE-e showed beneficial results in broilers infected with *Eimeria* spp.

Keywords: broiler chickens; coccidiosis; *Alliaceae* extract; ionophore; microbiota intestinal

1. Introduction

Currently, coccidiosis disease continues to be one of the most serious problems in the commercial broiler poultry industry, resulting in great economic loss all over the world [1]. *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima*, and *Eimeria tenella* are the main species that cause disease in broiler chickens, impairing both intestinal function and growth performance [2]. To date, coccidiosis prevention has been through the addition of synthetic anticoccidials such as nicarbazin, decoquinate, and zoalene, as well as ionophores [3] such as monensin, lasalocid, salinomycin, narasin, etc., to either the poultry diet or drinking water, or the use of vaccines [4]. However, *Eimeria* spp. has developed drug resistance, causing a loss of effectiveness in the anticoccidials [5]. In addition, there is a global concern about drug resistance and the presence of residual drugs in meat [6] that has prompted the study and development of natural alternatives to prevent or control coccidiosis [7], such as phytochemicals, which are a suitable alternative due to their favorable effects against *Eimeria* spp. [8].

Several works have demonstrated that extracts and the essential oil of *Allium cepa* and *Allium sativum* improved the average daily feed intake (ADFI), average daily gain (ADG), and feed conversion ratio (FCR), as well as intestinal health and carcass quality in broiler chickens [9–11]. Likewise, blends of the genus *Allium* with oregano essential oil and eugenol [12], as well as organic acids [8,13], have shown benefits in broiler performance and health. The genus *Allium* has different sulfur compounds that have been studied as additives in animal nutrition [14]. These compounds are conformed by sulfur atoms attached to a cyanate group in cyclic or non-cyclic forms [15]. The most studied are the sulfoxides *s*-methyl-L-cysteine (methionine), *s*-allyl-L-cysteine (alliin), *s*-propenyl-L-cysteine (isoalliin), and *s*-propyl-L-cysteine (propiin). Propyl propane thiosulfinate (PTS) and propyl propane thiosulfonate (PTSO) are derived from the natural degradation of propiin [16,17]. Unlike other sulfur compounds from the genus *Allium*, PTSO is chemically stable but is insoluble in water. For this reason, it should be provided with a water-soluble carrier to increase its availability and absorption [18,19]. In addition, PTS and PTSO have shown to reduce the viability of *E. acervulina* sporozoites, improving the innate immune response [20], and inhibit the sporulation of *E. tenella* [21], and they are able to promote the growth of beneficial bacteria and decrease intestinal pathobionts [22] in broiler chickens. Recently, Aguinaga-Casas, et al. [19] conducted a study in vitro that showed that PTSO inhibit the capability of *E. acervulina* sporozoites to penetrate Madin-Darby bovine kidney cells (MDBK cells), concluding that PTSO is a promising alternative to coccidiosis treatment. The *Allium* spp. could be used as an alternative to anticoccidials in broiler production due to its proven benefits. Nevertheless, it is necessary to carry out more studies to understand the mechanism by which they exert their favorable effects, as well as determine the appropriate inclusion level in the poultry diet and the period of use to enhance broiler performance [23].

Based on the above information, we hypothesize that an *Alliaceae* (*A. cepa* and *A. sativum*) encapsulated extract (AE-e) used as a feed additive decreases the oocysts per gram in feces (OPG), reduces the intestinal lesion score (LS), and improves productive performance, as well as modulates positively the intestinal microbiota in *Eimeria* challenged birds. Therefore, the aim of this study was to examine the effects of increasing levels of AE-e

on ADG, ADFI, FCR, OPG, IS, and intestinal microbiota composition in broiler chickens challenged with a mixture of *Eimeria* spp.

2. Materials and Methods

2.1. Ethical Standard

The present study was approved on 5 October 2020, by the Animal Welfare and Experimentation Ethics Committee of the National Autonomous University of México SICUAE-DC-2020/3-6 in compliance with the Mexican Official Norm NOM-062-ZOO-1999.

2.2. Housing, Animals and Experimental Design

A total of 4800 one-day-old Cobb-500 broiler chickens were housed in 1204 m² pens separated by wire mesh partitions and new wood shaving litter throughout the period of study of 49 d. The facility temperature was set as 30 °C during the first week using thermostatically controlled propane gas heaters, reducing 2.5 °C each week. After the fourth week, the temperature was controlled through curtains and kept between 18–21 °C. The first 4 d after reception, the chickens had access to 23 h of light; after that, a natural photoperiod was maintained throughout the study. The birds were assigned in a completely randomized experimental design with a 2 × 4 + 2 factorial arrangement. One factor was the challenge level, formed by a non-challenged group (NC) and a challenged group (C) with *Eimeria* spp. The second was 4 levels of AE-e (0, 250, 500, and 750 mg AE-e per each kg of feed). In addition, two ionophore controls, C-Ion and NC-Ion, were used to contrast the challenged and non-challenged AE-e treatments, respectively. The experimental unit was the pen. To prevent cross contamination, the C and NC birds were housed in separate but identical buildings.

2.3. Alliaceae Encapsulated Extract Supplementation

We used a concentrated liquid commercial *Alliaceae* extract (Garlicon™; DOMCA S.A.U., Granada, Spain), which has shown positive effects on bird productivity [20,24,25]. It was encapsulated into a dextrin–lecithin matrix and validated by the presence of PTSO, which has a concentration of 12 g·kg⁻¹, as determined by gas chromatography–mass spectrometry (Gas chromatograph model 7890A Agilent Technologies Inc., coupled to a simple quadrupole mass detector model 5975C Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). The retention time of the chromatography peak was indicated for the PTSO according to the databases of the NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library, version 1.7 (Gaithersburg, MD, USA). The analysis was carried out in the laboratory of the Center for Research in Applied Sciences and Advanced Technology of the National Polytechnic Institute (IPN, Querétaro, Mexico).

2.4. Diets and Experimental Groups

A corn–soybean meal basal diet was formulated to meet the nutritional specifications for the Cobb-500 lineage™ (Table 1). The basal diet was split into five portions to be mixed with the experimental doses of AE-e or ionophore and then were pelleted at 80 °C for 30 s. The broiler chickens were on two phases of feeding, a starter phase (1–21 day of age) and a finisher phase (22–49 day of age). The feed was restricted from 15:00 h to 08:00 h to avoid ascites syndrome, and the water was provided ad libitum.

The birds were assigned to either a NC or C group and feed with the basal diet containing 4 different levels of AE-e as follows: basal diet without AE-e (AE0); basal diet with added 250 mg·kg⁻¹ of AE-e (AE250); basal diet with added 500 mg·kg⁻¹ of AE-e (AE500); and basal diet with added 750 mg·kg⁻¹ of AE-e (AE750). Two positive control treatments, non-challenged ionophore control (NC-Ion) and a challenged ionophore control (C-Ion), both formed by a basal diet with 50 ppm of nicarbazin and 50 ppm of narasin added for the starter phase and 60 ppm of salinomycin for the finisher phase, summarizing a total of 10 treatments (NC0, NC250, NC500, NC750, C0, C250, C500, C750, NC-Ion, C-Ion) with 12 replicates of 40 birds for each one.

Table 1. Ingredients ($\text{kg}\cdot\text{t}^{-1}$ of feed) and calculated chemical composition (% as fed) and metabolizable energy (EM, $\text{kcal}\cdot\text{kg}^{-1}$) in the basal diets.

Ingredient	Starter (0–21 d)	Finisher (22–49 d)
Corn	513.9	552.5
Soybean meal	406.0	360.0
Soybean oil	40.5	51.0
Limestone	14.7	13.6
Calcium orthophosphate	9.1	7.0
Sodium carbonate	4.9	4.7
Methionine DL	3.6	3.2
Xanthophylls		2.4
Salt	2.0	1.6
L-Lysine HCL	2.2	1.5
Threonine	1.1	0.8
Vitamin-and mineral trace Premix ¹	0.9	0.8
Betaine anhydrous	0.6	0.4
L-valine	0.2	
Biocholine	0.2	0.17
Tryptophan		0.16
Phytase 5000	0.1	0.12
Calculated nutrient levels (%)		
Humidity	11.61	11.66
EM (kcal/kg)	3156	3245
Crude protein CP	23.90	21.60
Ether extract	6.21	7.34
Ashes	5.83	5.27
Crude fiber	2.34	2.47
Total phosphorous	0.59	0.53
Total calcium	1.00	0.90
Sodium	0.23	0.21
Lysine	1.50	1.29
Xanthophylls	0.0008	0.0080

¹ Content per kilogram: vitamin A (retinol acetate), 12,000 international units (IU); vitamin D3, 5000 IU; vitamin E (DL- α -tocopherol acetate), 50 IU; vitamin K, 3 mg; thiamine, 3 mg; riboflavin, 9 mg; pantothenic acid, 15 mg; pyridoxine, 4 mg; biotin, 0.2 mg; folic acid, 2 mg; vitamin B12, 0.02 mg; manganese, 100 mg; zinc 100 mg; iron, 40 mg; copper, 15 mg; iodine, 1 mg; selenium, and 0.35 mg.

2.5. Productive Performance

Each pen was monitored for body weight (BW), weight gain (WG), and feed intake (FI) at 0, 21, and 49 d of age. On the same day as the event took place, we recorded the age and weight of dead birds to determine (a) ADG: [(mean final BW of live birds in the pen) – (mean initial BW of all birds in that pen)]/days of testing. (b) ADFI: (total feed consumed in a pen)/(birds alive \times days on test in the pen + days dead birds on test in that pen). (c) FCR: (total feed consumption in a pen)/(WG of birds alive + WG of dead birds in the same pen) [26].

2.6. Eimeria Challenge

At 12 d of age, the broiler chickens from the challenged group (C) were inoculated directly into the crop with 0.5 mL of a mixture of sporulated oocysts of *E. acervulina* 1×10^5 , *E. maxima* 2×10^4 , and *E. tenella* 2×10^4 using sterile plastic syringes, while the birds from the non-challenged group (NC) received a sham 0.5 mL of distilled water.

The *Eimeria* mixture was obtained from a non-governmental laboratory of parasitology, Morelos, México, and it was assessed by counting the oocysts sporulated from the different species of *Eimeria* at the National Autonomous University of México (UNAM) and by PCR Sanger sequencing at the Faculty of Chemistry, Querétaro University, México (UAQ).

2.7. *Eimeria* Oocysts Count

On d 9, 16, and 23 post-inoculation (p.i.), approximately 10 g of fresh fecal material was collected from each pen and mixed thoroughly in a plastic bag and kept at 4 °C until the total count of oocysts. Five grams of each sample was homogenized in a saturated NaCl solution (400 g·L⁻¹) and filtered through a 300-mesh sieve. The filtrate was centrifuged at 800 × g for 2 min and an aliquot of the supernatant was poured into a Mc Master Chamber and counted at 10× magnification on a compound microscope following the technique described by Long, et al. [27]. The morphological characteristics of the sporulated oocysts were used to identify *E. acervulina*, *E. maxima*, and *E. tenella*; the number of oocysts was expressed as OPG. The total OPG is the sum of OPG for all three species.

2.8. Intestinal Lesion Score (LS)

The LS in the duodenum, jejunum, and cecum were evaluated at 9- and 16-day p.i., twenty-four birds from each treatment were randomly selected and humanely killed by cervical dislocation [28,29]. The gastrointestinal tract was removed and opened; the scores for macroscopic lesions for *E. acervulina*, *E. maxima*, and *E. tenella* were determined according to the scale of Johnson and Reid [30]. A score of “0” represented no visual lesions, “1” was minimal lesions, “2” was moderate lesions, “3” was severe lesions, and “4” was extremely severe lesions.

2.9. Anticoccidial Index (ACI)

The relative ratio weight gain (rBWG), survival rate (SR), total mean lesion score (TMLS), and OPG value are necessary to calculate the anticoccidial index (ACI) and are recognized as good indicators of the efficacy of the anticoccidial compounds. The ACI was calculated for each group according to the following equation proposed by Merk, et al. [31]:

$$ACI = (rBWG + SR) \times 100 - (TMLS \times 10 + OPG \text{ value})$$

The variables were calculated as follows:

- rBWG: BWG rate of the challenged unmedicated control or drug treated group/BWG rate of unchallenged unmedicated control group × 100.
- BWG rate: (Final BW – initial BW)/initial BW × 100.
- SR: Number of final birds alive/ number of total initial birds × 100.
- TMLS: Sum of the LS caused by all the *Eimeria* spp.
- OPG value: OPG in unchallenged unmedicated control or challenged drug-treated group/OPG in infected/unmedicated control group × 100 [32].

2.10. Intestinal Microbiota Samples

At 21 d of age (9 d p.i.), 6 chickens from 5 treatments, NC0, C0, NC500, C500, and C-Ion, were randomly selected and sacrificed by the manual cervical dislocation method [29,33]. The gastrointestinal tract was dissected, the ileum and cecum contents were scraped carefully and collected in cryogenic vials, snap frozen in liquid nitrogen, and stored at –80 °C until the microbiota composition analysis [34,35].

2.11. DNA Extraction, 16S rRNA Gene Amplification, and Library Preparation for Sequencing

The bacterial DNA from the ileal and cecal contents was extracted using the Zymo-BIOMICS™ DNA Miniprep kit (D4300 Zymo Research, Irvine, CA, USA), according to the manufacturer recommendations, it was quantified by fluorometry using Qubit chemistry (Invitrogen, Waltham, MA, USA), while its integrity was assessed by spectrometry (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The libraries were made following the two-step polymerase chain reaction (PCR) protocol suggested by Illumina (Illumina Part# 15044223 Rev.B, San Diego, CA, USA) to sequence a single segment comprising the 16S rRNA V3-V4 region [36]. The libraries were quantified by fluorometry, pooled at 4nM with 10% PhiX sequencing control, and sequenced using the Illumina MiSeq platform

to obtain 300 paired-end reads following the manufacturer's instructions (Illumina, San Diego, CA, USA).

2.12. Bioinformatic Analysis

The paired-end raw reads were analyzed with Cutadapt v1.15 to eliminate any traces of 16S-rRNA amplification primers or Illumina adapter sequences and then scanned with Trimmomatic v36 [37] to filter out the lower quality reads. The forward and reverse reads of each pair were then overlapped into single fragments using FLASH v1.2.11 software, employing an expected fragment length of 409 ± 20 bp and an expected read length of 279 bp and were further filtered with DADA2 (included in the QIIME2 v2020.8 suite) [38]; to eliminate reads where 2 or more sequencing errors were expected, groups of reads were produced by experimental errors (noise removal) and chimeric fragments.

To assign a taxonomic classification to the pre-processed sequences, we used the naive Bayes classifier [39], as implemented in the QIIME2 suite [38]. The classifier was trained with the annotations of the SILVA 138 ribosomal reference database [40] using the sequences grouped to a similarity of 99%.

The Shannon and Simpson indexes, as well as the total OTU counts, were obtained for each sample to study the intestinal microbial α -diversity. β -diversity was assessed by measuring the Bray–Curtis dissimilarity of each pair of samples, followed by nonmetric multi-dimensional scaling (NMDS) to observe the clustering of the different sample groups. The α and β -diversity profiles were visualized through box-plots and NMDS scaling plots [41]. To obtain the relative abundance of the OTUs, the number of reads per OTU was normalized by library size. Only the abundance changes in genus with a significance $p \leq 0.05$ were represented in a heatmap.

2.13. Statistical Analyses

The statistical analyses were performed using the JMP statistical software v 17.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) and R version 4.0.2. The data normality and variance homogeneity among groups were tested using the Shapiro–Wilk and Levene's tests, respectively. The variables with non-normal distributions were analyzed by nonparametric statistics. The significance level was set at $p \leq 0.05$, and a trend was set between $p > 0.05$ and ≤ 0.10 .

For the analysis of productive performance, the initial BW was included as a covariate. The ADFI, ADG, and FCR were analyzed by 2-way ANOVA. The ACI was analyzed by one-way ANOVA. Post hoc Tukey tests were performed. The experimental design considered two controls with ionophores to contrast the treatments. Contrast A was NC-Ion vs. NC0, NC250, NC500, and NC750; contrast B was C-Ion vs. C0, C250, C500, and C750; and contrast C was NC-Ion vs. C-Ion. Additionally, the AE-e factor was analyzed to determine if the effects of different doses of AE-e had a linear trend. Furthermore, AE-e treatments included an analysis of the polynomial orthogonal contrast trend in the variable ACI.

Since there were no detected oocyst or coccidia lesions in nonchallenged birds, the OPG and LS were analyzed only in the challenged birds using the Kruskal–Wallis test and, as post hoc, the Steel–Dwass test, the medians, and quantiles q_{25} and q_{75} were reported. Correlations were carried out between ADG, FCR, OPG, and LS using Spearman Rho analysis.

The α -diversity changes among groups were assessed with the Kruskal–Wallis test, while the β -diversity was assessed by the NMDS and PerMANOVA tests to identify significant differences in the clustering position of the groups. To obtain the diversity measures and the corresponding statistical tests, we used the R phyloseq v1.38 package [41]. We used the DESeq2 package to estimate the differential abundance of specific clades between group sample pairs, using the Wald test and adjusting the p -values through the Benjamini–Hochberg multiple sampling correction.

3. Results

3.1. Productive Performance

The following tables provide comprehensive data on the interactions between the *Eimeria* challenge and AE-e supplementation (Table 2) and subsequently present independently the effects of the *Eimeria* challenge (Table 3) and the effects of AE-e supplementation (Table 4) on ADG, ADFI, and FCR. No significant differences ($p > 0.05$) were found in the interaction of factors on ADG, ADFI, and FCR in starter and finisher phases or in the cumulative period of study (Table 2). As well as the orthogonal contrast (contrast A), NC-Ion vs. NC0, NC250, NC500, and NC750 did not show differences in ADFI, ADG, and FCR ($p > 0.05$) in both growing phases. On the other hand, the comparison of contrast B, C-Ion vs. C0, C250, C500 and C750, did not show differences in ADFI and ADG throughout the study period ($p > 0.05$). However, at 21 d, C-Ion showed lower FCR, 1.30 vs. 1.39, respectively, ($p < 0.01$) and a trend ($p = 0.07$) to improve ADG. There was no effect on FCR in the finisher or cumulative period ($p > 0.05$). Finally, in contrast C, NC-Ion vs. C-Ion, there was a trend in the starter phase in which the challenged group (C-Ion) had lower ADG ($p = 0.06$) and higher FCR ($p = 0.07$) than NC-Ion.

Table 2. Initial body weight (BW), average daily gain (ADG), average daily feed intake (ADFI), and feed conversion ratio (FCR) of broilers chickens fed a corn-soybean diet supplemented with different doses of *Alliaceae* encapsulated extract (AE-e)¹ or anticoccidial drugs (Ion)² under challenge with *Eimeria* spp.³.

	Non-Challenged (NC)				Challenged (C)				SEM			Contrasts ⁴			
	NC0	NC250	NC500	NC750	C0	C250	C500	C750	p val	NC-Ion	C-Ion	p val			
												A	B	C	
BW 0 d	42.3	41.9	41.7	41.9	42.1	42.3	42.2	42.0	0.21	0.30	42.0	42.2	0.71	0.69	0.53
Starter phase (1–21 d)															
ADG (g)	48.2	47.0	47.4	47.5	41.3	41.7	43.5	39.9	1.09	0.33	46.5	43.7	0.41	0.07	0.06
ADFI (g)	58.4	58.1	58.1	58.2	58.7	59.9	58.7	57.2	0.81	0.36	58.1	57.3	0.90	0.15	0.47
FCR	1.21	1.24	1.22	1.21	1.41	1.43	1.34	1.41	0.03	0.47	1.23	1.30	0.75	0.01	0.07
Finisher phase (22–49 d)															
ADG (g)	79.5	81.5	84.0	82.4	78.2	80.6	82.2	82.7	1.99	0.96	84.1	82.6	0.29	0.42	0.58
ADFI (g)	156.6	159.1	158.6	149.6	157.0	156.2	151.9	151.7	3.95	0.70	150.9	153.1	0.20	0.87	0.67
FCR	2.16	2.06	2.12	2.01	2.23	2.08	1.97	1.93	0.08	0.47	1.99	2.00	0.21	0.58	0.92
Cumulative study (1–49 d)															
ADG (g)	66.1	66.7	68.3	67.4	62.4	63.9	65.6	64.4	1.10	0.97	68.0	66.0	0.46	0.11	0.17
ADFI (g)	114.5	113.8	115.5	110.5	114.8	115.0	112.0	111.2	2.32	0.80	111.1	112.1	0.20	0.70	0.76
FCR	1.77	1.75	1.75	1.70	1.91	1.84	1.74	1.76	0.03	0.22	1.69	1.74	0.17	0.19	0.29

¹ NC0, Non-challenged + basal diet; NC250, Non-challenged + basal diet + 250 mg·kg⁻¹ AE-e; NC500, Non-challenged + basal diet + 500 mg·kg⁻¹ AE-e; NC750, Non-challenged + basal diet + 750 mg·kg⁻¹ AE-e; C0, Challenged + basal diet; C250, Challenged + basal diet + 250 mg·kg⁻¹ AE-e; C500, Challenged + basal diet + 500 mg·kg⁻¹ AE-e; C750, Challenged + basal diet + 750 mg·kg⁻¹ AE-e; ² NC-Ion, Non-challenged + basal diet + 50 ppm nicarbazin–50 ppm narasin 1–21 d/ salinomycin 60 ppm 22–49 d. C-Ion, Challenged + basal diet + 50 ppm nicarbazin–50 ppm narasin 1–21 d/ salinomycin 60 ppm 22–49 d. ³ Challenge with *E. acervulina* 1×10^5 , *E. maxima* 2×10^4 , and *E. tenella* 2×10^4 . ⁴ Contrast A: NC-Ion vs. NC0, NC250, NC500, and NC750; Contrast B: C-Ion vs. C0, C250, C500, and C750; Contrast C: NC-Ion vs. C-Ion.

At the starter phase, the challenge affected the productive performance. Broiler chickens from the challenged group (C) had a reduction of 12.4% in ADG compared to those from the non-challenged (NC) group ($p < 0.0001$); moreover, the FCR was also deteriorated by 12.8%, 1.40 vs. 1.22 ($p < 0.0001$), respectively. Despite not finding changes in the finisher phase ($p > 0.05$), the negative effect observed in the starter phase continued in the cumulative period, ADG ($p < 0.001$) and FCR ($p = 0.01$) in broiler chickens from C group compared to NC group. However, the ADFI was not affected by the challenge ($p > 0.05$; Table 3).

Table 3. Effects of the challenge with *Eimeria* spp. ¹ on average daily gain (ADG), average daily feed intake (ADFI), and feed conversion ratio (FCR) of broiler chickens fed a corn–soybean diet.

	Challenge Factor			
	NC	C	SEM	<i>p</i> Value
Body weight (0 d)	42.00	42.10	0.11	0.23
Starter phase				
ADG (g)	47.50 ^a	41.60 ^b	0.54	<0.001
ADFI (g)	58.20	58.60	0.40	0.44
FCR	1.22 ^a	1.40 ^b	0.01	<0.001
Finisher phase				
ADG (g)	81.80	80.90	0.99	0.53
ADFI (g)	156.00	154.20	1.97	0.52
FCR	2.09	2.05	0.04	0.51
Cumulative study				
ADG (g)	67.10 ^a	64.10 ^b	0.55	<0.001
ADFI (g)	114.10	113.20	1.17	0.61
FCR	1.74 ^a	1.81 ^b	0.02	0.01

^{ab} Means within rows not sharing a common superscript differ at the *p* value reported. ¹ NC Non-challenged; C, challenged with *E. acervulina* 1×10^5 , *E. maxima* 2×10^5 , and *E. tenella* 2×10^6 .

Table 4. Initial body weight (BW), average daily gain (ADG), average daily feed intake (ADFI), and feed conversion ratio (FCR) of broiler chickens fed a corn–soybean diet supplemented with different doses of *Alliaceae* encapsulated extract (AE-e) ¹.

	AE-e Factor					Linear Trend ²		
	AE0	AE250	AE500	AE750	SEM	<i>p</i> Value	<i>p</i> Value	R ²
BW 0 d	42.20	42.10	42.00	42.00	0.15	0.65		
Starter phase								
ADG (g)	44.80	44.40	45.54	43.70	0.77	0.41	0.61	0.002
ADFI (g)	58.60	59.00	58.40	57.70	0.57	0.45	0.38	0.008
FCR	1.31	1.34	1.28	1.31	0.02	0.23	0.82	0.005
Finisher phase								
ADG (g)	78.90	81.00	83.10	82.60	1.40	0.15	0.05	0.04
ADFI (g)	156.70	157.70	155.30	150.70	2.78	0.31	0.16	0.02
FCR	2.20 ^a	2.07 ^{ab}	2.05 ^{ab}	1.97 ^b	0.05	0.03	0.006	0.08
Cumulative study								
ADG (g)	64.20	65.30	67.00	65.90	0.78	0.10	0.14	0.02
ADFI (g)	114.70	115.40	113.80	110.80	1.64	0.23	0.13	0.02
FCR	1.84 ^a	1.79 ^{ab}	1.75 ^{ab}	1.73 ^b	0.03	0.01	0.004	0.08

^{ab} Means within rows not sharing a common superscript differ at *p* value reported. ¹ AE0, basal diet; AE250, basal diet + 250 mg·kg⁻¹ AE-e; AE500, basal diet + 500 mg·kg⁻¹ AE-e; AE750, basal diet + 750 mg·kg⁻¹ AE-e; ² Linear trend AE0, AE250, AE500, and AE750.

Table 4 shows that during the starter phase, the inclusion of AE-e did not influence performance ($p > 0.05$). Nevertheless, in the finisher phase, the FCR was better in AE750, 1.97 compared to AE0, 2.20 ($p = 0.03$). Moreover, in the cumulative period, AE750 continued to show better FCR, 1.73 regarding 1.84 from AE0 ($p = 0.01$); however, the AE250 and AE500 inclusion did not show a difference in FCR ($p > 0.05$). In addition, no significant differences in ADG and ADFI were observed between treatments during the study ($p > 0.05$); however, AE500 displayed a trend to improve ADG in the cumulative study ($p = 0.10$). On the other hand, a positive linear trend was observed in ADG ($p = 0.05$) and FCR ($p = 0.006$) in the finisher phase, as well as FCR in the cumulative period ($p = 0.004$).

3.2. Oocysts Shedding

Table 5 describes the effect of feed supplementation with AE-e or ionophores on the OPG of *Eimeria*-challenged broiler chickens (C0, C250, C500, C750, and C-Ion), because of the absence of OPG in non-challenged treatments, NC0, NC250, NC500, NC750, and

NC-Ion were omitted from analysis. The differences between treatments were observed at 9 d p.i., corresponding to 21 d of age. The higher OPG values of *E. acervulina* and *E. tenella* were observed in C0, 7.75 and 22.26-fold changes, respectively, regarding C-Ion ($p < 0.05$).

Table 5. Medians and ranges (Q25–Q75) of oocysts per gram of feces (OPG) in broiler chickens supplemented with different doses of *Alliciae* encapsulated extract (AE-e)¹ or anticoccidial drugs (Ion)², under challenge with *Eimeria* spp.³.

OPG	Age (d)	Challenge Treatments					H ⁴ (Ji ²)	p Value
		C0	C250	C500	C750	C-Ion		
Total OPG	21	95,575 ^a (35,712–186,537)	109,725 ^a (28,150–125,350)	48,900 ^{ab} (35,887–66,337)	35,350 ^{ab} (24,462–107,225)	17,975 ^b (4862–56,237)	14.22	<0.01
	28	3525 (112–6787)	1575 (387–17,612)	700 (0–12,262)	1150 (0–3000)	9225 (812–17,275)	3.76	0.44
	35	0 (0–0)	0 (0–187)	0 (0–37)	0 (0–0)	0 (0–225)	5.50	0.24
<i>E. acervulina</i>	21	78,700 ^a (30,537–142,175)	62,850 ^{ab} (12,925–86,512)	32,900 ^{ab} (24,300–46,575)	31,700 ^{ab} (18,550–83,950)	10,150 ^b (1562–49,687)	12.16	0.02
	28	2625 (50–5350)	1025 (50–15,350)	375 (0–9000)	400 (0–1200)	7950 (200–16,400)	5.20	0.26
	35	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–100)	10.36	0.35
<i>E. maxima</i>	21	3750 (387–16,550)	850 (25–11,312)	3925 (62–14,450)	1550 (162–6037)	3500 (1437–7462)	2.77	0.60
	28	0 (0–137)	25 (0–187)	0 (0–175)	0 (0–250)	100 (0–725)	3.11	0.53
	35	0 (0–0)	0 (0–187)	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–37)	2.79	0.60
<i>E. tenella</i>	21	21,150 ^a (3550–35,862)	15,450 ^{ab} (0–54,025)	3875 ^{ab} (287–17,425)	2575 ^{ab} (637–10,700)	950 ^b (62–5675)	10.33	0.04
	28	700 (25–1462)	325 (212–1225)	225 (0–8712)	100 (0–2400)	425 (25–1950)	0.51	0.97
	35	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	2.80	0.59

^{ab} Medians within rows not sharing a common superscript differ at *P* value reported. ¹ C0, Challenged + basal diet; C250, Challenged + basal diet + 250 mg·kg⁻¹ AE-e; C500, Challenged + basal diet + 500 mg·kg⁻¹ AE-e; C750, Challenged + basal diet + 750 mg·kg⁻¹ AE-e; ² C-Ion, Challenged + basal diet + 50 ppm nicarbazin–50 ppm narasin 1–21 d/ salinomycin 60 ppm 22–49 d. ³ Challenged with *E. acervulina* 1 × 10⁵, *E. maxima* 2 × 10⁶, and *E. tenella* 2 × 10⁴. ⁴ H, test statistic of Kruskal–Wallis.

While C250, C500, and C750 had a similar OPG shedding in both species compared to C-Ion and C0 ($p > 0.05$), in addition, *E. maxima* did not show differences between treatments ($p > 0.05$). Moreover, the total OPG values were significantly higher (+5-fold) in C0 and C250 than C-Ion ($p < 0.01$), whereas C500 and C750 had a similar OPG shedding compared to C-Ion, C0, and C250 ($p > 0.05$). The decrease in OPG excretion from 21 to 28 d of age was more evident in the groups C250 (−69.66-fold), C500 (−69.85-fold), and C750 (−30.73-fold) than C-Ion (−1.94-fold) and C0 (−27.11-fold). At 28 and 35 day of age, *E. acervulina*, *E. maxima*, and *E. tenella* OPG differences between treatments were not detected ($p > 0.05$).

3.3. Intestinal Lesion Score

Due to the absence of injuries in the NC groups, NC0, NC250, NC500, NC750, and NC-Ion, we only show the analysis of the challenged groups, C0, C250, C500, C750, and C-Ion. The LS of duodenum, jejunum, and cecum, as well as TMLS, are described in Table 6. At 21 days of age (9 d p.i.), the LS observed in the duodenum revealed that the birds given the C0 diet showed a more severe LS of 1.5, which was significantly ($p < 0.0001$) higher than the 0.5, 1, and 0 scores from birds given the C250, C500, and C-Ion diets, respectively. Remarkably, the LS observed in broilers from the C250 diet were similar to those observed in the broilers on the C-Ion diet. In addition, no significant differences ($p > 0.05$) were detected among the C250, C500, and C750 diets. However, in the jejunum, significant differences were identified ($p = 0.03$) between the C0 and C750 vs. the C250 and C-Ion diets; despite the LS medians being equal in the groups, the range q25–q75 was higher in

C0 and C750, (0-1), than in C250 and C-Ion, (0-0). In addition, in this intestinal section, the C500 diet had similar effects to the others on LS ($p > 0.05$). In the cecum, the LS in the broilers given the C-Ion diet were lower than those observed in birds fed the C0, C250, and C750 diets ($p < 0.001$) but not compared to C500 ($p > 0.05$). Furthermore, on day 21, the total mean lesion score (TMLS) was significantly higher ($p < 0.001$) in birds from diet C0 compared to C250, C500, and C-Ion. Moreover, the chicken on the C-Ion diet had lower TMLS compared to other treatments at 21 d of age ($p < 0.0001$). On the other hand, on day 28, the LS caused by *E. acervulina*, *E. maxima*, and *E. tenella* were not different between all treatments ($p > 0.05$). However, C-Ion showed higher TMLS compared to the C750 diet ($p = 0.02$), while the C0, C250, and C500 diets did not show significant differences ($p > 0.05$).

Table 6. Medians and ranges (Q25–Q75) in intestinal lesion scores (LS) in broiler chickens supplemented with different doses of *Alliaceae* encapsulated extract (AE-e)¹ or anticoccidial drugs (Ion)², under challenge with *Eimeria* spp.³.

LS	Age (d)	Challenge Treatments					H ⁵ (Ji ²)	p Value
		C0	C250	C500	C750	C-Ion		
Duodenum	21	1.5 ^c (1–2)	0.5 ^{ab} (0–1)	1 ^b (0–1)	1 ^{bc} (1–1)	0 ^a (0–0)	49.7	<0.0001
	28	0 (0–1)	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0.7)	9.2	0.06
Jejunum	21	0 ^b (0–1)	0 ^a (0–0)	0 ^{ab} (0–0.7)	0 ^b (0–1)	0 ^a (0–0)	10.7	0.03
	28	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	9.7	0.09
Cecum	21	1 ^c (1–2)	1 ^{bc} (0–3)	1 ^{abc} (0–1)	1 ^{bc} (0–2)	0 ^a (0–0)	31.4	<0.0001
	28	0.5 (0–2)	0.5 (0–2)	1 (0–1)	0 (0–0.7)	1.5 (0–2)	9.2	0.06
TMLS ⁴	21	3 ^c (2–4.7)	2 ^b (1–3)	2 ^b (1–3)	2 ^{bc} (1.2–3.7)	0 ^a (0–0.7)	54.0	<0.0001
	28	1 ^{ab} (1–2.7)	1 ^{ab} (0–2)	1 ^{ab} (0–2)	0 ^a (0–1.7)	2 ^b (1–2)	12.0	0.02

^{abc} Medians within rows not sharing a common superscript differ at p value reported. ¹ C0, Challenged + basal diet; C250, Challenged + basal diet + 250 mg·kg⁻¹ AE-e; C500, Challenged + basal diet + 500 mg·kg⁻¹ AE-e; C750, Challenged + basal diet + 750 mg·kg⁻¹ AE-e; ² C-Ion, Challenged + basal diet + 50 ppm nicarbazin–50 ppm narasin 1–21 d/salinomycin 60 ppm 22–49 d. ³ Challenged with *E. acervulina* 1 × 10⁵, *E. maxima* 2 × 10⁴ and *E. tenella* 2 × 10⁴; ⁴ TMLS Total mean lesion score. ⁵ H, test statistic of Kruskal–Wallis.

3.4. Anticoccidial Index (ACI)

Table 7 describes the ACI of the different treatments, NC0 had superior ACI compared to C0, C250, C500, and C750 ($p < 0.0001$). C-Ion performed better than C0 and C250 ($p < 0.0001$). The groups C500 and C750 had similar results compared to C-Ion, C0, and C250 ($p > 0.05$). There were linear ($p < 0.04$) and quadratic ($p < 0.03$) positive trends in ACI when comparing the responses to C0, C250, C500 and C750.

Table 7. Calculated anticoccidial index (ACI) in 21 d broiler chickens supplemented with different doses of *Alliaceae* encapsulated extract (AE-e)¹ or anticoccidial drugs (Ion)², under challenge with *Eimeria* spp.³, as well as orthogonal polynomial contrast comparison of AE-e⁴.

Means ⁵	Treatments						SEM	p Value	Linear Trend		Quadratic Trend	
	NC0	C0	C250	C500	C750	C-Ion			p Value	R ²	p Value	R ²
rBWG %	100	85.8	86.1	90.0	82.7	91.4						
SR %	95.0	91.4	92.1	91.0	93.8	94.8						
TMLS × 10	0	34.2	21.7	19.2	25.8	2.5						
OPG value %	0	100	79.1	54.3	59.3	28.0						
ACI	195 ^a	43.1 ^c	77.5 ^c	107.6 ^{bc}	91.3 ^{bc}	155.7 ^{ab}	21.99	<0.0001	0.03	0.09	0.04	0.13

^{abc} Means within rows not sharing a common superscript differ at p value reported. ¹ NC0, Non-challenged + basal diet; C0, Challenged + basal diet; C250, Challenged + basal diet + 250 mg·kg⁻¹ AE-e; C500, Challenged + basal diet + 500 mg·kg⁻¹ AE-e; C750, Challenged + basal diet + 750 mg·kg⁻¹ AE-e; ² C-Ion, Challenged + basal diet + 50 ppm nicarbazin–50 ppm narasin 1–21 d. ³ Challenged with *E. acervulina* 1 × 10⁵, *E. maxima* 2 × 10⁴, and *E. tenella* 2 × 10⁴; ⁴ Polynomial trends, treatments C0, C250, C500, and C750. ⁵ rBWG, relative ratio growth gain; SR, survival rate; TMLS, total mean lesion score; OPG value, oocyst per gram of feces value.

Spearman correlations (ρ) were calculated between OPG, TMLS, ADG, and FCR; the coefficient showed that the presence of OPG at 21 d of age had a positive correlation

of 0.80 and 0.71 with TMLS at 21 and 28 d of age, respectively ($p < 0.0001$). In addition, this OPG had also a positive correlation of 0.73 ($p < 0.0001$) with the FCR at 21 d. On the other hand, there was a negative correlation (-0.54) with ADG at 21 d of age and -0.29 at 49 d of age ($p < 0.01$). At 28 d of age, OPG and TMLS showed a positive correlation of 0.42 ($p < 0.001$). The TMLS at 21 and 28 d were positively correlated (0.67). TMLS at 21d showed a positive correlation of 0.72 with the FCR in the starter phase ($p < 0.001$), as well as a positive correlation of 0.22 with the cumulative period ($p < 0.05$), while showing a negative correlation (-0.51) with the ADG at the same age ($p < 0.001$) and of -0.18 with ADG at 49 d ($p < 0.05$). Therefore, TMLS at 28 d was negatively correlated (-0.18) with ADG at 49 d of age ($p < 0.05$).

3.5. Analysis of Bacterial Composition, 16s rRNA

To evaluate the effects of 5 treatments, NC0, NC500, C0, C500, and C-Ion, on the intestinal microbiota composition in broiler chickens, we studied the ileum and cecum microbial community using 16S rRNA sequencing. We obtained a total of 2,683,053 high-quality sequences of the V3-V4 region of the 16S rRNA gene; a total of 10,710 operational taxonomic units (OTUs) at the 99% sequence similarity level were identified in all samples.

3.6. Alpha- and Beta-Diversity

We detected no differences in the α -diversity indexes (Shannon and Simpson) or in the OTU count of different treatment pairs in the ileum and cecum ($p > 0.05$). In addition, the β -diversity assessed by NMDS from Bray-Curtis distance matrices and a permutational analysis of variance in the ileum section showed no differences in the microbiome between the treatments ($p > 0.05$). On the other hand, in the cecum, there were significant differences in the clustering position in the groups at the taxonomic levels of family, Figure 1a ($p < 0.01$), and genus, Figure 1b ($p = 0.01$). The results showed that NC0 and NC500 were different from C0 and C500, while C-Ion showed no differences against any treatment, except in the taxonomic category family, which was different from NC0, Figure 1.

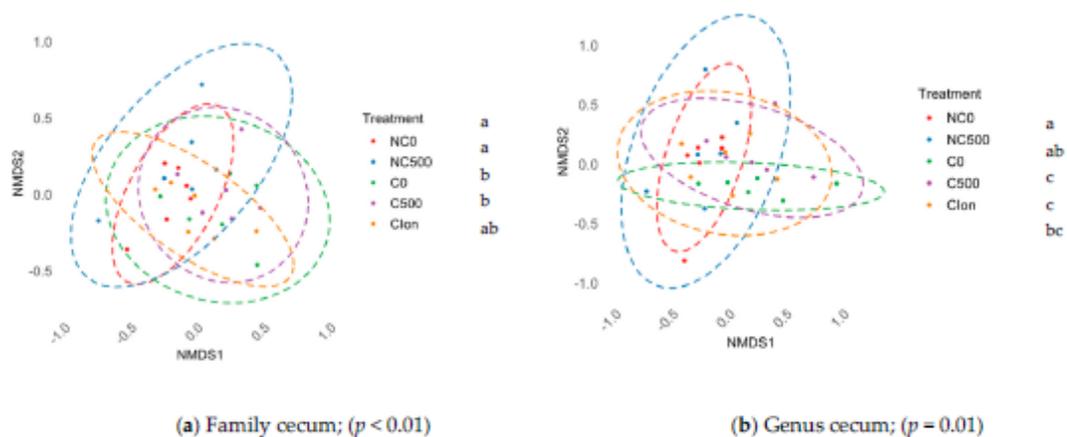


Figure 1. β -diversity comparison between treatments¹. NMDS of Bray-Curtis distances in (a) Family cecum and (b) Genus cecum. ^{abc} The treatments not sharing superscript are different ($p < 0.05$). NC0, Non-challenged + basal diet; NC500, Non-challenged + basal diet + 500 mg·kg⁻¹ AE-e; C0, Challenged + basal diet; C500, Challenged + basal diet + 500 mg·kg⁻¹ AE-e; C-Ion, Challenged + basal diet + 50 ppm nicarbazin-50 ppm narasin. Challenged with *E. acervulina* 1×10^5 , *E. maxima* 2×10^4 , and *E. tenella* 2×10^4 .

3.7. Relative Intestinal Microbiota Abundance

Figure 2 depicts the analysis of the relative abundance of different bacterial clades in the cecum at the phylum and genus level for each group of samples. In the cecum microbiota, *Firmicutes* was the dominant phylum (Figure 2a), with a relative abundance ranging from 57.8% (C0 treatment) to 79.4% (NC0 treatment). At the genus level (Figure 2b), *Bacteroides* was the taxon with the highest relative abundance (9.7–22.1%), highlighting their presence in the groups challenged, C0, C500, and C-Ion.

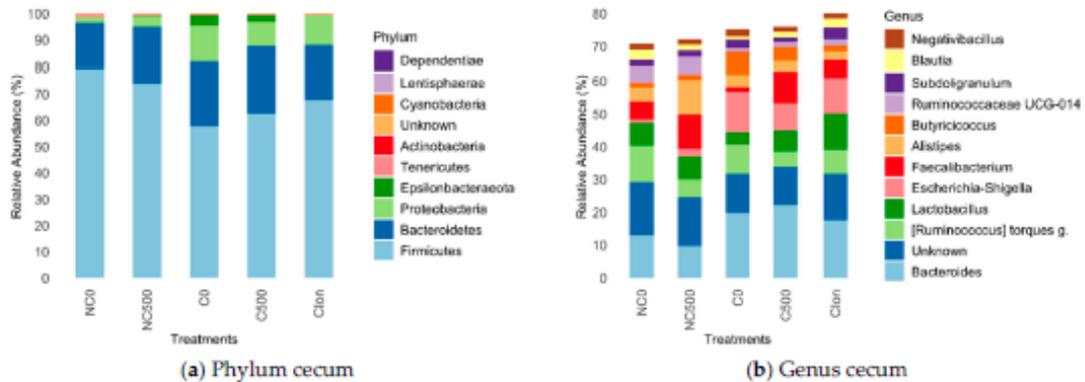


Figure 2. Relative abundance in the intestinal microbiota in broiler chickens at 21 d in (a) Phylum cecum, (b) Genus cecum. Treatments: NC0, Non-challenged + basal diet; NC500, Non-challenged + basal diet + 500 mg·kg⁻¹ AE-e; C0, Challenged + basal diet; C500, Challenged + basal diet + 500 mg·kg⁻¹ AE-e; C-Ion, Challenged + basal diet+50 ppm nicarbazin–50 ppm narasin. Challenged with *E. acervulina* 1×10^5 , *E. maxima* 2×10^4 , and *E. tenella* 2×10^4 . The relative abundances were obtained after normalizing the reads per clade counts by sequencing the library size and obtaining the average for each clade across treatments. The 12 most abundant clades are shown.

To further explore the effect of the treatments on the cecum bacterial communities, we searched for bacterial genus abundance changes among pairs of treatments, C0 vs. NC0; C500 vs. NC500; C-Ion vs. C0; NC500 vs. NC0; C500 vs. C0; and C500 vs. C-Ion (Figure 3). The results are presented in a heat map from a hierarchical clustering analysis based only on significant changes ($p < 0.05$). The results from this study showed that the pair comparisons C0 vs. NC0 and C500 vs. NC500 had more bacterial change-in-abundance differences than the other comparisons studied: C-Ion vs. C0; NC500 vs. NC0; C500 vs. C0; and C500 vs. C-Ion. There was a significantly higher abundance ($p < 0.05$) of genus *Ruminococcus 2* in birds from C500 compared to NC500, C0, and C-Ion (+23.36 log₂-fc, +8.0 log₂-fc, and +23.08 log₂-fc, respectively). Moreover, the abundance change in *Intestinimonas* in the C500 group was +1.78 log₂-fc higher than the C-Ion group. However, *Escherichia-Shigella*, another predominant bacterium in broiler chicken intestines, was also found to be abundant (+4.2 log₂fc) in C0 with respect to the NC0 ($p < 0.05$). Other bacteria, such as *Tyzzrella*, *Eggerthella*, *Clostridium innocuum* g., *Ruminococcaceae* UCG-009, u. *Clostridia* b., and *Ruminococcus 1*, show a higher abundance under the *Eimeria* challenge conditions. On the other hand, NC0 has higher numbers ($p < 0.05$) of *Bacillus*, *Hydrogenoanaerobacterium*, and *Ruminococcus 1* than its challenged counterparts.

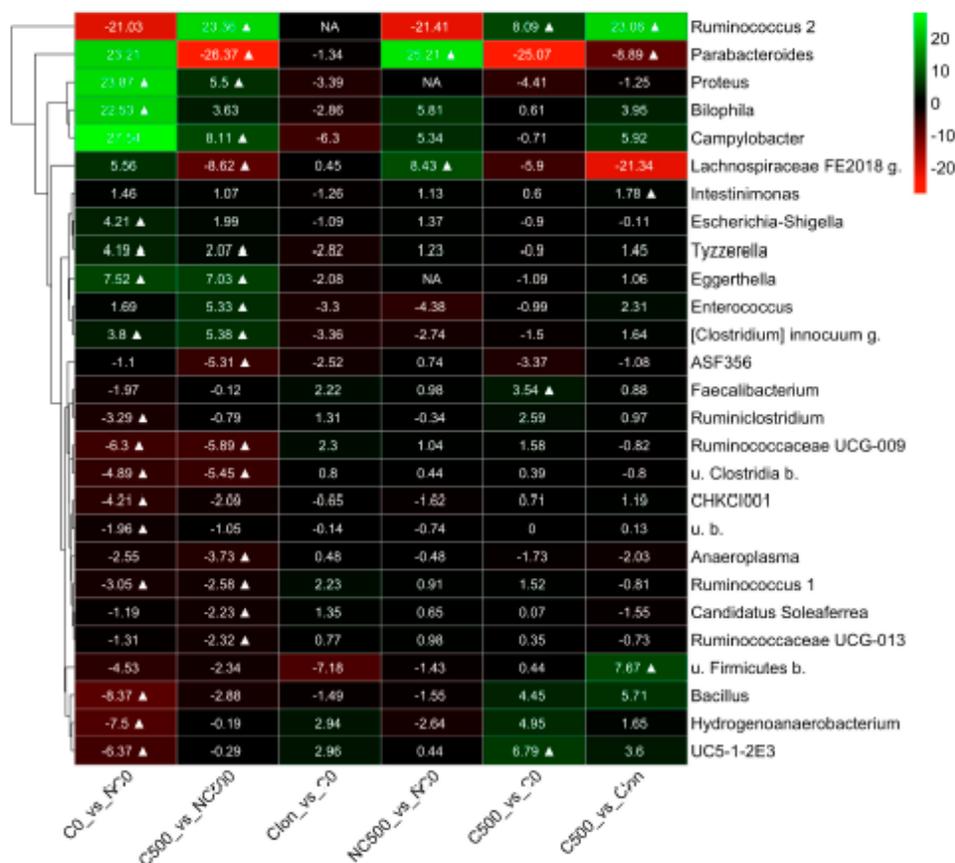


Figure 3. Heat map of the bacterial genus from the cecum of broiler chickens at 21d (9d p.i.). The color block in the heatmap indicates the normalized abundance log₂ fold change (log₂-fc) of each pair of groups at the bacterial genus: C0 vs. NC0; C500 vs. NC500; C-1on vs. C0; NC500 vs. NC0; C500 vs. C0; and C500 vs. C-1on. The positive and negative changes are indicated by the intensity of the green and red color, respectively. Significant changes (with an adjusted $p \leq 0.05$) are marked with a symbol ▲. The non-available (NA) label indicates that the corresponding comparison was not performed as there were no counts for most of the samples of the group pair. A hierarchical clustering tree based on the log₂-fc signals of the clades is shown to the left of the heatmap. The abbreviations u. b. and g. in the genus names stand for "unknown", "bacterium", and "genus", respectively.

4. Discussion

In our study, the *Eimeria* challenge caused a negative impact on growth performance parameters, being more evident at 9 d p.i. (21 days of age). The decrease in the ADG in infected birds, as well as the increases in the FCR, has been reported in other works [8,26,42,43]. In our study, the inclusion of AE750 improved the FCR of broilers in the finisher phase, and in the cumulative study regarding AEO, these results are in agreement with Peinado, et al. [44], who also include two levels of PTSO in the broiler chicken diet and did not find any effect on ADFI, whereas ADG improved using 45 mg per PTSO kg⁻¹ of the diet. Moreover, the FCR was enhanced with both doses tested, 45 and 90 mg per PTSO kg⁻¹ of diet. Similar results were obtained by Kim, et al. [20], who reported that broilers challenged with *E. acervulina* and fed with 10 ppm of PTSO (67%) and PTS (33%) showed a better growth than

the birds that were not supplemented ($p < 0.05$). Furthermore, Kairalla, et al. [11] reported that some feed additives, particularly garlic (*A. sativum*), have shown to improve FCR, as was also previously demonstrated by Aarti and Khusro [45]. This result is important since *Eimeria* infection destroys epithelial cells and affects intestinal villi, causing poor nutrient digestion and severe damage to the host intestinal mucosa, resulting in clinical or subclinical symptoms [46]. In this regard, in a previous study, we demonstrated that organosulfur compounds from garlic, particularly PTSO in 250 g·t⁻¹ of feed, improved the amino acid and energy digestibility in broiler chickens fed with a soybean meal–yellow corn diet [47].

ADG or FCR are not the only good indicators for measuring the effectiveness of anticoccidial drug, but LS and OPG are also considered complementary indicators [48] to the performance. In our study, the higher OPG excretion detected was 9 d p.i., then OPG gradually decreased over time; at 16 d p.i., it is barely noticeable and almost disappears at 23 d p.i. This trend after infection was reported by You [49]. In addition to the treatment effect, the reduction in OPG may be due in part to self-limitation of parasitosis and the immune response developed by the host [50]. We found that OPG shedding was decreased in the challenged birds supplemented with anticoccidial treatment (C-Ion), while 500 and 750 mg·kg⁻¹ of AE-e tended to reduce OPG shedding. A similar effect was observed on the OPG of broiler chickens challenged with *Eimeria* and supplemented with garlic extracts (*A. sativum*) [51,52], their active derivative compounds [20], or a premix of garlic and oregano essential oils [53]. The ACI results were better for C-Ion than for C0 and C250. A positive linear and quadratic trend in ACI suggests that generally, birds challenged with *Eimeria* spp. would perform better when 500 or 750 mg·kg⁻¹ of AE-e is included in their diet.

The correlation analysis in our study indicates that the reduction in the LS was supported by the decreasing OPG. Similar results were found by Elkhtam, et al. [51], where OPG, the clinical symptoms of the disease, and the LS decreased with the addition of garlic extract (*A. sativum*) to the diet of the broiler chickens challenged with *Eimeria* spp. The LS could explain the negative effect on ADG and FCR at 21 and 28 d of age, which was previously noticed by Reid and Johnson [54], who contrasted the LS of birds infected with *E. acervulina* with their weight reached, finding that at higher LS, a lower ADG was obtained, mostly by one week after the challenge; however, LS are not always correlated in coccidia infections, as reported by Ringenier, et al. [55], who did not find a relationship between LS and FCR in broilers at 28 d of age, concluding that broiler chickens are able to cope with a certain level of gut damage before it influences the overall performance. Other researchers such as Conway, et al. [56] concluded that the correlation between OPG, LS, ADG, and FCR depends on the type of *Eimeria* and the use or not of anticoccidials.

On the other hand, it has been reported that diet composition [57,58] and phytochemicals modulate intestinal microbiota [44,53]. It is well known that a healthy and functional intestinal microbiome is related to a positive productive performance of the chickens [59,60]. It was reported that when growing broiler chickens that feed on diets supplemented with *Allium* derivatives, PTSO or PTS are able to influence intestinal microbiota composition [22,61], decreasing enteropathogens and increasing the nutrient absorption in the intestine [22,62–64]. In the current study, neither AE-e nor anticoccidials modified the α - or β -diversity in the ileum or the α -diversity in the cecum. Similar findings were noted by Abdelli, et al. [13], who found that dietary supplementation with natural compounds such as organic acids and essential oils does not always result in changes in diversity in microbial populations within the gastrointestinal tract. Nevertheless, in the cecum, we found changes in β -diversity between clades at the taxonomic levels of family and genus, where the challenged groups showed a different spatial distribution to those not challenged, concluding that the infection with *Eimeria* spp. influences β -diversity, as reported by other researchers [33,65,66]. The analysis of the microbiota clearly showed that the groups under challenge of *Eimeria* spp., regardless of the presence of anticoccidial drugs or AE-e in the diet, had a higher number of enteropathogens belonging to the *Enterobacteriaceae* family

such as *Proteus*, *Escherichia*, and *Shigella*, as well as other opportunistic pathogens, including the genera *Tyzerella*, *Eggertella*, and *Biophila*.

In our study, we found that in the cecum, at the genus level, C500 had a higher abundance of *Ruminococcus*, *Firmicutes* b., and *Intestinimonas* than C-10n, considering that *Ruminococcus* bacteria synthesize digestive enzymes such as cellulases, xylanases, and cellobioses [67–69], which contributes to the hydrolysis and fermentation of non-structural carbohydrates, producing butyric acid. It has also been reported that some species of *Ruminococcus* produce bacteriocins that contribute to controlling undesirable bacterial populations, enhancing the growth of *Lactobacillus* and promoting intestinal health. All this could explain the improvement in nutrient digestibility and the productive behavior of birds when *Ruminococcus* is present in abundance. On the other hand, species of the *Intestinimonas* genus are producers of short-chain fatty acids increasing butyric fatty acid from simple sugars and amino acids such as lysine [70,71]. It connects two important metabolic characteristics, butyric acid production and amino acid fermentation in the intestinal tract. Thus, in this study, the beneficial effects of AE-e on the modulation of the intestinal microbiota were consistent with the results of Vezza, et al. [57], who demonstrated in a murine model of metabolic syndrome that PTSO supplementation at doses of 0.1, 0.5, and 1 mg·kg⁻¹·day⁻¹ counteracts intestinal dysbiosis.

5. Conclusions

In summary, the dose of 750 mg·kg⁻¹ of an *Alliaceae* encapsulated extract added to the diet of broiler chickens improved the feed conversion ratio in the finisher phase compared to broiler chickens fed a diet without additives. Furthermore, during the finisher phase and cumulative study, its addition to the diet resulted in a positive linear trend in average daily gain and feed conversion ratio.

The anticoccidial index showed a quadratic trend in which the dose of 500 mg·kg⁻¹ of the *Alliaceae* encapsulated extract displayed the best response. Moreover, it promoted the abundance of some butyrate-producing bacteria such as *Intestinimonas* and *Ruminococcus* in the cecum.

However, the best anticoccidial index, feed conversion ratio, oocyst shedding, and intestinal lesion score was observed in the group fed with the anticoccidial ionophore program.

Further research is required to explain the mode of action, as well as determine the optimal dose of the *Alliaceae* encapsulated extract in the diet of broiler chickens to lessen or control the detrimental effects of coccidiosis under industrial conditions. It is necessary to verify whether using an *Alliaceae* encapsulated extract in dual programs combined with ionophores or vaccines is feasible.

Author Contributions: Conceptualization, G.V.-P. and M.E.O.-G.; methodology, G.V.-P., M.E.O.-G. and J.C.B.-V.; validation, M.E.O.-G. and J.C.B.-V.; formal analysis, G.V.-P., M.d.C.C.-R., M.E.O.-G. and A.L.; investigation, G.V.-P. and M.E.O.-G.; resources, G.V.-P.; data curation, G.V.-P. and A.L.; writing—original draft preparation, G.V.-P.; writing—review and editing, A.H.R.-P. and M.d.C.C.-R.; visualization, A.H.R.-P. and M.d.C.C.-R.; supervision, G.G.-V., G.T. and A.H.R.-P.; project administration, G.V.-P., M.E.O.-G. and J.C.B.-V.; funding acquisition, G.V.-P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Grupo Nutec (Avenida del Marqués 32, Parque Industrial Bernardo Quintana, El Marqués, Querétaro, México, 76246). "https://www.gponutec.com/ (accessed on 16 October 2023)", funding number iiii 2-19 L-A.

Institutional Review Board Statement: This experiment was approved on 5 October 2020 by the Institutional Subcommittee for the Care and Use of Experimental Animals (protocol SICUAE. DC-2020/3-6) of the School of Veterinary Medicine and Zootechnics of the National Autonomous University of México (UNAM), in compliance with the Mexican Official Norm NOM-062-ZOO-1999.

Informed Consent Statement: The study was conducted at the facilities of the SANUREN (Specialized Animal Nutrition Research Network) experimental farm owned by the Grupo Nutec company. Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding authors. The data are not publicly available due to privacy.

Acknowledgments: The authors wish to thank all staff members of the Specialized Animal Nutrition Research Network (SANUREN, Querétaro, México) and Carlos Vázquez-Hernández staff member of OMICs who contributed to this study.

Conflicts of Interest: At the time of submitting this manuscript, G. Villar-Patiño, M.E. Olvera-García, and J.C. Baltazar-Vázquez declare a potential direct conflict of interest as they work at Grupo NUTEC. <https://www.gponutec.com/> (accessed on 24 October 2023). M.C. Camacho-Rea, G. Gómez-Verduzco, G. Téllez, A. Labastida, and A.H. Ramírez-Pérez have no conflicts of interest.

References

- Britez, J.D.; Rodríguez, A.E.; Di Ciaccio, L.; Marugán-Hernández, V.; Tomazic, M.L. What do we know about surface proteins of chicken parasites *Eimeria*? *Life* **2023**, *13*, 1295. [CrossRef] [PubMed]
- Liu, J.; Liu, L.; Li, L.; Tian, D.; Li, W.; Xu, L.; Yan, R.; Li, X.; Song, X. Protective immunity induced by *Eimeria* common antigen 14-3-3 against *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina* and *Eimeria maxima*. *BMC Vet. Res.* **2018**, *14*, 337. [CrossRef] [PubMed]
- Noack, S.; Chapman, H.D.; Selzer, P.M. Anticoccidial drugs of the livestock industry. *Parasitol. Res.* **2019**, *118*, 2009–2026. [CrossRef] [PubMed]
- Zaheer, T.; Abbas, R.Z.; Imran, M.; Abbas, A.; Butt, A.; Aslam, S.; Ahmad, J. Vaccines against chicken coccidiosis with particular reference to previous decade: Progress, challenges, and opportunities. *Parasitol. Res.* **2022**, *121*, 2749–2763. [CrossRef] [PubMed]
- Mesa-Pineda, C.; Navarro-Ruiz, J.L.; López-Osorio, S.; Chaparro-Gutiérrez, J.J.; Gómez-Osorio, L.M. Chicken coccidiosis: From the parasite lifecycle to control of the disease. *Front. Vet. Sci.* **2021**, *8*, 787653. [CrossRef] [PubMed]
- Martins, R.R.; Silva, L.J.G.; Pereira, A.M.P.T.; Esteves, A.; Duarte, S.C.; Pena, A. Coccidiostats and poultry: A comprehensive review and current legislation. *Foods* **2022**, *11*, 2738. [CrossRef] [PubMed]
- Wunderlich, E.; Al-Quraishy, S.; Steinbrenner, H.; Sies, H.; Dkhil, M.A. Towards identifying novel anti-*Eimeria* agents: Trace elements, vitamins, and plant-based natural products. *Parasitol. Res.* **2014**, *113*, 3547–3556. [CrossRef]
- Stefanello, C.; Rosa, D.P.; Dalmoro, Y.K.; Segatto, A.L.; Vieira, M.S.; Moraes, M.L.; Santin, E. Protected blend of organic acids and essential oils improves growth performance, nutrient digestibility, and intestinal health of broiler chickens undergoing an intestinal challenge. *Front. Vet. Sci.* **2019**, *6*, 491. [CrossRef]
- Ur Rahman, S.; Khan, S.; Chand, N.; Sadique, U.; Khan, R.U. In vivo effects of *Allium cepa* L. on the selected gut microflora and intestinal histomorphology in broiler. *Acta Histochem.* **2017**, *119*, 446–450. [CrossRef]
- Malematja, E.; Manyelo, T.G.; Ng'ambi, J.W.; Nemauluma, M.F.D.; Kolobe, S.D. Effects of onion extracts (*Allium cepa*) inclusion in diets on growth performance, carcass characteristics, and bone morphometric of broiler chickens. *Anim. Biosci.* **2023**, *36*, 1075–1082. [CrossRef]
- Kairalla, M.A.; Alshelmani, M.I.; Aburas, A.A. Effect of diet supplemented with graded levels of garlic (*Allium sativum* L.) powder on growth performance, carcass characteristics, blood hematology, and biochemistry of broilers. *Open Vet. J.* **2022**, *12*, 595–601. [CrossRef] [PubMed]
- Kumar, A.; Sharma, N.K.; Kheravii, S.K.; Keerqin, C.; Ionescu, C.; Blanchard, A.; Wu, S.B. Potential of a mixture of eugenol and garlic tincture to improve performance and intestinal health in broilers under necrotic enteritis challenge. *Anim. Nutr.* **2022**, *8*, 26–37. [CrossRef] [PubMed]
- Abdelli, N.; Perez, J.F.; Vilarrasa, E.; Cabeza Luna, I.; Melo-Duran, D.; D'Angelo, M.; Sola-Oriol, D. Targeted-release organic acids and essential oils improve performance and digestive function in broilers under a necrotic enteritis challenge. *Animals* **2020**, *10*, 259. [CrossRef] [PubMed]
- Kothari, D.; Lee, W.D.; Niu, K.M.; Kim, S.K. The genus *Allium* as poultry feed additive: A review. *Animals* **2019**, *9*, 1032. [CrossRef] [PubMed]
- Putnik, P.; Gabric, D.; Roohinejad, S.; Barba, F.J.; Granato, D.; Mallikarjunan, K.; Lorenzo, J.M.; Bursac Kovacevic, D. An overview of organosulfur compounds from *Allium* spp.: From processing and preservation to evaluation of their bioavailability, antimicrobial, and anti-inflammatory properties. *Food Chem.* **2019**, *276*, 680–691. [CrossRef] [PubMed]
- Subramanian, M.S.; Nandagopal, M.G.; Amin Nordin, S.; Thilakavathy, K.; Joseph, N. Prevailing knowledge on the bioavailability and biological activities of sulphur compounds from *Allium*s: A potential drug candidate. *Molecules* **2020**, *25*, 4111. [CrossRef] [PubMed]
- Sorlozano-Puerto, A.; Albertuz-Crespo, M.; Lopez-Machado, L.; Ariza-Romero, J.J.; Banos-Arjona, A.; Exposito-Ruiz, M.; Gutiérrez-Fernández, J. In Vitro antibacterial activity of propyl-propane-thiosulfinate and Propyl-propane-thiosulfonate derived from *Allium* spp. against gram-negative and gram-positive multidrug-resistant bacteria isolated from human samples. *Biomed Res. Int.* **2018**, *2018*, 7861207. [CrossRef]
- Abad, P.; Arroyo-Marzanares, N.; Rivas-Montoya, E.; Ochando-Pulido, J.M.; Guillamon, E.; García-Campaña, A.M.; Martínez-Ferez, A.; Plaizier, J. Effects of different vehiculization strategies for the allium derivative propyl propane thiosulfonate during dynamic simulation of the pig gastrointestinal tract. *Can. J. Anim. Sci.* **2019**, *99*, 244–253. [CrossRef]

19. Aguinaga-Casanas, M.A.; Mut-Salud, N.; Falcon-Pineiro, A.; Alcaraz-Martinez, A.; Guillamon, E.; Banos, A. In vitro antiparasitic activity of propyl-propane-thiosulfinate (PTS) and propyl-propane-thiosulfonate (PTSO) from *Allium cepa* against *Eimeria acervulina* sporozoites. *Microorganisms* **2022**, *10*, 2040. [CrossRef]
20. Kim, D.K.; Lillehoj, H.S.; Lee, S.H.; Lillehoj, E.P.; Bravo, D. Improved resistance to *Eimeria acervulina* infection in chickens due to dietary supplementation with garlic metabolites. *Br. J. Nutr.* **2013**, *109*, 76–88. [CrossRef]
21. Pourali, M.; Kermanshahi, H.; Golian, A.; Razmi, G.; Soukhtanloo, M. Antioxidant and anticoccidial effects of garlic powder and sulfur amino acids on *Eimeria*-infected and uninfected broiler chickens. *Iran. J. Vet. Res.* **2014**, *15*, 227–232.
22. Peinado, M.J.; Ruiz, R.; Echávarri, A.; Aranda-Olmedo, I.; Rubio, L.A. Garlic derivative PTS-O modulates intestinal microbiota composition and improves digestibility in growing broiler chickens. *Anim. Feed. Sci. Technol.* **2013**, *181*, 87–92. [CrossRef]
23. Khan, R.; Nikousefat, Z.; Tufarelli, V.; Naz, S.; Javdani, M.; Laudadio, V. Garlic (*Allium sativum*) supplementation in poultry diets, effects on production and physiology. *World's Poultry Sci. J.* **2012**, *68*, 417–424. [CrossRef]
24. Rabelo-Ruiz, M.; Ariza-Romero, J.J.; Zurita-Gonzalez, M.J.; Martin-Platero, A.M.; Banos, A.; Maqueda, M.; Valdivia, E.; Martinez-Bueno, M.; Peralta-Sanchez, J.M. *Allium*-based phytochemicals enhances egg production in laying hens through microbial composition changes in ileum and cecum. *Animals* **2021**, *11*, 448. [CrossRef] [PubMed]
25. Abad, P.; Arroyo-Manzanares, N.; Ariza, J.J.; Baños, A.; García-Campana, A.M. Effect of *Allium* extract supplementation on egg quality, productivity, and intestinal microbiota of laying hens. *Animals* **2021**, *11*, 41. [CrossRef] [PubMed]
26. Holdsworth, P.A.; Conway, D.P.; McKenzie, M.E.; Dayton, A.D.; Chapman, H.D.; Mathis, G.F.; Skinner, J.T.; Mundt, H.C.; Williams, R.B.; World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, P. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) guidelines for evaluating the efficacy of anticoccidial drugs in chickens and turkeys. *Vet. Parasitol.* **2004**, *121*, 189–212. [CrossRef] [PubMed]
27. Long, P.L.; Millard, B.J.; Joyner, L.P.; Norton, C.C. A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. *Folia Vet. Lat.* **1976**, *6*, 201–217.
28. Kraieski, A.L.; Hayashi, R.M.; Sanches, A.; Almeida, G.C.; Santin, E. Effect of aflatoxin experimental ingestion and *Eimeria* vaccine challenges on intestinal histopathology and immune cellular dynamic of broilers: Applying an Intestinal Health Index. *Poult. Sci.* **2017**, *96*, 1078–1087. [CrossRef]
29. Moraes, P.O.; Cardinal, K.M.; Gouvêa, E.L.; Schroeder, B.; Ceron, M.S.; Lunedo, R.; Frazzon, A.P.G.; Frazzon, J.; Ribeiro, A.M.L. Comparison between a commercial blend of functional oils and monensin on the performance and microbiota of coccidiosis-challenged broilers. *Poult. Sci.* **2019**, *98*, 5456–5464. [CrossRef]
30. Johnson, J.; Reid, W.M. Anticoccidial drugs: Lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Exp. Parasitol.* **1970**, *28*, 30–36. [CrossRef]
31. Merk Sharp; Dohome Laboratory. *Anticoccidial Index*; Merk Company: Kenilworth, NJ, USA, 1976.
32. Wang, L.; Guo, W.; Haq, S.U.; Guo, Z.; Cui, D.; Yang, F.; Cheng, F.; Wei, X.; Lv, J. Anticoccidial activity of Qinghao powder against *Eimeria tenella* in broiler chickens. *Front. Vet. Sci.* **2021**, *8*, 709046. [CrossRef] [PubMed]
33. Choi, J.; Kim, W. Interactions of Microbiota and Mucosal Immunity in the Ceca of Broiler Chickens Infected with *Eimeria tenella*. *Vaccines* **2022**, *10*, 1941. [CrossRef] [PubMed]
34. Bae, Y.; Koo, B.-S.; Lee, S.; Mo, J.; Oh, K.; Mo, I. Bacterial diversity and its relationship to growth performance of broilers. *Korean J. Vet. Res.* **2017**, *57*, 159–167. [CrossRef]
35. Yang, C.; Kennes, Y.; Lepp, D.; Yin, X.; Wang, Q.; Yu, H.; Yang, C.; Gong, J.; Diarra, M. Effects of encapsulated cinnamaldehyde and citral on the performance and cecal microbiota of broilers vaccinated or not vaccinated against coccidiosis. *Poult. Sci.* **2020**, *99*, 936–948. [CrossRef] [PubMed]
36. Klindworth, A.; Pruesse, E.; Schweier, T.; Peplies, J.; Quast, C.; Horn, M.; Glöckner, F.O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *41*, e1. [CrossRef]
37. Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2114–2120. [CrossRef] [PubMed]
38. Bolyen, E.; Rideout, J.R.; Dillon, M.R.; Bokulich, N.A.; Abnet, C.C.; Al-Ghalith, G.A.; Alexander, H.; Alm, E.J.; Arumugam, M.; Asnicar, F.; et al. Author Correction: Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 1091. [CrossRef]
39. Wang, Q.; Garrity, G.M.; Tiedje, J.M.; Cole, J.R. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *AEM* **2007**, *73*, 5261–5267. [CrossRef]
40. Glöckner, F.O.; Yilmaz, P.; Quast, C.; Gerken, J.; Beccati, A.; Ciuprina, A.; Bruns, G.; Yarza, P.; Peplies, J.; Westram, R.; et al. 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. *J. Biotechnol.* **2017**, *261*, 169–176. [CrossRef]
41. McMurdie, P.J.; Holmes, S. Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61217. [CrossRef]
42. Ritzi, M.M.; Abdelrahman, W.; Mohnl, M.; Dalloul, R.A. Effects of probiotics and application methods on performance and response of broiler chickens to an *Eimeria* challenge. *Poult. Sci.* **2014**, *93*, 2772–2778. [CrossRef] [PubMed]
43. Osho, S.O.; Xiao, W.W.; Adeola, O. Response of broiler chickens to dietary soybean bioactive peptide and coccidia challenge. *Poult. Sci.* **2019**, *98*, 5669–5678. [CrossRef] [PubMed]

44. Peinado, M.J.; Ruiz, R.; Echavarrí, A.; Rubio, L.A. Garlic derivative propyl propane thiosulfonate is effective against broiler enteropathogens *in vivo*. *Poult. Sci.* **2012**, *91*, 2148–2157. [CrossRef] [PubMed]
45. Aarti, C.; Khuroo, A. Role of garlic (*Allium sativum*) as feed supplements in poultry industries: An overview. *WNOFNS* **2020**, *29*, 151–161.
46. Blake, D.P.; Knox, J.; Dehaeck, B.; Huntington, B.; Rathinam, T.; Ravipati, V.; Ayoade, S.; Gilbert, W.; Adebambo, A.O.; Jatau, I.D.; et al. Re-calculating the cost of coccidiosis in chickens. *Vet. Res.* **2020**, *51*, 115. [CrossRef] [PubMed]
47. Villar-Patiño, G.; Camacho-Rea, M.d.C.; Olvera-García, M.E.; Soria-Soria, A.; Baltazar-Vázquez, J.C.; Gómez-Verduzco, G.; Solano, L.; Téllez, G.; Ramírez-Pérez, A.H. The effect of encapsulated Propyl propane thiosulfonate (PTSO) on apparent ileal digestibility and productive performance in broiler chickens. *Animals* **2023**, *13*, 1123. [CrossRef] [PubMed]
48. Chasser, K.M.; Duff, A.F.; Wilson, K.M.; Briggs, W.N.; Latorre, J.D.; Barta, J.R.; Bielke, L.R. Research Note: Evaluating fecal shedding of oocysts in relation to body weight gain and lesion scores during *Eimeria* infection. *Poult. Sci.* **2020**, *99*, 886–892. [CrossRef]
49. You, M.-J. Detection of four important *Eimeria* species by multiplex PCR in a single assay. *Parasitol. Int.* **2014**, *63*, 527–532. [CrossRef]
50. Kim, W.H.; Chaudhari, A.A.; Lillehoj, H.S. Involvement of T cell immunity in avian coccidiosis. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2732. [CrossRef]
51. Elkhtam, A.; Shata, A.; El-Hewaity, M.H. Efficacy of turmeric (*Curcuma longa*) and garlic (*Allium sativum*) on *Eimeria* species in broilers. *IJBAS* **2014**, *3*, 349. [CrossRef]
52. Ali, M.; Chand, N.; Khan, R. Anticoccidial effect of garlic (*Allium sativum*) and ginger (*Zingiber officinale*) against experimentally induced coccidiosis in broiler chickens. *J. Appl. Anim. Res.* **2019**, *1*, 79–84. [CrossRef]
53. Sidiropoulou, E.; Skoufos, I.; Marugan-Hernandez, V.; Giannenas, I.; Bonos, E.; Aguiar-Martins, K.; Lazari, D.; Blake, D.P.; Tzora, A. *In vitro* anticoccidial study of oregano and garlic essential oils and effects on growth performance, fecal oocyst output, and intestinal microbiota *in vivo*. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7*, 420. [CrossRef] [PubMed]
54. Reid, W.M.; Johnson, J. Pathogenicity of *Eimeria acerulina* in light and heavy coccidial infections. *Avian Dis.* **1970**, *14*, 166–171. [CrossRef] [PubMed]
55. Ringenier, M.; Caekebeke, N.; De Meyer, F.; Van Limbergen, T.; Eeckhaut, V.; Ducatelle, R.; Van Immerseel, F.; Dewulf, J. A field study on correlations between macroscopic gut health scoring, histological measurements and performance parameters in broilers. *Azian Pathol.* **2021**, *50*, 500–506. [CrossRef] [PubMed]
56. Conway, D.P.; McKerzie, M.E.; Dayton, A.D. Relationship of coccidial lesion scores and weight gain in infections of *Eimeria acerulina*, *E. maxima* and *E. tenella* in broilers. *Avian Pathol.* **1990**, *19*, 489–496. [CrossRef] [PubMed]
57. Vezza, T.; Garrido-Mesa, J.; Diez-Echave, P.; Hidalgo-García, L.; Ruiz-Malagón, A.J.; García, F.; Sánchez, M.; Toral, M.; Romero, M.; Duarte, J.; et al. Allium-derived compound Propyl propane thiosulfonate (PTSO) attenuates metabolic alterations in mice fed a high-fat diet through its anti-inflammatory and prebiotic properties. *Nutrients* **2021**, *13*, 2595. [CrossRef] [PubMed]
58. Beam, A.; Clinger, E.; Hao, L. Effect of diet and dietary components on the composition of the gut microbiota. *Nutrients* **2021**, *13*, 2795. [CrossRef]
59. Aruwa, C.E.; Pillay, C.; Nyaga, M.M.; Sabiu, S. Poultry gut health-microbiome functions, environmental impacts, microbiome engineering and advancements in characterization technologies. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2021**, *12*, 119. [CrossRef]
60. Mohammadi, R.; Hosseini-Safa, A.; Ehsani Ardakani, M.J.; Rostami-Nejad, M. The relationship between intestinal parasites and some immune-mediated intestinal conditions. *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench* **2015**, *8*, 123–131.
61. Kumar, S.; Sharadamma, K.C.; Radhakrish, P.M. Effects of a garlic active based growth promoter on growth performance and specific pathogenic intestinal microbial counts of broiler chicks. *Int. J. Poult. Sci.* **2010**, *9*, 244–246. [CrossRef]
62. Pelicano, E.R.; Souza, P.A.; Souza, H.B.A.; Figueiredo, D.F.; Boiago, M.M.; Carvalho, S.R.; Bordon, V.F. Intestinal mucosa development in broiler chickens fed natural growth promoters. *Braz. J. Poult. Sci.* **2005**, *7*, 221–229. [CrossRef]
63. Kim, G.B.; Seo, Y.M.; Kim, C.H.; Paik, I.K. Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. *Poult. Sci.* **2011**, *90*, 75–82. [CrossRef] [PubMed]
64. Frick, J.S.; Autenrieth, I.B. The gut microflora and its variety of roles in health and disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2013**, *358*, 273–289. [CrossRef] [PubMed]
65. Campos, P.M.; Miska, K.B.; Jenkins, M.C.; Yan, X.; Proszkowiec-Weglarz, M. Effects of *Eimeria acerulina* infection on the luminal and mucosal microbiota of the duodenum and jejunum in broiler chickens. *Front. Microbiol.* **2023**, *14*, 1147579. [CrossRef] [PubMed]
66. Jebessa, E.; Guo, L.; Chen, X.; Bello, S.F.; Cai, B.; Girma, M.; Hanotte, O.; Nie, Q. Influence of *Eimeria maxima* coccidia infection on gut microbiome diversity and composition of the jejunum and cecum of indigenous chicken. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 994224. [CrossRef] [PubMed]
67. Flint, H.J.; McPherson, C.A.; Martin, J. Expression of two xylanase genes from the rumen cellulolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens* 17 cloned in pUC13. *Microbiology* **1991**, *137*, 123–129. [CrossRef] [PubMed]
68. Pettipher, G.L.; Latham, M.J. Characteristics of enzymes produced by *Ruminococcus flavefaciens* which degrade plant cell walls. *Microbiology* **1979**, *110*, 21–27. [CrossRef]
69. Saburi, W.; Yamamoto, T.; Taguchi, H.; Hamada, S.; Matsui, H. Practical preparation of epilactose produced with cellobiose 2-epimerase from *Ruminococcus albus* NE1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2010**, *74*, 1736–1737. [CrossRef]

70. Bui, T.P.N.; Ritari, J.; Boeren, S.; de Waard, P.; Plugge, C.M.; de Vos, W.M. Production of butyrate from lysine and the Amadori product fructoselysine by a human gut commensal. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 10062. [CrossRef]
71. Zhang, Q.; Zhang, S.; Wu, S.; Madsen, M.H.; Shi, S. Supplementing the early diet of broilers with soy protein concentrate can improve intestinal development and enhance short-chain fatty acid-producing microbes and short-chain fatty acids, especially butyric acid. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2022**, *13*, 97. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

- 6.3. **EXPERIMENTO 3.** Efecto de un extracto encapsulado de Alíáceas y de butirato de sodio en el desempeño productivo, salud intestinal, xantofilas en plasma y pigmentación de pollos infectados con *Eimeria* spp.

Gonzalo Villar-Patiño, María del Carmen Camacho-Rea, Myrna Elena Olvera-García, Julio César Baltazar-Vázquez, Gabriela Gómez-Verduzco, Guillermo Téllez, Aurora Hilda Ramírez-Pérez

En preparación...

Resumen

Este trabajo se llevó a cabo para estudiar el efecto de un extracto encapsulado de aliáceas (Ae) y de butirato de sodio (B) en el desempeño productivo, salud intestinal, concentración plasmática de xantófilas y pigmentación cutánea de pollos infectados con *Eimeria* spp. El estudio duró 49 días; se usaron 2800 pollos machos (Ross 308), asignados al azar a los grupos experimentales conformados con base en: no desafío (NC) o desafío a los 12 días de edad (C) con *Eimeria acervulina* 1×10^5 , *E. maxima* 2×10^4 , y *E. tenella* 2×10^4 y diferentes cantidades por tonelada de alimento de: Ae (250, 500 g), butirato de sodio (B; 1000 g), salinomicina (Ion; 600 g). Los tratamientos experimentales fueron: NC, C, Clon, C250, C250B, C500 y C500B. Los tratamientos se proporcionaron desde el primer día de edad. Se calcularon la ganancia de peso, y conversión alimenticia; se midieron los ooquistes por gramo de heces, lesiones intestinales, altura de vellosidades, relación cripta vellosidad, índice anticoccidiano, concentración de xantofilas en plasma, y pigmentación cutánea *in vivo* y en canal fría. Los mayores ($p < 0.05$) efectos de la infección con *Eimeria* spp. fueron a los 21 d, siendo el grupo más afectado el que recibió control negativo desafiado tratamiento C. En general, los mejores ($p < 0.05$) resultados de producción, severidad de la infección por *Eimeria* spp. y de amarillamiento fueron para los grupos NC0 y Clon, sin embargo, los grupos Ae y Ae + B tuvieron en la mayoría de los casos una mejor respuesta al desafío en comparación del grupo C siendo similar en muchas variables a Clon. Por lo que es razonable proponer al Ae, como una alternativa eficaz en el control de la coccidiosis del pollo de engorda. Su uso junto al butirato de sodio promovería la funcionalidad y salud intestinal.

Palabras clave: pollo de engorda; coccidiosis; extracto de aliáceas; ionóforos; xantofilas en plasma; pigmentación.

Abstract

The objective of this work was to study the effect of an *Alliaceae* encapsulated extract (Ae) and sodium butyrate (B) in productive behavior, intestinal health, xanthophyll in plasma and skin pigmentation of broilers challenged with *Eimeria* spp. The study last 49 d; 2800 male broiler chickens (Ross 308) were allotted in experimental groups, which consider: no challenge (NC) or challenge with *Eimeria acervulina* 1×10^5 , *E. maxima* 2×10^4 , and *E. tenella* 2×10^4 (C) at 12 d old. Feed could include Ae (250 or 500 g/t); sodium butyrate (B; 1000 g/t), or salinomycin (Ion, 600 g/t). Experimental treatments were defined as follows, NC, C, Clon, C250, C250B, C500 and C500B. Broilers were fed with their treatment since the first day. Weight gain and feed efficiency, anticoccidial index were estimated, oocyst per gram of feces, intestinal lesion score, villus height, villus/crypt ratio, plasma xanthophyll, and skin pigmentation *In vivo* and in cold slaughter were measured. The damage effects of *Eimeria* infections were more evident at 21d, the most affected group was the negative control under challenge, treatment C. In general, the best results ($p < 0.05$) on productive performance, severity of infection, skin yellowness were obtained by the treatments NC0 and Clon, nevertheless, the Ae and Ae + B groups showed in almost all the cases a better response against challenge than C treatment, reaching in some variables results similar than Clon. So, it is reasonable to propose Ae as an effective alternative in the control of coccidiosis of broiler chicken. Its use together with sodium butyrate would promote functionality and intestinal health.

Key words: broiler chickens; coccidiosis; *Alliaceae* extract; ionophores; plasma xanthophyll; pigmentation.

➤ Introducción

La coccidiosis es la parasitosis con mayor impacto económico en el pollo de engorda; su patogenicidad va de moderada a grave (Tewari y Maharana, 2011); la infección se genera por el consumo de ooquistes esporulados de *Eimeria* spp. presentes en la cama. Las principales especies de coccidiosis en el pollo de engorda son: *Eimeria acervulina*, *Eimeria máxima* y *Eimeria tenella* (Chapman y col., 2013; Chapman y col., 2016; Parent y col., 2018), las cuales provocan lesiones intestinales reconocibles y signos clínicos distintos (Johnson y Reid, 1970; Williams, 2005). *E. acervulina* afecta principalmente al duodeno disminuyendo la absorción de nutrientes (Turk, 1972; Rochell y col., 2016), favoreciendo la pérdida de líquido; *E. máxima* daña al yeyuno, inflama la pared intestinal, provoca hemorragias petequiales en la mucosa, así como pérdida del epitelio intestinal. *E. tenella* destruye completamente la mucosa cecal, provocando hemorragias y en ocasiones la muerte (López-Osorio y col., 2020). La puntuación de las lesiones intestinales (Johnson y Reid, 1970) sigue siendo uno de los métodos diagnósticos más empleados para evaluar la severidad de la infección coccidial (Parent y col., 2018). Los daños intestinales causados por eimeriosis afectan negativamente al crecimiento del ave, la eficiencia alimenticia (Dalloul y col., 2003; Min y col., 2013; Ritzi y col., 2014), y la pigmentación cutánea del pollo de engorda (Castaneda y col., 2005; Frade-Negrete y col., 2016), dependiente de la absorción intestinal; cabe señalar que el costo de los pigmentantes alcanza de 8 a 10% del costo de la alimentación (Muñoz-Díaz y col., 2012) por lo que debe procurarse una pigmentación eficiente.

El tratamiento más utilizado para la prevención y/o control de la coccidiosis es la inclusión dietaria de anticoccidianos del tipo de los ionóforos y otros de naturaleza química (Chapman y col., 2013); sin embargo, la preocupación por el desarrollo de resistencia y la posible presencia residual de esas sustancias en la carne de pollo ha instado a investigar sobre otras alternativas naturales (Abbas y col., 2011;

Giannenas y col., 2014). Algunos metabolitos secundarios de las plantas (fitoquímicos) han demostrado ser alternativas seguras y efectivas a los anticoccidianos (Upadhaya y col., 2019). Existen reportes (Jimoh y col., 2013) en los cuales los extractos de aliáceas mitigan el detrimento causado por algunas enfermedades bacterianas y parasitarias en las aves. Se ha reportado que los compuestos bioactivos órgano sulfurados (COS) del género *Allium* reducen la viabilidad de los esporozoitos de *E. acervulina*, estimulan la proliferación de células esplénicas, mejorando la respuesta inmune innata (Kim y col., 2013a). Además, inhiben la esporulación de *E. tenella* (Pourali y col., 2014), la capacidad de los esporozoitos de *E. acervulina* para penetrar en células renales de Madin-Darby “células MDBK” (Aguinaga-Casanas y col., 2022). Así, se buscan productos que prevengan, y disminuyan las lesiones intestinales por coccidias para aminorar el impacto de éstas en la digestión y absorción de nutrientes favoreciendo la eficiencia productiva del pollo. Adicionalmente, se han utilizado los ácidos orgánicos (McKnight y col., 2019) junto con los fitoquímicos; p. ej. *Allium* spp. con ácidos orgánicos y ácidos grasos de cadena corta (AGCC, como el ácido butírico), en donde se ha demostrado mejorar la salud y la producción de los pollos de engorda. El ácido butírico producido por la fermentación microbiana de carbohidratos estructurales es la fuente energética para el mantenimiento y crecimiento del colonocito, incrementa la superficie de absorción de las vellosidades intestinales, promueve la producción de moco intestinal, ayuda con la función de barrera intestinal ya que estimula la expresión de la zónula occluden-1 (ZO-1), controla el crecimiento de enteropatógenos, y modula la respuesta inmune (Guilloteau y col., 2010, Wu y col., 2018). Así, usado como butirato de sodio promueve la salud intestinal; y en conjunto con aceites esenciales modifica la diversidad bacteriana en pollos desafiados con *Eimeria* spp. y *Clostridium perfringens* (Bortoluzzi y col., 2018). Se ha diseñado este trabajo con el objetivo de desafiar la hipótesis de que la alimentación incluyendo un extracto encapsulado de aliáceas (Ae) y butirato de sodio (B) mantiene el desempeño productivo, la salud intestinal y la pigmentación del pollo de engorda infectado con *Eimeria* spp. similar a la lograda por los de grupos

de pollo no infectados o infectados, pero con tratamiento anticoccidiano convencional.

➤ **Material y Métodos**

• **Norma ética**

Este protocolo experimental fue aprobado (doc. SICUAE-DC-2020/3-6) por el Comité de Ética de Bienestar y Experimentación Animal de la Universidad Nacional Autónoma de México en cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

• **Animales y diseño experimental**

El presente estudio duró 49 días; se usaron 2800 pollos machos de la estirpe Ross 308 de un día de edad, vacunados contra la enfermedad de Marek (vía subcutánea) en la incubadora; los días 12 y 24 de edad fueron vacunados contra la enfermedad de Newcastle (vía ocular y oral utilizando el agua de bebida, respectivamente). Las aves se recibieron en dos casetas contiguas, cada una con 35 corrales de 4 m² cada uno, limpios, desinfectados y con cama nueva de viruta de madera. Durante la primera semana, la temperatura se mantuvo con criadoras en 30°C, se disminuyó 2.5°C cada semana hasta la cuarta semana; posteriormente se reguló a temperatura ambiente (18 a 20°C) con el manejo de cortinas. La humedad se correspondió con la del medio ambiente. Los primeros 4 días de edad recibieron 23 h de luz y después se mantuvieron con el fotoperiodo natural.

Los pollos fueron asignados completamente al azar a uno de los siete grupos experimentales conformados con base en el no desafío (NC) o desafío (C) con *Eimeria* spp., y diferentes cantidades por tonelada de alimento de: extracto encapsulado de Aliáceas (Ae; 250, 500 g), butirato de sodio (B; 1000 g), salinomicina (Ion; 600 g). Los tratamientos fueron aplicados a partir del día 01 de edad. Los tratamientos experimentales fueron: NC, C, Clon, C250, C250B, C500 y

C500B. Los tres primeros fungieron como grupos controles: no desafiado sin tratamiento anticoccidiano; desafiado sin tratamiento anticoccidiano y desafiado con tratamiento anticoccidiano convencional, respectivamente.

- **Desafío con *Eimeria* spp.**

El día 12 de edad, los grupos desafiados (C) fueron inoculados en el ingluvis con 0.5 ml de una mezcla de ooquistes esporulados de *E. acervulina* 1×10^5 , *E. maxima* 2×10^4 , y *E. tenella* 2×10^4 . El grupo NC recibió de igual forma 0.5 ml de agua destilada. El inóculo se obtuvo de un laboratorio particular de parasitología (Mor, México) fue valorado por PCR y secuenciación Sanger en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro (anexo 1). Además, se analizaron: la titulación, el nivel de esporulación y la diferenciación de las especies de *Eimeria* spp. en la FMVZ-UNAM (anexo 2).

- **Extracto encapsulado de Aliáceas y dietas**

El extracto de Aliáceas fue encapsulado (Ae) en una matriz de dextrina y lecitina y valorado por cromatografía de gases - espectrometría de masas (GC-MS) su contenido de propilpropano tiosulfonato (12 g PTSO/kg de dieta) en el Centro de Investigación en Ciencias Aplicadas y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional (Qro., México). Para ello, se observó el tiempo de retención del PTSO (Pawliszyn, 2012) y se utilizaron las bases de datos de la Biblioteca de Espectros de Masas NIST/EPA/NIH (v. 1.7, USA).

El programa de alimentación consistió en dos fases (cuadro 1) que satisficieron las necesidades de la estirpe genética: Iniciación (día 01 al 21), Finalización (día 22 al 49), que incluyó por cada tonelada 1 g de pigmento rojo y 60 g de xantofilas. La base de las dietas fue elaborada con maíz - pasta de soya; se dividió en partes iguales para incluir Ae, B e Ion en los tratamientos correspondientes.

Cuadro 1. Ingredientes y composición química calculada (g/kg) y energía metabolizable (EM, Mcal/kg) de las dietas basales.

	Etapas	
	Iniciación	Finalización
Ingredientes	(g/kg)	(g/kg)
Maíz	553.21	604.22
Pasta de soya	391.00	323.00
Aceite de soya	15.00	38.50
Carbonato de calcio	14.30	12.60
Ortofosfato de calcio	9.70	7.20
Bicarbonato de sodio	5.50	4.30
DL metionina	3.62	2.86
Xantofilas 30	0.00	1.70
Sal	1.50	1.50
L-Lisina HCl	2.67	1.59
L-Treonina	1.40	0.86
Premezcla vitaminas y minerales ¹	0.87	0.77
Betaína anhidra	0.60	0.45
L-Valina	0.205	0.00
Biocolina	0.22	0.165
L Triptófano	0.075	0.165
Fitasa 5000	0.12	0.12
Composición química calculada		
Humedad (g/kg)	110.00	110.00
Proteína cruda (g/kg)	240.00	210.00
Extracto etéreo (g/kg)	38.10	62.50
Cenizas (g/kg)	57.80	49.80
Fibra cruda (g/kg)	25.80	24.60
EM (Mcal/kg)	3.05	3.25
Calcio total (g/kg)	9.90	8.50
Fósforo total (g/kg)	6.00	5.20
Sodio (g/kg)	2.30	1.90
Lisina (g/kg)	15.00	12.30
Xantofilas (g/kg)	0.008	0.06

¹ Contenido por kilogramo: acetato de retinol, 12 000 unidades Internacionales (UI); vitamina D₃, 5000 UI; DL acetato - α -tocoferol, 50 UI; vitamina K, 3 mg; tiamina, 3 mg; riboflavina, 9 mg; ácido pantoténico, 15 mg; piridoxina, 4 mg; biotina, 0.2 mg; ácido fólico, 2 mg; vitamina B₁₂, 0.02 mg; manganeso, 100 mg; zinc 100 mg; hierro, 40 mg; cobre, 15 mg; yodo, 1 mg; selenio, 0.35 mg.

- **Rendimiento productivo**

Los días 0, 21 y 49 de edad se registraron, los pesos (PC); mientras que, el consumo de alimento se cuantificó al finalizar cada fase de alimentación (día 21 y 49). En las mismas fechas se registraron los pesos y las edades de las aves muertas para calcular de acuerdo con Holdsworth y *col.* (2004) la ganancia diaria de peso (GDP), el consumo diario de alimento (CDA) y la conversión alimenticia (CA) de cada corral:

$$\begin{aligned}
 \text{a) GDP} &= \frac{\text{media de PC de las aves vivas} - \text{media de PC inicial de todas las aves}}{\text{días de prueba}} \\
 \text{b) CDA} &= \frac{\text{total de alimento consumido}}{\text{aves vivas} \times \text{días de prueba} + \text{aves muertas} \times \text{días en sobrevivencia}} \\
 \text{c) CA} &= \frac{\text{total de alimento consumido}}{\text{Peso ganado de las aves vivas} + \text{Peso ganado de las aves muertas}}
 \end{aligned}$$

- **Cuantificación de ooquistes y lesiones intestinales**

Los días 21, 28 y 35 de edad (correspondientes con los días 9, 16 y 23 post infección, p.i.) se recogieron en una bolsa de plástico nueva, del piso de cada corral, aproximadamente 10 g de materia fecal fresca que fueron mezclados y refrigerados (4°C) para el conteo de ooquistes (OPG, ooquistes por gramo de heces). Para ello, se mezclaron 5 g de la muestra por corral con una solución de cloruro de sodio RA (400 g NaCl/l), la mezcla se filtró usando una malla de 300 mesh. El filtrado se centrifugó a 800×g×2 min; del sobrenadante se tomó una alícuota, que se colocó en una cámara McMaster para contar los ooquistes (Long y *col.*, 1976) esporulados de *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella* de acuerdo con sus características morfológicas, utilizando un aumento de 10x. La variable OPG total se obtuvo de la sumatoria del conteo de las tres especies.

Los días 21, 28 y 35 de edad (9, 16 y 23 días p.i.) se revisaron las lesiones intestinales (LS) en duodeno, yeyuno y ciego. Para ello, se tomaron al azar diez

aves de cada tratamiento para su matanza humanitaria por dislocación cervical (NOM-062-ZOO-1999). El tracto gastrointestinal fue extraído y abierto longitudinalmente para valorar las LS macroscópicas provocadas por *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella*, de acuerdo con la escala de Johnson y Reid (1970). Asignando, 0 (cero) cuando no se observaron lesiones macroscópicas; 1, para lesiones mínimas; 2, lesiones moderadas; 3, lesiones graves; 4, lesiones extremadamente graves.

- **Índice anticoccidiano (IAC)**

La eficacia anticoccidiana se evaluó a los 21 días de edad, mediante el índice anticoccidiano utilizando la ecuación de Merk y col. (1976) que utiliza: el aumento de peso relativo, rPV; la tasa de ganancia de peso, TGP; la tasa de supervivencia, TS; la puntuación media de score de lesión intestinal total, TMLS; el valor de ooquistes por gramo de heces, OPG.

$$\text{IAC} = (\text{rPV} + \text{TS}) \times 100 - (\text{TMLS} \times 10 + \text{valor de OPG})$$

Donde:

$$\text{rPV} = \frac{\text{TGP de los grupos desafiados control no medicado o tratados con anticoccidianos}}{\text{TGP del grupo control no desafiados y no medicado}} \times 100$$

$$\text{TGP} = \frac{\text{PV final} - \text{PV inicial}}{\text{PV inicial}} \times 100$$

$$\text{TS} = \frac{\text{Número de aves finales vivas}}{\text{Número de aves iniciales totales}} \times 100$$

$$\text{TMLS} = \Sigma \text{ de LS causadas por las especies de } Eimeria \text{ spp.}$$

$$\text{OPG} = \frac{\text{OPG del control no desafiado no medicado o en los desafiados y con anticoccidianos}}{\text{OPG en el grupo control desafiado y no medicado}} \times 100$$

Wang y col. (2021).

- **Morfología intestinal**

A los 21, 28 y 35 días de edad se tomaron al azar diez aves de cada tratamiento, a las que se les dislocaron las vértebras cervicales de forma humanitaria (NOM-062-ZOO-1999); su tracto gastrointestinal fue extraído; se cortaron 2 cm de duodeno y 2 cm de yeyuno. El duodeno se identificó desde el proventrículo hasta los ductos biliares y el conducto pancreático, posterior a esta sección y hasta el divertículo de Meckel se localizó al yeyuno (de Verdal y *col.*, 2010).

Las muestras de cada segmento se enjuagaron con solución salina fisiológica y se colocaron en casetes para histología. En un histoquinete (American Optical® T/P 8000), las muestras se fijaron con formalina al 10 % bufferada, se deshidrataron e incluyeron en parafina. Los bloques fueron cortados a 4 µm de espesor (micrótomo Leica® RM 2125 RT), y se montaron en portaobjetos (de Verdal y *col.*, 2010), se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las laminillas fueron digitalizadas (procesador de imágenes Motic Images Plus 2.0). En cada segmento intestinal se localizaron las vellosidades íntegras bien definidas para medir su longitud, así como la profundidad de sus criptas intestinales. Se calcularon las relaciones de la altura de la vellosidad dividida por la profundidad de la cripta intestinal.

- **Xantofilas en plasma sanguíneo**

Los días 21, 28, 35 y 49 se sangraron 10 animales por tratamiento para la obtención de plasma para la cuantificación en el laboratorio de xantofilas (Allen, 1987); donde se agitaron 0.5 ml de plasma con 4.5 ml de acetona. La mezcla se centrifugó a 1500×g×10 min. Se cuantificaron las densidades ópticas de los sobrenadantes a 478 nm usando una curva estándar de luteína.

- **Pigmentación de piel**

Con un colorímetro triestímulo (Minolta cr300) se valoró la pigmentación tanto *in vivo* como en la canal fría (CF). En la piel del pollo vivo se hizo la valoración semanalmente en 10 aves de cada tratamiento desde los 21 hasta los 49 días de edad. El procedimiento se efectuó en una zona de la cara interna del ala, libre de plumas, sin interferencia de vasos sanguíneos (Cortés, 1996). A los 49 días, se sacrificaron las aves, se procesaron las canales y se colocaron en agua con hielo por dos horas, se seleccionaron al azar 10 pollos por tratamiento para valorar la pigmentación en la CF. Las variables registradas por el colorímetro son: 1) luminosidad (L^* ; desde el negro absoluto (0) hasta la iluminación total (100)); 2) enrojecimiento (a^* ; desde -60 color verde, hasta + 60 color rojo); 3) amarillamiento (b^* ; de -60 tonalidades azules, hasta +100 tonalidades amarillas). En este estudio se calculó el diferencial en amarillamiento (Δb^*) entre el día 49 y el día 21, día en el que se inició el aporte dietario de xantofilas (Tepox-Pérez, 2013).

- **Análisis Estadísticos**

El análisis estadístico se realizó usando el programa estadístico (JMP, 2019; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Las variables de producción (GDP, CDA, CA, IAC), integridad intestinal, xantofilas en plasma sanguíneo, pigmentación en pollo vivo, y en CF se analizaron con un ANDEVA para el diseño descrito anteriormente. La normalidad de los datos se comprobó mediante la prueba estadística Shapiro-Wilk y la homocedasticidad mediante la prueba Levene. Las diferencias entre medias se revisaron mediante la prueba de Tukey. Se realizaron 3 contrastes ortogonales: contraste I; Clon vs C250, C250B, C500 y C500B; contrasta el efecto del ionóforo vs el uso de Ae y Ae + B, contraste II; C0 vs C250, C250B, C500 y C500B; contrasta los efectos de la eimeriosis sin tratamiento vs animales con eimeriosis que reciben Ae y Ae + B, contraste III; C250, C500 vs C250B, C500B; contrasta el efecto del uso de Ae vs Ae + B. Las variables discretas (OPG y LS) fueron analizadas con estadística no paramétrica, usando la prueba de Kruskal Wallis y como prueba post-hoc se utilizó la de Steel-Dwas. Se reportan la mediana y los cuantiles que muestran

el rango de q25 a q75 de los resultados de ambas variables. Se realizó un estudio de correlación Rho (ρ) de Spearman entre todas las variables de estudio. La significancia se fijó en $p < 0.05$ y la tendencia en $p < 0.1$.

➤ Resultados

• Rendimiento productivo

Los resultados de la suplementación dietaria con extracto encapsulado de aliáceas y butirato de sodio en las variables productivas (GDP, CDA y CA) de pollo de engorda desafiado con *Eimeria* spp. se presentan en el cuadro 2. El impacto negativo más importante sobre las variables en estudio se presentó en la fase de iniciación (día 1 a 21); lo que repercutió en los resultados de todo el ciclo de engorda (día 1 a 49). Los resultados muestran que, en la fase de iniciación, los animales del control negativo (NC0) tuvieron la mayor ($p < 0.05$) GDP (41.8 ± 0.50 g) respecto a los demás grupos experimentales (34.7 ± 0.18 g). Los consumos diarios de alimento de los grupos NC0 y del control desafiado con medicación convencional (Clon) no fueron diferentes ($p > 0.05$; 56.5 ± 0.25 vs. 55.6 ± 0.56 g respectivamente); pero, el CDA de NC0 (56.5 ± 0.25) fue mayor respecto a los otros grupos experimentales (C0, C250, C250B C500 y C500B; 53.27 ± 0.19 g). El grupo NC0 presentó el mejor índice de conversión de alimento respecto a los otros grupos experimentales, así, la CA del grupo desafiado sin tratamiento (C0) fue de 1.18 veces mientras que la de los otros grupos (C250, C250B, C500B, C500) fue de 1.11 veces respecto a NC0. En la fase de finalización (día 22 al 49) no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en las variables GDP, CDA, CA entre los siete grupos experimentales. Es decir, los animales se recuperaron de la infección comportándose productivamente como el control no desafiado (NC0). Los efectos observados en la GDP en la fase de inicio (día 1 al 21) impactaron en el acumulado de la engorda (día 1 – 49) estableciéndose la diferencia ($p < 0.05$) entre NC0 y los grupos C0, C250B, C500, y C500B (68.6 ± 0.55 vs. 65.1 ± 0.28). Cabe señalar que en esta fase la GDP no fue

diferente ($p > 0.05$) entre NC0, Clon y C250 (68.6 ± 0.55 vs. 66.5 ± 0.53). En cuanto a NC0 tuvo mayor CDA que los grupos C0, C250 y C250B (121.90 ± 0.41 vs 118.8 ± 0.34 g, respectivamente). Sin embargo, el CDA de los grupos Clon, C500, C500B y NC0 no fue diferente entre sí ($p > 0.05$; 120.2 ± 0.32 g). La CA acumulada no fue diferente entre grupos ($p > 0.05$, 1.87 ± 0.01).

En relación con los resultados de contrastes realizados, estos fueron significativos en la etapa inicial (día 1 a 21). El contraste I mostró que el uso del ionóforo (grupo Clon) favoreció ($p < 0.05$) al consumo diario de alimento (CDA, 55.6 ± 0.56 g), respecto a los grupos que recibieron Ae y Ae + B (53.05 ± 0.20 g). Pero, la GDP no se vio favorecida ($p > 0.05$) por el mayor CDA. Por lo tanto, la CA de Clon fue mayor que la de los grupos Ae y Ae + B ($p < 0.05$; 1.59 ± 0.02 vs 1.53 ± 0.01 , respectivamente), situación que se revierte en la etapa de finalización ($p < 0.05$) 1.92 ± 0.02 para Clon vs. 1.99 ± 0.02 para Ae y Ae +B. El contraste II permitió observar que el uso de Ae y Ae + B fue beneficioso en el control de la eimeriosis experimental ya que los grupos C250, C250B, C500 y C500B tuvieron un mejor ($p < 0.05$) comportamiento productivo (GDP, 34.85 ± 0.23 g; CDA, 53.05 ± 0.20 g y CA, 1.53 ± 0.01) respecto al grupo C0 (GDP, 33.9 ± 0.50 g; CDA, 54.1 ± 0.25 g y CA, 1.61 ± 0.02). Los resultados de los contrastes en la fase de finalización (día 22 a 49) muestran un comportamiento productivo (GDP, CDA, CA) no diferente ($p > 0.05$) entre los grupos contrastados. Sin embargo, en el comportamiento acumulado (día 1 a 49) se observó una tendencia ($p \leq 0.1$) a una mejor GDP cuando se usó Clon respecto a los grupos que recibieron Ae (C250, C500) y Ae + B (C250B, C500B); en tanto la GDP de los cuatro últimos tendió a ($p < 0.1$) ser mejor que en animales con eimeriosis no tratados (C0).

Los resultados del contraste III mostraron que el uso de butirato de sodio no tiene afecto adicional al uso de Ae, ya que no se observaron diferencias ($p < 0.05$) en el comportamiento productivo (GDP, CDA, CA), en las fases de inicio, finalización, ni en el acumulado entre los grupos contrastados.

Cuadro 2. Peso vivo inicial (PVI, g), ganancia diaria de peso (GDP, g), consumo diario de alimento (CDA, g) y conversión alimenticia (CA, g/g) de pollos de engorda Ross 308, no desafiados (NC) o desafiados (C) con *Eimeria* spp¹, alimentados con una dieta maíz-soya suplementada con extracto encapsulado de Aliáceas (Ae; 0, 250, 500; g/t de alimento), butirato de sodio (B, 1000 g/t de alimento), o salinomicina (Ion, 60 g/t de alimento)

Ítem	Tratamientos							Valor de P	EEM ¹	Contrastes		
	NC0	C0	C250	C250B	C500	C500B	Clon			I ²	II ³	III ⁴
	Valor de P											
PVI	42.90	43.10	42.90	42.90	43.00	43.00	43.10	0.97	0.21	0.53	0.56	0.96
Fase Iniciación (1-21d)												
GDP	41.80 ^a	33.90 ^b	35.20 ^b	34.90 ^b	34.40 ^b	34.90 ^b	35.10 ^b	<0.001	0.46	0.59	0.05	0.90
CDA	56.50 ^a	54.10 ^{bc}	53.10 ^c	52.40 ^c	53.20 ^c	53.50 ^c	55.60 ^{ab}	<0.001	0.41	<0.001	0.02	0.73
CA	1.36 ^d	1.61 ^a	1.51 ^c	1.51 ^c	1.55 ^{abc}	1.54 ^{abc}	1.59 ^{ab}	<0.001	0.02	0.004	<0.001	0.65
Fase Finalización (22-49d)												
GDP	88.80	86.90	89.40	87.80	88.70	88.40	90.40	0.39	1.09	0.13	0.18	0.40
CDA	174.30	170.50	171.50	170.10	172.30	171.80	170.30	0.19	1.17	0.40	0.49	0.43
CA	2.04	2.00	1.98	1.99	1.99	1.99	1.92	0.17	0.03	0.04	0.66	0.76
Acumulado (1-49d)												
GDP	68.60 ^a	64.20 ^b	66.20 ^{ab}	65.10 ^b	65.40 ^b	65.50 ^b	66.70 ^{ab}	<0.001	0.64	0.10	0.06	0.44
CDA	121.90 ^a	119.20 ^b	119.00 ^b	118.00 ^b	119.60 ^{ab}	119.40 ^{ab}	119.80 ^{ab}	0.002	0.59	0.22	0.75	0.38
CA	1.85	1.91	1.86	1.87	1.89	1.88	1.84	0.32	0.02	0.17	0.17	0.85

^{abc} Literales diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

¹ Desafío con ooquistes esporulados de *Eimeria acervulina* 1×10^5 , *E. maxima* 2×10^4 y *E. tenella* 2×10^4

² EEM, error estándar de la media

Contrastes: ³ I; Clon vs C250, C250B, C500 y C500B. ⁴ II; C0 vs 250, C500, C250B y C500B. ⁵ III; C250 y C500 vs C250B y C500B

- **Severidad de la infección**

- **Excreción fecal de ooquistes de *Eimeria* spp.**

Si bien, se aplicaron rigurosas medidas sanitarias para mantener el grupo NC0 libre de infección parasitaria esto no sucedió; ya que en el día 21 se observaron en la muestra fecal de uno de los corrales, ooquistes de *E. máxima*. Además, en los muestreos subsecuentes 25, 35 días, se observaron ooquistes de *E. acervulina* (7, 3 corrales, respectivamente), *E. máxima* (2, 1 corral, respectivamente) y *E. tenella* (1, 1 corral, respectivamente). La infección en todos los casos es calificada como muy leve ya que no se observaron signos clínicos, el conteo de ooquistes excretados (OPG) fue poco importante, aunado a la ausencia de lesiones intestinales (LS) macroscópicas en las aves. La presencia de ooquistes en el grupo NC0 pudiera atribuirse a una contaminación por la proximidad con las aves de los grupos desafiados. El efecto de la contaminación no resultó en efectos decreméntales en los resultados de las variables estudiadas.

En el cuadro 3 se presentan los resultados del efecto del uso de Ae, Ae + B e ionóforo sobre la excreción de ooquistes por gramo de heces (OPG) de pollos de engorda desafiados por *Eimeria* spp. En concordancia con lo observado en el comportamiento productivo, la excreción más importante de ooquistes (OPG; totales, *E. acervulina*, *E. tenella*) se observó al día 21 de edad, cuando el grupo NC0 tuvo la menor ($p < 0.05$) mediana de excreción de OPG totales y *E. acervulina* (OPG, 0 para las dos variables), en comparación con los otros 6 grupos experimentales. En cuanto a *E. tenella*, el grupo NC0 tuvo una mediana menor ($p < 0.05$) de excreción de OPG respecto a los grupos (Clon, C250, C500, C250B y C500B). La excreción de ooquistes total (OPG total) estuvo asociada ($p < 0.05$) a las variables productivas GDP22-49 (-0.34), GDP0-49 (-0.37), CA22-49 (0.27), CA0-49 (0.32). En los días 28 y 35, no se encontraron diferencias ($p > 0.05$) en la excreción fecal de ooquistes entre los grupos experimentales. La excreción de ooquistes por gramo de heces de *E. máxima* no fue diferente ($p < 0.05$) ni entre grupos experimentales, en los tres muestreos (días 21, 28 y 35).

- **Lesiones intestinales**

Los resultados del puntaje de las lesiones intestinales (LS; cuadro 4) fueron en el mismo sentido de lo observado para OPG, ya que las diferencias ($p < 0.05$) se presentaron al día 21 (9 días p. i.) para las LS de duodeno, yeyuno, ciego y totales; lo que va en el mismo sentido que los resultados obtenidos para OPG. Así, LS en duodeno fue menor ($p < 0.05$) en NC0, C250, C250B, y Clon que para C0; LS en yeyuno fue menor ($p < 0.05$) en NC0 que en C0; LS en ciego fue menor ($p < 0.05$) en NC0, C250, C250B, y Clon que en C500B y C0; mientras que TMLS fue menor ($p < 0.05$) en NC0 que en C0, C500, y C500B. Las excreciones totales de ooquistes a los 21 y 28 días se relacionaron positivamente con la TMLS21 (0.39 $p < 0.01$; 0.26, $p < 0.05$; respectivamente). Por otro lado, TMLS21 se asoció negativamente con GDP0-21 (-0.39, $p < 0.01$).

Al día 28 la única diferencia se observó en TMLS donde NC0 fue menor que C0, y C500B ($p < 0.05$). TMLS21 estuvo relacionada positivamente con TMLS28 (0.31, $p < 0.01$). Al día 35, las diferencias ($p < 0.05$) sólo se observaron en yeyuno y en TMLS en donde NC0 y C0 fueron menores que C250B.

Cuadro 3. Medianas y rangos (Q25 – Q75) de ooquistes por gramo de heces (OPG) en pollos de engorda Ross 308, no desafiados (NC) o desafiados (C) con *Eimeria* spp¹, alimentados con una dieta maíz-soya suplementada con extracto encapsulado de Aliáceas (Ae; 0, 250, 500; g/t de alimento), butirato de sodio (B; 1000 g/t de alimento), o salinomicina (Ion, 60 g/t de alimento)

Días	Tratamientos							H (Ji ²)	Valor de P
	NC0	C0	C250	C250B	C500	C500B	Clon		
				OPG Total					
21	0 ^b	55700 ^a	36750 ^a	82500 ^a	65750 ^a	36750 ^a	21500 ^a	28.14	<0.001
	(0 - 0)	(14625 - 247725)	(19900 - 93300)	(54625 - 102375)	(27800 - 108800)	(12775 - 146262)	(4350 - 81100)		
28	350	5000	5800	2175	1000	2100	5150	7.08	0.31
	(37 - 7812)	(200 - 15450)	(1150 - 10775)	(1225 - 11762)	(75 - 11550)	(225 - 29475)	(2062 - 14700)		
35	0	2850	1175	0	425	0	200	10.92	0.09
	(0 - 5550)	(287 - 4812)	(0 - 2700)	(0 - 412)	(0 - 1525)	(0 - 787)	(0 - 6912)		
				OPG <i>E. acervulina</i>					
21	0 ^b	26700 ^a	25800 ^a	63250 ^a	54550 ^a	24600 ^a	12450 ^a	30.5	<0.001
	(0 - 0)	(8150 - 217875)	(9625 - 61525)	(33300 - 95925)	(27800 - 95225)	(1262.5 - 123925)	(3175 - 36000)		
28	150	4200	5800	1250	1000	1000	4500	9.52	0.14
	(0 - 900)	(200 - 15375)	(625 - 10775)	(175 - 6550)	(0 - 11550)	(75 - 29475)	(1612 - 14625)		
35	0	300	75	0	0	0	0	5.33	0.50
	(0 - 525)	(0 - 4025)	(0 - 1475)	(0 - 0)	(0 - 1125)	(0 - 475)	(0 - 2975)		
				OPG <i>E. maxima</i>					
21	0	1300	0	825	1050	600	675	7.49	0.27
	(0 - 0)	(0 - 11175)	(0 - 9100)	(0 - 3450)	(0 - 6925)	(0 - 8650)	(0 - 18675)		
28	0	0	0	0	0	0	0	2.63	0.85
	(0 - 0)	(0 - 0)	(0 - 0)	(0 - 100)	(0 - 0)	(0 - 0)	(0 - 0)		
35	0	0	0	0	0	0	0	7.14	0.30
	(0 - 25)	(0 - 287)	(0 - 575)	(0 - 100)	(0 - 0)	(0 - 0)	(0 - 0)		
				OPG <i>E. tenella</i>					
21	0 ^b	600 ^{ab}	4250 ^a	7300 ^a	1975 ^a	11200 ^a	1450 ^a	18.49	0.005
	(0 - 0)	(0 - 56225)	(0 - 15800)	(0 - 20275)	(0 - 14650)	(20 - 26450)	(0 - 14225)		
28	0	0	0	300	0	0	0	13.28	0.11
	(0 - 0)	(0 - 275)	(0 - 137)	(75 - 2737)	(0 - 25)	(0 - 225)	(0 - 662)		
35	0	0	0	0	0	0	0	7.41	0.28
	(0 - 0)	(0 - 750)	(0 - 262)	(0 - 0)	(0 - 450)	(0 - 0)	(0 - 50)		

^{ab} Literales diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

¹ Desafío con ooquistes esporulados de *Eimeria acervulina* 1×10^5 , *E. maxima* 2×10^4 y *E. tenella* 2×10^4

Cuadro 4. Medianas y rangos (Q25 – Q75) del puntaje de las lesiones en diferentes segmentos del intestino y totales (TMLS) en pollos de engorda Ross 308, no desafiados (NC) o desafiados (C) con *Eimeria* spp¹, alimentados con una dieta maíz-soya suplementada con extracto encapsulado de Alíáceas (Ae; 0, 250, 500; g/t de alimento), butirato de sodio (B; 1000 g/t de alimento), o salinomicina (Ion; 60 g/t de alimento)

	Días	Tratamientos							H (Ji ²)	Valor de P
		NC0	C0	C250	C250B	C500	C500B	Clon		
Duodeno	21	0 ^d	1.5 ^a	0 ^{cd}	0 ^{cd}	1 ^{ab}	1 ^{ab}	0.5 ^{bcd}	37.95	<0.0001
		(0 - 0)	(1 - 2)	(0 - 1)	(0 - 1)	(0.7 - 1)	(1 - 1)	(0 - 1)		
	28	0	0.5	0	0	0	0	0	6.69	0.35
		(0 - 0)	(0 - 1)	(0 - 1)	(0 - 1)	(0 - 1)	(0 - 1)	(0 - 0.2)		
	35	0	0	0	0	0	0	0	6.00	0.42
		(0 - 0)	(0 - 0)	(0 - 0)	(0 - 0)	(0 - 0)	(0 - 0)	(0 - 0)		
Yeyuno	21	0 ^b	1 ^a	0 ^{ab}	0 ^{ab}	0 ^{ab}	0 ^{ab}	0 ^{ab}	15.12	0.02
		(0 - 0)	(0 - 2)	(0 - 1)	(0 - 0.2)	(0 - 1)	(0 - 0.2)	(0 - 0)		
	28	0	0	0	0	0	0	0	6.79	0.34
		(0 - 0)	(0 - 0)	(0 - 0)	(0 - 0)	(0 - 0.2)	(0 - 0)	(0 - 0)		
	35	0 ^b	0 ^b	0 ^{ab}	1 ^a	1 ^{ab}	0 ^{ab}	0 ^{ab}	24.18	0.0005
		(0 - 0)	(0 - 0)	(0 - 1)	(0.7 - 1)	(0 - 1)	(0 - 1)	(0 - 2)		
Ciego	21	0 ^b	1 ^a	0 ^b	0 ^b	0 ^{ab}	1 ^a	0 ^b	28.02	<0.0001
		(0 - 0)	(0 - 2)	(0 - 0)	(0 - 0)	(0 - 1.2)	(0 - 1)	(0 - 0)		
	28	0	0	0	0	0	0.5	0	9.68	0.13
		(0 - 0)	(0 - 1.2)	(0 - 1.2)	(0 - 0)	(0 - 0.2)	(0 - 2)	(0 - 0)		
	35	0	0	0	0	0	0	0	6.00	0.42
		(0 - 0)	(0 - 0)	(0 - 0)	(0 - 0)	(0 - 0)	(0 - 0)	(0 - 0)		
TMLS	21	0 ^c	4 ^a	1 ^{bc}	0 ^{bc}	2 ^{ab}	2.5 ^a	1 ^{bc}	41.41	<0.0001
		(0 - 0)	(2.7 - 4.2)	(0 - 1.2)	(0 - 1)	(0.7 - 4.2)	(1.7 - 4)	(0 - 1)		
	28	0 ^b	1 ^a	1 ^{ab}	0 ^{ab}	0.5 ^{ab}	1 ^a	0 ^{ab}	14.52	0.02
		(0 - 0)	(0 - 2.2)	(0 - 1.2)	(0 - 1.2)	(0 - 1.2)	(0 - 2)	(0 - 1)		
	35	0 ^b	0 ^b	0 ^{ab}	1.5 ^a	1 ^{ab}	0 ^{ab}	0 ^{ab}	27.79	<0.0001
		(0 - 0)	(0 - 0)	(0 - 1)	(1 - 2)	(0 - 1.2)	(0 - 1.2)	(0 - 1)		

^{abcd} Literales diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

¹ Desafío con ooquistes esporulados de *Eimeria acervulina* 1×10^5 , *E. maxima* 2×10^4 y *E. tenella* 2×10^4

○ Índice anticoccidiano

El índice anticoccidiano (IAC) es una medida calculada que muestra el efecto del tratamiento tanto en el peso del pollo, como en la protección anticoccidiana, siendo que mientras mayor sea el valor calculado mejor efecto tendrá el anticoccidiano contra el desafío por *Eimeria* spp. (Wang y col., 2021). En el cuadro 5 se muestra que el IAC fue mayor ($p < 0.05$) para los grupos NC0, Clon, C250 que para C0. Los otros tratamientos no fueron diferentes ($p > 0.05$) entre sí, ni con respecto a los grupos mencionados. Por otra parte, el resultado del contraste II (C0 vs C250, C250B, C500 y C500B) mostró que el IAC se vio favorecido ($p < 0.05$) por el uso de Ae (C250, C500) y Ae + B (C250B, C500B) respecto a la infección coccidial que no recibe tratamiento (C0). Los contrastes I y III no fueron significativos ($p > 0.05$).

Cuadro 5. Peso vivo relativo (rPV), tasa de sobrevivencia (TS), total de lesiones intestinales (TLSM), valor de ooquistes por gramo de heces (OPG) e índice anticoccidiano (IAC), de pollos de engorda Ross 308, de 21 días edad, no desafiados (NC) o desafiados (C) con *Eimeria* spp¹, alimentados con una dieta maíz-soya suplementada con extracto encapsulado de Aliáceas (Ae; 0, 250, 500; g/t de alimento), butirato de sodio (B, 1000 g/t de alimento), o salinomicina (Ion, 60 g/t de alimento)

Variable ⁴	Tratamientos								Valor de P	Contrastes		
	NC0	C0	C250	C250B	C500	C500B	Clon	EEM ²		I ³	II ⁴	III ⁵
	Valor de P											
rPV %	100	80.7	84.3	83.6	82.2	83.2	83.7					
TS %	99.1	98.4	98.8	99.3	98.2	98.4	98.6					
TMLS *10	0	36	8	5	23	27	8					
Valor OPG %	0.16	100	27.7	41.2	40.8	41.7	23.7					
IAC	198.9 ^a	43.2 ^b	147.5 ^a	136.7 ^{ab}	116.6 ^{ab}	113.0 ^{ab}	150.7 ^a	22.1	0.0006	0.37	0.001	0.75

^{ab} Literales diferentes en la misma fila indican diferencia significativa (P < 0.05).

¹ Desafío con ooquistes esporulados de *Eimeria acervulina* 1x10⁵, *E. maxima* 2x10⁴ y *E. tenella* 2x10⁴.

² EEM, error estándar de la media

Contrastes ³ I; Clon vs C250, C250B, C500 y C500B. ⁴ II; C0 vs. C250, C250B, C500 y C500B. ⁵ III; C250 y C500 vs. C250B y C500B.

- **Morfología intestinal**

En el cuadro 6 se presentan los resultados correspondientes a la morfología de duodeno y yeyuno: longitud de vellosidades (V), profundidad de criptas (C) y la relación entre ambas (V/C), obtenidos los días 21, 28 y 35 de edad. Mientras que el cuadro 7 contiene las correlaciones ρ de Spearman que fueron detectadas entre la morfología intestinal y las variables GDP, CA, OPG y TMLS.

Al día 21 se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$), en donde la V en duodeno fueron más largas en NC0, Clon ($1873 \pm 44.71 \mu\text{m}$) respecto a C250 ($1430 \pm 81.94 \mu\text{m}$), lo que representó una reducción del 23.6% en la longitud de las V. Por el contrario, C fue menor ($p < 0.05$) en C250, NC0, C0, Clon ($259.3 \pm 5.21 \mu\text{m}$) que en C250B, C500B, C500 ($332.67 \pm 5.83 \mu\text{m}$). Así, las mayores relaciones V/C fueron para NC0, Clon ($7.55 \pm 0.23 \mu\text{m}$) respecto a los otros cinco grupos ($5.16 \pm 0.13 \mu\text{m}$). Los resultados de los contrastes mostraron: contraste I, que el tratamiento con ionóforo (Clon) favoreció ($p < 0.05$) una mayor V, menor C y mayor relación V/C, respecto al uso de Ae (C250, C500) y Ae + B (C250B, C500B); contraste II, un efecto ($p < 0.05$) del uso de Ae y Ae + B en la mayor C, y menor relación V/C, en comparación con C0. Mientras que el contraste III mostró mayores ($p < 0.05$) V y C cuando se usa Ae + B (C250B, C500B) que cuando sólo se usa Ae (C250, C500). La V y la relación V/C (cuadro 7) a los 21 días estuvieron asociadas ($p < 0.01$) positivamente con la GDP (0 – 21; 0 – 49) y negativamente ($p < 0.05$) con la CA acumulada (0 – 49); también se observaron asociaciones negativas ($p < 0.01$) entre los OPG y el TMLS, ambos a los 21 días y la V al día 21. En el mismo sentido, se observó una asociación ($p < 0.05$) negativa de las TMLS21 con la relación V/C 21d.

En el caso del yeyuno a los 21 días, NC0 y C500B tuvieron mayor ($p < 0.05$) V ($1088 \pm 57.1 \mu\text{m}$) que C0, Clon, y C250 ($767.67 \pm 34.74 \mu\text{m}$). Las C fueron menores ($p < 0.05$) en NC0, Clon, y C0 ($183.57 \pm 12.18 \mu\text{m}$) que en C250B, y C500B ($256 \pm 10 \mu\text{m}$). Por lo tanto, la relación V/C fue mayor ($p < 0.05$) en NC0 ($6.0 \pm 0.4 \mu\text{m}$) respecto a C500B, C250B, C500, C250 (4.1 ± 0.13). Los resultados de los contrastes en el

yeyuno mostraron que: en el contraste I, la V y la C se favorecieron ($p < 0.05$) con el uso dietario de Ae y Ae + B, no así la relación V/C que fue mayor ($p < 0.05$) en el grupo Clon. Mientras que en el contraste II, Ae y Ae + B tuvieron la tendencia ($p < 0.1$) a longitudes mayores de V, mayor ($p < 0.05$) valor de C, pero menor ($p < 0.05$) relación V/C respecto a C0. En cuanto al contraste III, se encontraron mayores ($p < 0.05$) V y C cuando se usa Ae + B, respecto a cuando se usó únicamente el extracto encapsulado de aliáceas (Ae). En el caso de la V en yeyuno al día 21 (cuadro 7) se observó relación positiva ($p < 0.05$) con la GDP (0 – 21), así mismo, la V/C en yeyuno tuvo también una relación positiva ($p < 0.01$) con GDP (0 - 21 y 0 - 49).

Al día 28, la V del duodeno fue mayor ($p < 0.05$) en NC0 (1963 ± 45.2 um) respecto a C500B, C250, Clon, C500, C0 (1641 ± 23.31 um); sin embargo, no hubo diferencia entre NC0 y C250B (1963 ± 45.2 um vs. 1763 ± 71.4 um). En contraparte, la menor ($p < 0.05$) C fue observada para NC0 respecto a C0. Así, la relación V/C fue mayor ($p < 0.05$) en NC0 (9 ± 0.47) en comparación con el resto de los tratamientos (5.42 ± 0.13). A los 28 días los contrastes I y III no tuvieron diferencias significativas ($p > 0.05$), mientras que el contraste II mostró que C0 tuvo en duodeno una mayor ($p < 0.05$) C y menor relación V/C respecto a pollos que recibieron el extracto de aliáceas (Ae, C250, C500), y Ae con butirato de sodio (C250B, C500B). La V y la relación V/C a los 28 días estuvieron asociadas ($p < 0.05$) positivamente con la GDP (0 – 21, 0 – 49). En tanto, TMLS 21 estuvo negativamente asociada ($p < 0.05$) con V; mientras que OPG21 y TMLS21 se asociaron ($p < 0.05$) también negativamente con V/C a los 28 días (cuadro 7).

En yeyuno a los 28 días de edad, V fue mayor ($p < 0.05$) en NC0 (1093 ± 87.1 um) respecto a C0 (791 ± 57.3 um), los otros grupos no fueron diferentes entre ellos ($p > 0.05$) ni con respecto a los dos grupos ya mencionados. La C no fue diferente ($p > 0.05$, 223.14 ± 14 um) entre los grupos experimentales. La relación V/C fue mayor ($p < 0.05$) en NC0 (6 ± 0.29) respecto a los otros 6 grupos (4.05 ± 0.10). No hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) en ninguno de los tres contrastes planteados. El

tamaño de V del yeyuno estuvo asociado positivamente con la GDP (0 – 21, $p < 0.05$); la V/C se relacionó también en sentido positivo ($p < 0.01$) con la GDP (0 – 21, 0 – 49). En Tanto OPG como TMLS a los 21 días se asociaron ($p < 0.05$) negativamente con V y la relación V/C observadas en yeyuno a los 28 días.

En el mismo sentido que los resultados de la *morfología* observada a los 21 y 28 d, al día 35, se observaron efectos de los tratamientos en V, C y V/C. En el caso de las V del duodeno, NC0 tuvo la mayor ($p < 0.05$) longitud (2030 ± 95.3 um) en comparación con C0, C500, C250B, C250 (1689.25 ± 26.9 um); mientras que C500B y Clon no fueron diferentes ($p > 0.05$) de ningún otro tratamiento. La diferencia ($p < 0.05$) en la C se estableció entre NC0 y C0 (299 ± 10.3 um) en comparación de C250 y C500 (228.5 ± 9.3 um). De esta manera, la relación V/C fue mayor ($p < 0.05$) en C500 (8.1 ± 0.33 um) que en C0 (6.1 ± 0.25). Los otros grupos no fueron diferentes ($p > 0.05$) entre sí, ni en comparación con C500 y C0. A los 35 días el contraste I no mostró diferencias estadísticas ($p > 0.05$), mientras que el contraste II mostró el mismo comportamiento que lo observado a los 28 días, es decir que el grupo C0 tuvo en duodeno mayor ($p < 0.05$) C y menor relación V/C en comparación con los grupos de Ae (C250, C500), y Ae + B (C250B, C500B). En cuanto al contraste III, los grupos Ae (C250, C500), tuvieron menor ($p < 0.05$) C y una tendencia a mayor ($p = 0.06$) relación V/C respecto a los grupos con Ae + B (C250B, C500B). La V del duodeno (cuadro 7) a los 35 días se asoció positivamente ($p < 0.05$) con la GDP (0-21, 0-49).

Los efectos de los tratamientos en la morfología del yeyuno a los 35 días, sólo se mostró en las C, que fueron más profundas en C250B (247 ± 8.0 um) respecto a C0, C500B (185 ± 9.6 um). Los contrastes no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) para los grupos contrastados, en lo referente a los resultados del yeyuno; tampoco se asoció ($p > 0.05$) con las otras variables en estudio.

Cuadro 6. Longitud de vellosidades (V; μm), profundidad de criptas (C; μm), y relación V/C en pollos de engorda Ross 308, no desafiados (NC) o desafiados (C) con *Eimeria* spp¹, alimentados con una dieta maíz-soya suplementada con extracto encapsulado de Aliáceas (Ae; 0, 250, 500; g/t de alimento), butirato de sodio (B; 1000 g/t de alimento), o salinomicina (Ion; 60 g/t de alimento)

Días	Ítem	Tratamientos							EEM ²	Valor de P	Contrastes		
		NC0	C0	C250	C250B	C500	C500B	Clon			I ³	II ⁴	III ⁵
		Duodeno											
21	V	1955 ^a	1462 ^{bc}	1430 ^c	1660 ^{bc}	1444 ^{bc}	1502 ^{bc}	1719 ^{ab}	66	0.0001	0.006	0.53	0.034
	C	262 ^b	254 ^b	278 ^b	337 ^a	326 ^a	335 ^a	243 ^b	10	0.0001	0.0001	0.0001	0.001
	V/C	7.9 ^a	5.8 ^b	5.3 ^{bc}	5.2 ^{bc}	4.7 ^c	4.7 ^c	7.2 ^a	0.26	0.0001	0.0001	0.003	0.82
28	V	1963 ^a	1599 ^b	1683 ^b	1763 ^{ab}	1613 ^b	1685 ^b	1625 ^b	49	0.0001	0.27	0.12	0.13
	C	218 ^c	371 ^a	308 ^b	338 ^{ab}	326 ^{ab}	319 ^{ab}	309 ^b	13	0.0001	0.34	0.001	0.37
	V/C	9.0 ^a	4.4 ^b	5.8 ^b	5.6 ^b	5.4 ^b	5.6 ^b	5.7 ^b	0.33	0.0001	0.85	0.002	0.98
35	V	2030 ^a	1719 ^b	1625 ^b	1698 ^b	1715 ^b	1840 ^{ab}	1786 ^{ab}	65	0.002	0.37	0.99	0.13
	C	305 ^a	293 ^a	234 ^b	259 ^{ab}	223 ^b	260 ^{ab}	265 ^{ab}	13	0.0002	0.14	0.0009	0.02
	V/C	7.2 ^{ab}	6.1 ^b	7.5 ^{ab}	6.8 ^{ab}	8.1 ^a	7.5 ^{ab}	7.3 ^{ab}	0.34	0.006	0.68	0.0008	0.06
		Yeyuno											
21	V	1114 ^a	807 ^b	743 ^b	966 ^{ab}	911 ^{ab}	1062 ^a	753 ^b	56	0.0001	0.009	0.07	0.0013
	C	192 ^c	177 ^c	199 ^{bc}	265 ^a	240 ^{ab}	247 ^a	180 ^c	10	0.0001	0.0001	0.0001	0.0007
	V/C	6.0 ^a	4.8 ^{ab}	3.9 ^b	4.0 ^b	4.0 ^b	4.5 ^b	4.9 ^{ab}	0.29	0.0001	0.01	0.03	0.32
28	V	1093 ^a	791 ^b	914 ^{ab}	1020 ^{ab}	854 ^{ab}	817 ^{ab}	816 ^{ab}	69	0.02	0.31	0.16	0.62
	C	192	233	224	246	245	209	213	14	0.06	0.23	0.87	0.61
	V/C	6.0 ^a	3.7 ^b	4.4 ^b	4.4 ^b	3.7 ^b	4.1 ^b	4.0 ^b	0.24	0.0001	0.70	0.08	0.39
35	V	872	870	918	1089	836	867	895	73	0.26	0.69	0.48	0.17
	C	230 ^{ab}	187 ^b	199 ^{ab}	247 ^a	193 ^{ab}	183 ^b	196 ^{ab}	14	0.01	0.55	0.22	0.17
	V/C	3.9	4.9	4.8	4.6	4.6	4.9	4.8	0.28	0.23	0.81	0.68	0.92

^{abc} Literales diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

¹ Desafío con ooquistes esporulados de *Eimeria acervulina* 1×10^5 , *E. maxima* 2×10^4 y *E. tenella* 2×10^4

² EEM, error estándar de la media.

Contrastes: ³ I; Clon vs C250, C250B, C500 y C500B. ⁴ II; C0 vs 250, C500, C250B y C500B. ⁵ III; C250 y C500 vs C250B y C500B

Cuadro 7. Correlaciones ρ de Spearman de ganancia de peso (GDP), conversión alimenticia (CA), ooquistes por gramo de heces (OPG), total de lesiones intestinales (TMLS), longitud de vellosidades (V), y profundidad de criptas intestinales (C) de duodeno (D) y yeyuno (Y), relación V/C, a diferentes días (21, 28, 35) de edad de pollos de engorda Ross 308, sin o con desafío con *Eimeria* spp¹ alimentados con una dieta maíz-soya y suplementada con extracto encapsulado de Aliáceas² y/o butirato de sodio³, o salinomicina⁴

Ítem	Duodeno					Yeyuno			
	21		28		35	21		28	
	V	V/C	V	V/C	V	V	V/C	V	V/C
GDP0-21	0.47***	0.49***	0.47***	0.68***	0.42**	0.25*	0.43**	0.33**	0.60***
GDP0-49	0.30**	0.39**	0.29*	0.42***	0.26*		0.32**		0.36**
CA0-49	-0.25*	-0.25*							
OPG21	-0.30**			-0.29*				-0.28*	-0.29**
TMLS21	-0.37**	-0.26*	-0.24*	-0.41**				-0.33**	-0.38**

*P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.0001

¹ Ooquistes esporulados de *Eimeria acervulina* 1×10^5 , *E. maxima* 2×10^4 y *E. tenella* 2×10^4

² Extracto encapsulado de Aliáceas (250, 500 g/t de alimento)

³ Butirato de sodio (1000 g/t de alimento)

⁴ Salinomicina (60 g/t de alimento)

- **Xantofilas en plasma sanguíneo**

En el cuadro 8 se aprecian las concentraciones de xantofilas en plasma sanguíneo. Estas fueron diferentes ($p < 0.05$) los días 21 y 28, lo que es congruente con los resultados de las variables anteriores. A los 21 días, la mayor ($p < 0.05$) concentración se obtuvo en el NC0 respecto a los otros 6 tratamientos. Mientras que a los 28 días la mayor ($p < 0.05$) concentración de xantofilas la presentó el grupo que recibió salinomicina (Clon). A los 35 y 49 días no existieron diferencias ($p > 0.05$) entre tratamientos en las concentraciones de xantofilas en plasma.

En el primero de los contrastes (cuadro 8) estudiados (I) se pudo apreciar al día 21 (9 d p. i.), los tratamientos con Ae tuvieron mayores ($p < 0.05$) concentraciones de xantofilas que el grupo Clon. Condición que se revertió a los 28 d cuando Clon tuvo mayor concentración ($p < 0.05$) de xantofilas en comparación de los tratamientos con Ae (C250 y C500) y Ae + B (C250B y C500B), tendencia ($P = 0.07$) que persistió a los 35 días. En el contraste II se observa que los pollos que recibieron Ae y Ae + B tuvieron mayores ($p < 0.05$) concentraciones de xantofilas en plasma los días 21, 28 y 49 en comparación con C0. El contraste III encontró a los 21 días una tendencia ($p = 0.09$) a favor de los tratamientos con butirato (C250B, C500B) en las concentraciones plasmáticas de xantofilas respecto a los que sólo usaron Ae (C250, C500); no se encontraron diferencias ($p > 0.05$) en los otros días (28, 35, y 49) de estudio.

A los 21 días, se observaron asociaciones positivas ($p < 0.001$) entre la V del duodeno y yeyuno ($\rho = 0.39$ 0.42, respectivamente) y de la relación V/C ($\rho = 0.36$, 0.48 respectivamente) con las concentraciones de xantofilas en plasma. Por otra parte, existieron relaciones positivas ($p < 0.001$) entre la V del yeyuno (21 d, 0.30) y del duodeno (28 d, 0.30) con las concentraciones plasmáticas de xantofilas al día 49.

Cuadro 8. Concentración plasmática de xantofilas (ug/ml) en pollos de engorda Ross 308, no desafiados (NC) o desafiados (C) con *Eimeria* spp¹, alimentados con una dieta maíz-soya suplementada con extracto encapsulado de Aliáceas (Ae; 0, 250, 500; g/t de alimento), butirato de sodio (B; 1000 g/t de alimento), o salinomicina (Ion; 60 g/t de alimento)

Días	Tratamiento							EEM ²	Valor de P	Contrastes		
	NC0	C0	C250	C250B	C500	C500B	Clon			I ³	II ⁴	III ⁵
										Valor de P		
21	0.18 ^a	0.03 ^{cd}	0.03 ^{cd}	0.04 ^{cd}	0.06 ^{bc}	0.08 ^b	0.02 ^d	0.01	<0.001	0.0004	0.01	0.09
28	3.82 ^b	1.59 ^e	2.52 ^{cde}	2.95 ^{bcd}	3.48 ^{bc}	2.35 ^{de}	5.99 ^a	0.26	<0.001	0.0001	0.0001	0.18
35	5.52	4.82	5.54	5.71	5.05	4.88	6.15	0.42	0.25	0.07	0.32	0.99
49	4.37	3.56	4.52	5.33	4.70	4.17	4.09	0.44	0.17	0.24	0.03	0.76

^{abcd} Literales diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

¹ Desafío con ooquistes esporulados de *Eimeria acervulina* 1×10^5 , *E. maxima* 2×10^4 y *E. tenella* 2×10^4

² EEM, error estándar de la media

Contrastes: ³ I; Clon vs C250, C250B, C500 y C500B. ⁴ II; C0 vs 250, C500, C250B y C500B. ⁵ III; C250 y C500 vs C250B y C500B

- **Amarillamiento de la piel de pollo vivo y canal fría**

Los resultados del amarillamiento (b^*) en el pollo vivo, en la canal fría (CF) y la diferencia (Δb^*) entre los días 49 y 21 se muestran en el cuadro 9. A los 21 días de edad el NC0 presentó el menor ($p < 0.001$) amarillamiento de la piel en comparación con los otros seis tratamientos. Sin embargo, esta condición se revirtió una vez que se adicionó el pigmento a la dieta, a los 28 días cuando Clon y NC0 tuvieron el mayor valor de b^* ($p < 0.05$, 4.16 ± 0.35) respecto a los otros tratamientos (1.57 ± 0.22). El grupo que estableció diferencias del valor de b^* respecto a otro(s) tratamiento(s) fue el que recibió la salinomicina (Clon); esto se observó en los días 35 (Clon > NC0, C500B, C0, C500), 42 (Clon > NC0) y 49d (Clon > C500B). En cuanto al amarillamiento de la CF se mostró una tendencia ($P = 0.08$) entre los grupos experimentales, siendo Clon el de mayor valor (19.89 ± 1.27). La diferencia de amarillamiento entre el día 49 y 21 (Δ_{21-49d}) mostró que tanto en NC0 como Clon fue mayor (12.04 ± 0.42 , $p < 0.01$) en comparación con C250 y C0 (9.49 ± 0.44). Los otros grupos no fueron diferentes ($p < 0.05$) respecto a los mencionados.

Los resultados de los contrastes estudiados muestran diferencias en el amarillamiento de la piel; el contraste I mostró que Clon tuvo mayor ($p < 0.05$) pigmentación los días 28, 35, 42 y 49, en comparación con los grupos Ae (C250, C500) y Ae + B (C250B, C500B). Este resultado se observó también en Δb^*_{21-49d} ($p < 0.01$) y en CF ($p < 0.05$). En el caso del contraste II, la piel de los pollos de los grupos Ae (C250, C500) y Ae + B (C250B, C500B) tuvo mayor ($p < 0.05$) valor de b^* a los 28 días en comparación con C0. El butirato no mejoró ($p > 0.05$) las variables relacionadas con la pigmentación (Contraste III).

VARIABLES RELACIONADAS CON LA INFECCIÓN CON *Eimeria* spp. como TMLS21 estuvieron asociadas negativamente ($p < 0.05$) con Δb^* (-0.27) y CFb^* (-0.25); mientras que TMLS28 se asoció de la misma manera con CFb^* ($p < 0.05$, -0.26). Por otra parte, la relación V/C observada en el duodeno a los 21 y 28 d se asociaron positivamente ($p < 0.05$; 0.24 y 0.27, respectivamente) con Δb^* . Esta variable estuvo también

asociada de manera positiva a las V y la relación V/C del yeyuno observadas al día 21 ($p < 0.05$; 0.29, 0.26, respectivamente). Al día 28, se detectó la asociación positiva de la V en el yeyuno y la CFb* ($p < 0.001$, 0.31).

Cuadro 9. Amarillamiento y diferencial de amarillamiento (Δb^*) cutáneo en vivo a diferentes días (d) y en la canal fría (CF) de pollos de engorda Ross 308, no desafiados (NC) o desafiados (C) con *Eimeria* spp¹, alimentados con una dieta maíz-soya suplementada con extracto encapsulado de Aliáceas (Ae; 0, 250, 500; g/t de alimento), butirato de sodio (B; 1000 g/t de alimento), o salinomicina (Ion; 60 g/t de alimento)

Ítem	Tratamientos							EEM ²	Valor de P	Contrastes		
	NC0	C0	C250	C250B	C500	C500B	Clon			I ³	II ⁴	III ⁵
21 d	-2.49 ^b	-0.48 ^a	-0.55 ^a	-0.97 ^a	-0.98 ^a	-1.14 ^a	-1.19 ^a	0.31	0.0006	0.42	0.22	0.68
28 d	3.84 ^a	0.28 ^c	2.08 ^b	1.69 ^{bc}	1.91 ^b	1.63 ^{bc}	4.47 ^a	0.35	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.37
35 d	5.25 ^b	4.31 ^b	5.75 ^{ab}	5.47 ^{ab}	4.12 ^b	4.36 ^b	7.14 ^a	0.44	<0.0001	<0.0001	0.21	0.96
42 d	7.61 ^b	8.12 ^{ab}	8.28 ^{ab}	9.34 ^{ab}	9.12 ^{ab}	8.92 ^{ab}	10.39 ^a	0.53	0.01	0.02	0.19	0.42
49 d	9.39 ^{ab}	8.87 ^{ab}	9.07 ^{ab}	9.72 ^{ab}	9.52 ^{ab}	8.72 ^b	10.87 ^a	0.46	0.04	0.003	0.46	0.86
Δb^*21d-49d	12.04 ^a	9.35 ^b	9.62 ^b	10.68 ^{ab}	10.66 ^{ab}	9.70 ^{ab}	12.03 ^a	0.56	0.002	0.004	0.19	0.93
CF	17.86	15.62	17.02	17.62	16.96	15.04	19.89	1.13	0.08	0.01	0.41	0.56

^{ab} Literales diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

¹ Desafío con ooquistes esporulados de *Eimeria acervulina* 1×10^5 , *E. maxima* 2×10^4 y *E. tenella* 2×10^4

² EEM, error estándar de la media.

Contrastes: ³ I; Clon vs C250, C250B, C500 y C500B. ⁴ II; C0 vs 250, C500, C250B y C500B. ⁵ III; C250 y C500 vs C250B y C500B

➤ **Discusión.**

Las coccidias afectan la salud intestinal ya que destruyen el epitelio y las vellosidades intestinales, provocando malabsorción y en consecuencia reducción de la productividad (Liu y col., 2018). En este estudio, los días 21 y 28 se observaron correlaciones positivas entre los OPG, el TMLS y la CA; mientras que las correlaciones fueron negativas de las variables OPG y TMLS cuando se contrastaron con V, V/C intestinales, y la GDP. Estas correlaciones confirman el efecto negativo de las coccidias en la salud intestinal y la productividad de las aves. Aunado a esto, se observaron correlaciones positivas entre la GDP con V y V/C en duodeno y yeyuno, lo que apunta a la importancia de la salud intestinal en la producción animal. Lo que se confirma por los resultados obtenidos para el grupo NC0 que mostró la mejor producción, morfología intestinal y pigmentación, sobre todo en comparación con C0, lo cual es un indicador del éxito de la infección experimental. Se han reportado resultados acordes con los de este estudio (Holdsworth y col., 2004; Ritzi y col., 2014; Stefanello y col., 2019; Villar-Patiño y col., 2023) para aves infectadas experimentalmente con *Eimeria* spp. Es importante mencionar que, no siempre se han obtenido estas correlaciones en infecciones coccidiales (Ringenier y col., 2021) en el pollo de engorda; lo que se ha explicado por la capacidad del ave de hacer frente a un cierto nivel de daño intestinal antes de que influya en el rendimiento general. Conway y col. (1990) concluyeron que las asociaciones entre GDP, CA, OPG y LS, dependen del tipo de *Eimeria*, y del uso o no de anticoccidianos. Los resultados obtenidos de la mayor excreción de OPG al día 9 p.i. y su disminución gradual en los días 28 y 35 son consistentes con lo observado por Villar Patiño y col. (2023). La reducción de OPG con el tiempo se debe a que el huésped monta una respuesta inmune mediada por células para combatir los parásitos (Laurent y col., 2001).

En lo referente al índice anticoccidiano calculado en este trabajo, fue mejorado por el uso de Ae en especial con la dosis 250 g/t y también con el uso de Clon en comparación con el grupo C0, lo que es congruente con los resultados de Villar-Patiño y col. (2023) quienes incorporaron 500 o 750 g de un extracto encapsulado de aliáceas por tonelada de alimento, lo que mejoró IAC en pollos de engorda infectados experimentalmente con *Eimeria* spp. Otros investigadores han obtenido efectos positivos en el IAC usando mezclas de extractos vegetales entre ellos el de *Allium sativum* (Pop y col., 2019). El uso de butirato de sodio (B) no afectó al IAC coincidiendo con los resultados de Barbosa (2020) quien tampoco encontró efecto beneficioso del B en los OPG y LS en pollos de engorda desafiados con *Eimeria* spp.

Cabe señalar que los resultados de TMLS del grupo receptor de salinomicina (Clon), no fueron diferentes de control no desafiado (NC0) y si del control desafiado (C0). Aunque, se ha consignado el efecto beneficioso de los ionóforos en pruebas de desafío con *Eimeria* spp. (Danforth y col., 1977; McDougald y col., 1981; Bozkurt y col., 2016; Nabian y col., 2018; Moraes y col., 2019), también se ha documentado la inducción de resistencia de grado variable por parte de la *Eimeria* spp. (Jeffers, 1974; Chapman, 1989; Abbas y col., 2011; Mesa-Pineda y col., 2021), lo que provoca un efecto perjudicial en el rendimiento productivo.

Los resultados de este estudio indican la posibilidad de usar el extracto encapsulado de aliáceas (Ae) como estrategia de control de la coccidiosis como alternativa al uso de salinomicina, sin menoscabo de la productividad. A este respecto, cabe señalar que el tratamiento C250 fue el más constante en no manifestar diferencias ($p > 0.05$) respecto al control sin desafío (NC0) y su mejor respuesta al desafío en comparación de C0 ($p < 0.05$). Se han demostrado los efectos de la suplementación dietética con *Allium* spp. y sus metabolitos secundarios en la producción y la salud de las aves. En este estudio, a los 9 d p.i., los grupos C250 y C250B mostraron un efecto positivo al mejorar la conversión del alimento (CA) respecto al C0 y al Clon. Peinado y col. (2012) usaron 45 y 90 mg PTSO/kg de dieta, lo que mejoró la GDP y

la CA; Brzóška y col. (2015) observaron una mejora del peso del pollo de engorda en respuesta al uso dietario de extracto líquido de ajo; mientras que Kothari y col. (2019) mostraron que el extracto de *Allium* spp. en la dieta mejoró el crecimiento, el rendimiento, el metabolismo lipídico, el ecosistema intestinal y la respuesta inmune, especialmente cuando las aves se encontraban bajo estrés. Por otra parte, incluir 15 g de ajo/kg de alimento (Ali y col., 2019) o 10 g de ajo en polvo/L de agua (El-Khtam y col., 2014) disminuyeron los OPG de *Eimeria* spp. respecto al control positivo; pero, en menor magnitud respecto a los pollos que recibieron amprolio. El efecto anticoccidiano del extracto de ajo, de sus derivados o de sus combinaciones con otros derivados vegetales (El-Khtam y col., 2014; Ali y col., 2019; Sidiropoulou y col., 2020) o con aminoácidos azufrados (Pourali y col., 2014) ha sido reportado. En cuanto al uso del PTSO, Kim y col. (2013b) demostraron que la alimentación con 6.7 y 3.3 mg de PTSO y PTS, respectivamente por kg de alimento redujo la excreción de ooquistes de *E. acervulina* en comparación con un grupo control desafiado.

Algunos estudios (Ur Rhaman y col., 2017; Kumar y col., 2022) reportaron los efectos beneficiosos del género *Allium* en el desempeño productivo y en la salud intestinal. Kumar y col. (2022) reportaron el efecto potencial de una tintura de ajo con eugenol en el mejoramiento del desempeño productivo y la salud intestinal en relación con la disminución de la enteritis necrótica; Ur Rhaman y col. (2017) usaron 2.5 kg de *Allium cepa*/t de alimento para pollos de engorda, observando mayor longitud y amplitud de las vellosidades intestinales y mayor profundidad de las criptas. La integridad de la mucosa intestinal debe preservarse para que la utilización del alimento sea eficiente (McCaffrey y col., 2021). La renovación del epitelio intestinal es un proceso dinámico de proliferación y maduración celular en las criptas intestinales, seguido de la migración celular hacia la punta de las vellosidades, finalizando en una apoptosis o muerte celular (Jeurissen y col., 2002). La disminución de la altura de las vellosidades se asocia con una superficie de absorción reducida; mientras que la mayor profundidad de las criptas se asocia con

la rápida proliferación celular necesaria para la elevada tasa de renovación del epitelio de las vellosidades intestinales (Choct, 2009); un valor mayor de la relación V/C es un indicador de una mucosa intestinal saludable y bien diferenciada. En este estudio el desafío a las aves de engorda con *Eimeria* spp. provocó una reducción (del 15 al 28 %) en la altura de las vellosidades duodenales y yeyunales a los 21, 28 y 35 d (9, 16 y 23 d p.i.). La diferencia más importante se observó al día 21 (9 d p.i.) entre el grupo NC0 y los grupos C0 y C250, coincidiendo con lo reportado por otros investigadores (Fernando y McCraw, 1973; Castro y col., 2020). Cabe señalar que las aves que recibieron salinomicina (Clon) mostraron resultados 9 d p.i., de V y V/C, similares a NC0 ($p > 0.05$) y superiores ($p < 0.05$) a los otros grupos experimentales. En cuanto al uso de Ae o de Ae + B, hubo un efecto en la morfología duodenal favoreciendo la relación V/C a los 28 y 35 d con respecto a C0 ($p < 0.05$). El hecho de que los resultados de la morfología intestinal fueran diferentes entre los grupos Ae vs. AeB, muestra la estimulación del butirato de sodio en la longitud de las vellosidades y profundidad de las criptas duodenales y yeyunales; lo que está reportado como uno de los efectos beneficiosos del butirato de sodio en la salud intestinal (Hu y Guo, 2007; Smulikowska y col., 2009; Pardo y col., 2014; Wu y col., 2018; Elnesr y col., 2020; Upadhaya y col., 2020). Algunos trabajos de investigación (Oladele y col., 2012; Ur Rahman y col., 2017) usaron dietas con la inclusión de compuestos de *Allium* spp. en pollos de engorda sanos, observando incrementos en el largo y ancho de las vellosidades intestinales, así como una mayor superficie; lo que resulta en una mayor absorción de nutrientes; mientras que, Peinado y col. (2012) lo observaron en pollos afectados con enteropatógenos.

En cuanto a los resultados de los pigmentos y la pigmentación cutánea, está bien establecido que el uso de xantófilas en la alimentación avícola puede garantizar el amarillamiento adecuado de la piel (Muñoz-Díaz y col., 2012). Como ya fue discutido, la eimeriosis disminuye la superficie intestinal; además, la absorción del carotenoide se afecta, lo que tiene como consecuencia la deficiente pigmentación de la piel del ave (Bletner y col., 1966; Allen, 1987). En este estudio, a los 28 d, el

grupo Clon presentó la mayor concentración plasmática de xantofilas respecto a los demás tratamientos. Estos resultados fueron concordantes con lo observado en el amarillamiento de la piel (b^*), donde el grupo Clon mostró el mayor valor de manera consistente.

➤ Conclusiones.

Con los resultados obtenidos en este estudio, es razonable proponer al Ae, como una alternativa eficaz en el control de la coccidiosis del pollo de engorda, al tener un nivel anticoccidiano competitivo con los ionóforos (salinomicina). Su uso junto al butirato de sodio (B) promovería la altura de vellosidades y la relación vellosidad/cripta favoreciendo la salud intestinal, y con ello mejorar el crecimiento, la eficiencia en la utilización del alimento y mantener la pigmentación cutánea. Sin embargo, es importante llevar a cabo estudios más amplios para establecer la dosis óptima de uso. Además, para entender los mecanismos de acción del Ae sobre *Eimeria* spp., y los tejidos intestinales; así como, su efecto en la salud intestinal, respuesta inmune, el rendimiento productivo del ave, así como la posible interacción con los nutrimentos, aditivos (p. ej., fitoquímicos, acidificantes, etc.) y vacunas contra la coccidia.

➤ Referencias

- ABBAS, R. Z., IQBAL, Z., BLAKE, D., KHAN, M. N. y SALEEMI, M. K. 2011. Anticoccidial drug resistance in fowl coccidia: the state of play revisited. *World's Poult. Sci. J.*, 67, 337-350.
- AGUINAGA-CASANAS, M. A., MUT-SALUD, N., FALCON-PINEIRO, A., ALCARAZ-MARTINEZ, A., GUILLAMON, E. y BANOS, A. 2022. *In vitro* antiparasitic activity of propyl-propane-thiosulfinate (PTS) and propyl-propane-thiosulfonate (PTSO) from *Allium cepa* against *Eimeria acervulina* sporozoites. *Microorganisms*, 10.
- ALI, M., CHAND, N. y KHAN, R. 2019. Anticoccidial effect of garlic (*Allium sativum*) and ginger (*Zingiber officinale*) against experimentally induced coccidiosis in broiler chickens. *J. App. Anim. Res.*, 1, 79-84.
- ALLEN, P. C. 1987. Physiological responses of chicken gut tissue to coccidial infection: comparative effects of *Eimeria acervulina* and *Eimeria mitis* on mucosal mass, carotenoid content, and brush border enzyme activity. *Poult Sci*, 66, 1306-15.
- BARBOSA, B. F. D. S. 2020. Butirato de sódio microencapsulado em alternativa ao uso de avilamicina em dietas para frangos de corte desafiados com *Eimeria* spp. Master Degree, Universidade Estatal Paulista.
- BLETNER, J. K., MITCHELL, R. P., JR. y TUGWELL, R. L. 1966. The effect of *Eimeria maxima* on broiler pigmentation. *Poult Sci*, 45, 689-94.
- BORTOLUZZI, C., ROTHROCK, M. J., VIEIRA, B. S., MALLO, J. J., PUYALTO, M., HOFACRE, C. y APPLGATE, T. J. 2018. Supplementation of protected sodium butyrate alone or in combination with essential oils modulated the cecal microbiota of broiler chickens challenged with coccidia and *Clostridium perfringens*. *Front. Sustain. Food Syst.*, 2.
- BOZKURT, M., EGE, G., AYSUL, N., AKSIT, H., TUZUN, A. E., KUCUKYILMAZ, K., BORUM, A. E., UYGUN, M., AKSIT, D., AYPAK, S. 2016. Effect of anticoccidial monensin with oregano essential oil on broilers experimentally challenged with mixed *Eimeria* spp. *Poult Sci*, 95, 1858-68.
- BRZÓSKA, F., ŚLIWIŃSKI, B., MICHALIK-RUTKOWSKA, O. y ŚLIWA, J. 2015. The effect of garlic (*Allium sativum* L.) on growth performance, mortality rate, meat and blood parameters in broilers. *Annals of An Sci*, 15, 961-975.
- CASTANEDA, M. P., HIRSCHLER, E. M. y SAMS, A. R. 2005. Skin pigmentation evaluation in broilers fed natural and synthetic pigments. *Poult Sci*, 84, 143-7.
- CASTRO, F. L. S., TENG, P.-Y., YADAV, S., GOULD, R. L., CRAIG, S., PAZDRO, R. y KIM, W. K. 2020. The effects of L-Arginine supplementation on growth performance and intestinal health of broiler chickens challenged with *Eimeria* spp. *Poult Sci*, 99, 5844-5857.
- CHAPMAN, H. D. 1989. *Eimeria tenella*, *E. acervulina* and *E. maxima*: studies on the development of resistance to diclazuril and other anticoccidial drugs in the chicken. *Parasitology*, 99 Pt 2, 189-92.

- CHAPMAN, H. D., BARTA, J. R., BLAKE, D., GRUBER, A., JENKINS, M., SMITH, N. C., SUO, X. y TOMLEY, F. M. 2013. A selective review of advances in coccidiosis research. *Adv Parasitol*, 83, 93-171.
- CHAPMAN, H. D., BARTA, J. R., HAFEEZ, M. A., MATSLER, P., RATHINAM, T. y RACCOURSIER, M. 2016. The epizootiology of *Eimeria* infections in commercial broiler chickens where anticoccidial drug programs were employed in six successive flocks to control coccidiosis. *Poult Sci*, 95, 1774-8.
- CHOCT, M. 2009. Managing gut health through nutrition. *Br Poult Sci*, 50, 9-15.
- CONWAY, D. P., MCKENZIE, M. E. y 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 Pathol.*, 19, 489-96.
- CORTÉS, C. R. 1996. Evaluación del color utilizando el colorímetro de reflectancia Minolta, con el sistema CIE L*, a*, b*. *Comunicación Técnica. Laboratorios ROCHE*.
- DALLOUL, R. A., LILLEHOJ, H. S., SHELLEM, T. A. y DOERR, J. A. 2003. Intestinal immunomodulation by vitamin A deficiency and *Lactobacillus*-based probiotic in *Eimeria acervulina*-infected broiler chickens. *Avian Dis*, 47, 1313-20.
- DANFORTH, H. D., RUFF, M. D., REID, W. M. y JOHNSON, J. 1977. Anticoccidial activity of salinomycin in floor-pen experiments with broilers. *Poult Sci*, 56, 933-8.
- DE VERDAL, H., MIGNON-GRASTEAU, S., JEULIN, C., LE BIHAN-DUVAL, E., LECONTE, M., MALLET, S., MARTIN, C. y NARCY, A. 2010. Digestive tract measurements and histological adaptation in broiler lines divergently selected for digestive efficiency. *Poult. Sci.*, 89, 1955-1961.
- DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN (2001). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Diario Oficial de la Federación.
- EL-KHTAM, A., SHATA, A. y EL-HEWAITY, M. H. 2014. Efficacy of turmeric (*Curcuma longa*) and garlic (*Allium sativum*) on *Eimeria* species in broilers. *IJBAS*, 3.
- ELNESR, S. S., ALAGAWANY, M., ELWAN, H. A. M., FATHI, M. A. y FARAG, M. R. 2020. Effect of sodium butyrate on intestinal health of poultry – A review. *Annals An Sci*, 20, 29-41.
- FERNANDO, M. A. y 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.
- FRADE-NEGRETE, N., HERNÁNDEZ-VELASCO, X., FUENTES-MARTÍNEZ, B., AVILA GONZÁLEZ, E. y TELLEZ, G. 2016. Effect of the infection with *Eimeria acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella* on pigment absorption and skin deposition in broiler chicken. *Arch Med Vet*, 48, 199-207.
- GIANNENAS, I., TSALIE, E., TRIANTAFILLOU, E., HESSENBERGER, S., TEICHMANN, K., MOHNL, M. y TONTIS, D. 2014. Assessment of probiotics supplementation via feed or water on the growth performance, intestinal morphology and microflora of

- chickens after experimental infection with *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* and *Eimeria tenella*. *Avian Pathol.*, 43, 209-16.
- GUILLOTEAU, P., MARTIN, L., EECKHAUT, V., DUCATELLE, R., ZABIELSKI, R. y VAN IMMERSEEL, F. 2010. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutr Res Rev*, 23, 366-84.
- HOLDSWORTH, P. A., CONWAY, D. P., MCKENZIE, M. E., DAYTON, A. D., CHAPMAN, H. D., MATHIS, G. F., SKINNER, J. T., MUNDT, H. C., WILLIAMS, R. B. y WORLD ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF VETERINARY, P. 2004. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) guidelines for evaluating the efficacy of anticoccidial drugs in chickens and turkeys. *Vet Parasitol*, 121, 189-212.
- HU, Z. y GUO, Y. 2007. Effects of dietary sodium butyrate supplementation on the intestinal morphological structure, absorptive function and gut flora in chickens. *Anim Feed Sci Tech*, 132, 240-249.
- JEFFERS, T. K. 1974. Anticoccidial drug resistance: differences between *Eimeria acervulina* and *E. tenella* strains within broiler houses. *Poult Sci*, 53, 1009-13.
- JEURISSEN, S. H., LEWIS, F., VAN DER KLIS, J. D., MROZ, Z., REBEL, J. M. y TER HUURNE, A. A. 2002. Parameters and techniques to determine intestinal health of poultry as constituted by immunity, integrity, and functionality. *Curr Issues Intest Microbiol*, 3, 1-14.
- JIMOH, A. A., IBITOYE, E. B., DABAI, Y. U. y GARBA, S. 2013. *In vivo* antimicrobial potentials of garlic against *Clostridium perfringens* and its promotant effects on performance of broiler chickens. *Pak J Biol Sci*, 16, 1978-84.
- JMP 2019. 15. *SAS Institute, Cary NC, USA*.
- JOHNSON, J. y REID, W. M. 1970. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Exp Parasitol*, 28, 30-6.
- KIM, D., LILLEHOJ, H., LEE, S., JANG, S., PARK, M., MIN, W., LILLEHOJ, E. y BRAVO, D. 2013a. Immune effects of dietary anethole on *Eimeria acervulina* infection. *Poult. Sci.*, 92, 2625-34.
- KIM, D. K., LILLEHOJ, H. S., LEE, S. H., LILLEHOJ, E. P. y BRAVO, D. 2013b. Improved resistance to *Eimeria acervulina* infection in chickens due to dietary supplementation with garlic metabolites. *Br J Nutr*, 109, 76-88.
- KOTHARI, D., LEE, W. D., NIU, K. M. y KIM, S. K. 2019. The genus *Allium* as poultry feed additive: A review. *Animals (Basel)*, 9.
- KUMAR, A., SHARMA, N. K., KHERAVII, S. K., KEERQIN, C., IONESCU, C., BLANCHARD, A., & WU, S. B. 2022. Potential of a mixture of eugenol and garlic tincture to improve performance and intestinal health in broilers under necrotic enteritis challenge. *Animal Nutrition*, 8, 26-37.

- LAURENT, F., MANCASSOLA, R., LACROIX, S., MENEZES, R. y NACIRI, M. 2001. Analysis of chicken mucosal immune response to *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* infection by quantitative reverse transcription-PCR. *Infect Immun*, 69, 2527-34.
- LIU, J.; LIU, L.; LI, L.; TIAN, D.; LI, W.; XU, L.; YAN, R.; LI, X.; SONG, X. 2018. Protective immunity induced by *Eimeria* common antigen 14-3-3 against *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina* and *Eimeria maxima*. *BMC Vet. Res.* 2018, 14, 337, doi:10.1186/s12917-018-1665-z.
- LONG, P. L., MILLARD, B. J., JOYNER, L. P. y NORTON, C. C. 1976. A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. *Folia Vet Lat*, 6, 201-17.
- LÓPEZ-OSORIO, S., CHAPARRO-GUTIÉRREZ, J. J. y GÓMEZ-OSORIO, L. M. 2020. Overview of poultry *Eimeria* life cycle and host-parasite interactions. *Front Vet Sci*, 7, 384.
- MCCAFFREY, C., CORRIGAN, A., MOYNAGH, P. y MURPHY, R. 2021. Effect of yeast cell wall supplementation on intestinal integrity, digestive enzyme activity and immune traits of broilers. *Br Poult Sci*, 62, 771-782.
- MCDUGALD, L. R., KESHAVARZ, K. y ROSENSTEIN, M. 1981. Anticoccidial efficacy of salinomycin (AHR-3096C) and compatibility with roxarsone in floor-pen experiments with broilers. *Poult Sci*, 60, 2416-22.
- MCKNIGHT, L., PEPPLER, W., WRIGHT, D., PAGE, G. y HAN, Y. 2019. A blend of fatty acids, organic acids, and phytochemicals induced changes in intestinal morphology and inflammatory gene expression in coccidiosis-vaccinated broiler chickens. *Poult. Sci.*, 98.
- MERK, SHARP, DOHOME y LABORATORY 1976. Anticoccidial Index Kenilworth, NJ, USA. Merk Company Kenilworth, NJ, USA.
- MESA-PINEDA, C., NAVARRO-RUÍZ, J. L., LÓPEZ-OSORIO, S., CHAPARRO-GUTIÉRREZ, J. J. y GÓMEZ-OSORIO, L. M. 2021. Chicken coccidiosis: From the parasite lifecycle to control of the disease. *Front Vet Sci*, 8, 787653.
- MIN, W., KIM, W. H., LILLEHOJ, E. P. y LILLEHOJ, H. S. 2013. Recent progress in host immunity to avian coccidiosis: IL-17 family cytokines as sentinels of the intestinal mucosa. *Dev. Comp. Immunol.*, 41, 418-428.
- MORAES, P. O., CARDINAL, K. M., GOUVÊA, F. L., SCHROEDER, B., CERON, M. S., LUNEDO, R., FRAZZON, A. P. G., FRAZZON, J. y RIBEIRO, A. M. L. 2019. Comparison between a commercial blend of functional oils and monensin on the performance and microbiota of coccidiosis-challenged broilers. *Poult. Sci.*, 98, 5456-5464.
- MUÑOZ-DÍAZ, J. I., FUENTE-MARTÍNEZ, B., HERNÁNDEZ-VELASCO, X. y ÁVILA-GONZÁLEZ, E. 2012. Skin pigmentation in broiler chickens fed various levels of metabolizable energy and xanthophylls from *Tagetes erecta*. *J App Poult Res*, 21, 788-796.

- NABIAN, S., ARABKHAZAEI, F., SEIFOURI, P. y FARAHANI, A. 2018. Morphometric analysis of the intestine in experimental coccidiosis in broilers treated with anticoccidial drugs. *Iran J Parasitol*, 13, 493-499.
- OLADELE, O., EMIKPE, B. y BAKARE, H. 2012. Effects of dietary garlic (*Allium sativum* Linn.) supplementation on body weight and gut morphometry of commercial broilers. *Int J Morphol*, 30, 238-240.
- PARDO, F., PUYALTO, M., ORTIZ, A., TORREALBA, H., MALLO, J. y RIBOTY, R. 2014. Effect of partially protected sodium butyrate on performance, digestive organs, intestinal villi and *E. coli* development in broilers chickens. *Int. J. Poult. Sci.*, 13.
- PARENT, E., FERNANDEZ, D. y BOULIANNE, M. 2018. The use of a live non-attenuated coccidiosis vaccine modifies *Eimeria* spp. excretion in commercial antibiotic-free broiler chicken flocks compared to conventional shuttle anticoccidial programs. *Poult Sci*, 97, 2740-2744.
- PAWLISZYN, J. 2012. Handbook of solid phase microextraction *Elsevier Inc.*
- PEINADO, M. J., RUIZ, R., ECHAVARRI, A. y RUBIO, L. A. 2012. Garlic derivative propyl propane thiosulfonate is effective against broiler enteropathogens *In Vivo*. *Poult Sci*, 91, 2148-57.
- POP, L. M., VARGA, E., COROIAN, M., NEDISAN, M. E., MIRCEAN, V., DUMITRACHE, M. O., FARCZADI, L., FULOP, I., CROITORU, M. D., FAZAKAS, M., y col. 2019. Efficacy of a commercial herbal formula in chicken experimental coccidiosis. *Parasit Vectors*, 12, 343.
- POURALI, M., KERMANSHAHI, H., GOLIAN, A., RAZMI, G. y SOUKHTANLOO, M. 2014. Antioxidant and anticoccidial effects of garlic powder and sulfur amino acids on *Eimeria*-infected and uninfected broiler chickens. *Iran. J. Vet. Res.*, 15, 227-232.
- RINGENIER, M., CAEKEBEKE, N., DE MEYER, F., VAN LIMBERGEN, T., EECKHAUT, V., DUCATELLE, R., VAN IMMERSEEL, F. y DEWULF, J. 2021. A field study on correlations between macroscopic gut health scoring, histological measurements and performance parameters in broilers. *Avian Pathol.*, 50, 500-506.
- RITZI, M. M., ABDELRAHMAN, W., MOHNL, M. y DALLOUL, R. A. 2014. Effects of probiotics and application methods on performance and response of broiler chickens to an *Eimeria* challenge. *Poult Sci*, 93, 2772-8.
- ROCHELL, S. J., PARSONS, C. M. y DILGER, R. N. 2016. Effects of *Eimeria acervulina* infection severity on growth performance, apparent ileal amino acid digestibility, and plasma concentrations of amino acids, carotenoids, and alpha1-acid glycoprotein in broilers. *Poult Sci*, 95, 1573-1581.
- SIDIROPOULOU, E., SKOUFOS, I., MARUGAN-HERNANDEZ, V., GIANNENAS, I., BONOS, E., AGUIAR-MARTINS, K., LAZARI, D., BLAKE, D. P. y TZORA, A. 2020. *In vitro* anticoccidial study of oregano and garlic essential oils and effects on growth performance, fecal oocyst output, and intestinal microbiota *In Vivo*. *Front Vet Sci*, 7, 420.

- SMULIKOWSKA, S., CZERWIŃSKI, J., MIECZKOWSKA, A. y JANKOWIAK, J. 2009. The effect of fat-coated organic acid salts and a feed enzyme on growth performance, nutrient utilization, microflora activity, and morphology of the small intestine in broiler chickens. *J Anim Feed Sci*, 18, 478–489.
- STEFANELLO, C., ROSA, D. P., DALMORO, Y. K., SEGATTO, A. L., VIEIRA, M. S., MORAES, M. L. y SANTIN, E. 2019. Protected blend of organic acids and essential oils improves growth performance, nutrient digestibility, and intestinal health of broiler chickens undergoing an intestinal challenge. *Front Vet Sci*, 6, 1-10.
- TEPOX-PÉREZ, M. A. 2013. *Absorción, depósito y eliminación de pigmento con diferentes programas de adición de xantófilas en dietas de pollo de engorda*. Maestría, UNAM.
- TEWARI, A. K. y MAHARANA, B. R. 2011. Control of poultry coccidiosis: changing trends. *J Parasit Dis*, 35, 10-7.
- TURK, D. E. 1972. Protozoan parasitic infections of the chick intestine and protein digestion and absorption. *J Nutr*, 102, 1217-21.
- UPADHAYA, S. D., CHO, S. H., CHUNG, T. K. y KIM, I. H. 2019. Anti-coccidial effect of essential oil blends and vitamin D on broiler chickens vaccinated with purified mixture of coccidian oocyst from *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima*. *Poult Sci*, 98, 2919-2926.
- UPADHAYA, S. D., JIAO, Y., KIM, Y. M., LEE, K. Y. y KIM, I. H. 2020. Coated sodium butyrate supplementation to a reduced nutrient diet enhanced the performance and positively impacted villus height and faecal and digesta bacterial composition in weaner pigs. *Anim Feed Sci Technol*, 265, 114534.
- UR RAHMAN, S., KHAN, S., CHAND, N., SADIQUE, U. y KHAN, R. U. 2017. *In Vivo* effects of *Allium cepa* L. on the selected gut microflora and intestinal histomorphology in broiler. *Acta Histochem*, 119, 446-450.
- VILLAR-PATIÑO, G., CAMACHO-REA, M. D. C., OLVERA-GARCIA, M. E., BALTAZAR-VAZQUEZ, J. C., GOMEZ-VERDUZCO, G., TELLEZ, G., LABASTIDA, A. y RAMIREZ-PEREZ, A. H. 2023. Effect of an Alliaceae encapsulated extract on growth performance, gut health, and intestinal microbiota in broiler chickens challenged with *Eimeria* spp. *Animals (Basel)*, 13.
- WANG, L., GUO, W., HAQ, S. U., GUO, Z., CUI, D., YANG, F., CHENG, F., WEI, X. y LV, J. 2021. Anticoccidial activity of Qinghao powder against *Eimeria tenella* in broiler chickens. *Front. Vet. Sci.*, 8.
- WILLIAMS, R. B. 2005. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. *Avian Pathol.*, 34, 159-80.
- WU, W., XIAO, Z., AN, W., DONG, Y. y ZHANG, B. 2018. Dietary sodium butyrate improves intestinal development and function by modulating the microbial community in broilers. *PLOS ONE*, 13, e0197762.

7. SINOPSIS

El uso de anticoccidianos ionóforos y sintéticos, es a la fecha, el principal método de control de la coccidiosis (Tewari y Maharana, 2011), que es la parasitosis de mayor impacto económico en la avicultura. Sin embargo, existe una preocupación global por la resistencia desarrollada ante estos fármacos (Chapman, 2014). Esta situación ha incrementado el interés en el desarrollo de productos naturales con función anticoccidiana que puedan ser añadidos a las dietas (Osho y col., 2019). Se ha demostrado que los extractos o sustancias activas de plantas llamados fitoquímicos, como el ajo, la canela (Lee y col., 2011), o la mezcla de tomillo, orégano y ajo (Pop y col., 2019) tienen actividad antiparasitaria.

Este proyecto de investigación utilizó un extracto encapsulado de aliáceas (Ae), que fue valorado por su contenido de propilpropano tiosulfonato (PTSO), constó de tres estudios; el primero de ellos *“Efecto del propilpropano tiosulfonato encapsulado en la digestibilidad ileal aparente y el comportamiento productivo en pollos de engorda”* hizo alusión directa al PTSO por ser el metabolito mayoritario y cuantificado en Ae. Es importante señalar que en el experimento 1 se usó el Ae en pollos sanos. En los experimentos 2 (*Efecto de un extracto encapsulado de Aliáceas en el desempeño productivo, salud y microbiota intestinales en pollos de engorda desafiados con Eimeria spp.*) y 3 (*Efecto de un extracto encapsulado de Aliáceas y de butirato de sodio en el desempeño productivo, salud intestinal y pigmentación de pollos infectados con Eimeria spp.*) se optó por consignar al Ae en lugar de sólo al PTSO como responsable de los efectos observados en las variables estudiadas en cada uno. La finalidad de estos trabajos fue estudiar el efecto del Ae en: la digestibilidad de los nutrientes (experimento 1), su actividad anticoccidiana, su efecto contra la severidad de la infección (experimentos 2 y 3), en la microbiota intestinal (experimento 2), y pigmentación cutánea (experimento 3). En el experimento 3, se incluyó también butirato de sodio (B) por su conocido efecto positivo en la salud intestinal.

8. DISCUSIÓN GENERAL

En el experimento 1 se observó el beneficio del uso dietario de un extracto encapsulado de aliáceas, principalmente de la dosis de 250 g de Ae/ t de alimento, en la digestibilidad de aminoácidos, que son componentes cruciales para realizar funciones fisiológicas, metabólicas y estructurales (Ullah y col., 2016). Brzóška y col. (2015) alimentaron a pollos de engorda añadiendo un extracto de *Allium sativum* en la dieta, lo que aumentó el contenido de proteínas en los músculos pectorales; los investigadores sugirieron que el *A. sativum* mejoró la digestibilidad y absorción de los aminoácidos. También en el experimento 1, la digestibilidad de la energía se incrementó 4 % (0.15 Mcal/kg) lo que concuerda con los resultados de Peinado y col. (2013) quienes observaron en pollos de engorda, un incremento de 3.8 % en la digestibilidad de la energía de la dieta suplementada con 90 mg de PTSO/kg; los autores sugirieron que este resultado se relacionaba con el efecto del compuesto en el mejoramiento de la estructura intestinal. De la misma manera, en el experimento 1, la digestibilidad del fósforo (P) tendió a mejorar con el uso de 250 g Ae/t de alimento; la digestibilidad de este elemento debe evaluarse para reducir al máximo su excreción fecal, dado que ésta en conjunto con la excreción de nitrógeno causa el fenómeno de eutrofización de ríos, lagos y océanos (Peñuelas y Sardans, 2022); el P debe conservarse porque es un costoso recurso natural no renovable, indispensable para la producción agropecuaria. La mejoría en la digestibilidad de los aminoácidos y de la energía observadas en el experimento 1, pudiera explicarse por un efecto en la modulación de la microbiota (experimento 2) y en la morfología intestinal (experimento 3); estas hipótesis deberán comprobarse en estudios futuros.

Se ha reportado (Aarti y Khusro, 2020; Kairalla y col., 2022) que el ajo (*Allium sativum*) incluido en la dieta de pollos de engorda mejoró la conversión de alimento; mientras que, sus metabolitos secundarios tuvieron efectos positivos en el rendimiento productivo y la salud animal (Sorlozano-Puerto y col., 2018; Batiha y

col., 2020, Subramanian y col., 2020). Brzóska y col. (2015) utilizaron en dietas para pollos de engorda un extracto líquido de ajo que mejoró el peso vivo. Kothari y col. (2019) alimentaron aves con dietas que contenían extractos de *Allium* spp. lo que mejoró el crecimiento, la productividad, el metabolismo lipídico y el ecosistema intestinal, así como la respuesta inmune, especialmente bajo estrés. Estos resultados demostraron los efectos beneficiosos de extractos completos de ajo en la producción y metabolismo del pollo de engorda. En el experimento 2 de este proyecto de investigación, la dosis de 750 g Ae/t de alimento mostró diferencias ($p < 0.05$) en los resultados de CA respecto al grupo control que no recibió Ae en los periodos de finalización (22 - 49 d) y acumulado (01 - 49 d). También existió en este mismo periodo una tendencia lineal a incrementar GDP y mejorar CA conforme se incrementaba la dosis de Ae en la dieta ($p < 0.05$).

Así como se ha demostrado que los extractos de ajo pueden ser beneficiosos en la productividad del pollo de engorda; también se han demostrado (Peinado y col., 2012; Kim y col., 2013b; Putnik y col., 2019) los efectos positivos de sus metabolitos secundarios en el crecimiento, tal es el caso del compuesto azufrado, propil propano tiosulfonato (PTSO) producido por el género *Allium* que en la última década ha sido estudiado por sus efectos anticoccidianos (Ruiz y col., 2010; Peinado y col., 2012; Kim y col., 2013b; Peinado y col., 2013).

Es importante mencionar que existen discrepancias en algunas investigaciones para aceptar la utilidad del *Allium* spp o sus derivados en la salud del pollo de engorda, ya que la mejora en las variables relacionadas con la producción como la ganancia de peso, el consumo de alimento y la conversión de alimento (Dey y Samanta, 1993; Javandel F., 2008; Choi y col., 2010) no ha sido constante en todos los estudios. Lo anterior lo explican Ruiz y col. (2010) al argumentar que la variabilidad en los resultados del rendimiento productivo, podría atribuirse a la falta de caracterización de los compuestos activos químicamente estables de los productos, ya que no todas las plantas, ni todas sus partes tienen la misma

concentración de sustancias activas, ni todos los procesos de extracción y procedimientos industriales afectan de la misma manera la estabilidad de los principios activos.

En los estudios 2 y 3, el desafío con *Eimeria* spp. afectó negativamente las variables productivas (GDP, CDA y CA), lo que fue más importante en la fase de iniciación (21 d, 9 d p. i.), coincidiendo con el ciclo parasitario. Estos resultados concuerdan con lo reportado en otras investigaciones con aves infectadas experimentalmente con *Eimeria* spp. (Ritzi y col., 2014; Holdsworth y col., 2004; Osho y Adeola, 2019; Stefanello y col., 2019). En nuestros experimentos realizados se observó que el uso de tratamientos anticoccidianos convencionales (grupos Clon) contrarrestó los efectos negativos causados por la eimeriosis; sin embargo, los resultados observados de los grupos Clon para algunas de las variables de respuesta no fue diferente ($p > 0.05$) de los obtenidos para grupos que recibieron el extracto encapsulado de aliáceas (Ae) y/o los grupos que recibieron Ae con butirato de sodio (B, estudiado en el experimento 3). La inclusión del Ae impactó positivamente las variables productivas (GDP y CA) de los pollos de engorda en los resultados de los tres estudios realizados, en comparación con los grupos que no lo recibieron, estableciéndose el contraste principalmente contra los grupos designados como controles desafiados (aves desafiadas con *Eimeria* spp., sin tratamiento alguno).

Las variables de producción como la GDP y la CA son buenos indicadores para evaluar el impacto de la infección y la efectividad de los fármacos anticoccidianos; pero, también los ooquistes por gramo de heces (OPG) y las lesiones intestinales (LS) son considerados indicadores complementarios (Chasser y col., 2020). En los experimentos 2 y 3, el valor más importante de OPG fue observado a los 21 días (9 d p. i.) que fue disminuyendo, hasta ser indetectable a los 35 días de edad, tal como lo mencionan El-Shazly y col. (2020). Este comportamiento es similar al observado con la administración de ionóforos (Yun y col., 2000), lo que sugiere que el ave monta una respuesta celular inmune para combatir los parásitos (Laurent y col.,

2001). En los mismos experimentos (2 y 3), las aves desafiadas (C) con *Eimeria* spp. excretaron más OPG, tuvieron mayor LS; en el experimento 3, las aves de los grupos C tuvieron menor longitud de vellosidades, menor relación vellosidad/cripta, menor concentración de xantofilas en plasma y menor valor de pigmentación cutánea que las aves no desafiadas (NC). Lo anterior indica que en los experimentos 2 y 3 el procedimiento de desafío fue efectivo.

En los experimentos 2 y 3 el uso de Ae no mostró diferencias en OPG respecto a Clon sobre todo en lo referente a *E. acervulina* y en el total de OPG. Es importante mencionar estudios (Elkhtam y col., 2014; Waqas y col., 2018) que concuerdan con el efecto del uso dietario de *Allium* (extractos o derivados activos) en la disminución de OPG en pollos de engorda desafiados con *Eimeria* spp.; por ejemplo, Kim y col. (2013b) quienes usaron PTSO y PTS (6.7 y 3.3, g/t de alimento, respectivamente), o Sidiropoulou y col. (2020) que utilizaron aceite esencial de ajo.

La asociación directa entre LS y OPG observada en los experimentos 2 y 3, ya había sido reportada por Elkhtam y col. (2014); en tanto la inversa entre LS y GDP, o directa con la CA, observadas a los 21 y 28 días de edad fueron reportadas para aves infectadas con *E. acervulina* previamente por Reid y Johnson (1970) principalmente una semana después del desafío. Conway y col. (1990) concluyeron que la correlación entre OPG, LS, GDP y CA depende del tipo de *Eimeria*, y el uso o no de anticoccidianos; estas correlaciones no siempre se detectan, posiblemente porque los pollos de engorda son capaces de hacer frente a un cierto nivel de daño intestinal antes de que influya en el rendimiento general (Ringenier y col., 2021).

El índice anticoccidiano quizás es una de las mejores variables para poder evaluar la efectividad de un producto contra la eimeriosis, ya que considera para su cálculo la mayoría de las variables explicadas hasta el momento, el peso ganado, la OPG, la TMLS, además de la tasa de sobrevivencia (Wang y col., 2021). En los experimentos 2 y 3 de este estudio se encontró que Clon y Ae tienen un índice

elevado lo que indica que son métodos adecuados para controlar la infección por *Eimeria* spp.

Como ya se mencionó, la mejora en la digestibilidad de nutrientes por el uso del Ae observada en el experimento 1 puede explicarse por los efectos del extracto en la microbiota digestiva; ya que la presencia de una microbiota intestinal saludable y funcional es esencial para el desempeño y la salud de las aves de corral (Aruwa y col., 2021). Hay estudios (Beam y col., 2021; Vezza y col., 2021) que demuestran el efecto modulador de la composición de la dieta en la microbiota intestinal; aunque, Abdelli y col. (2020) reportaron que el uso dietario de compuestos naturales (p. ej. ácidos orgánicos, aceites esenciales) puede no afectar la diversidad de la microbiota gastrointestinal en las aves de corral.

En el experimento 2 se determinó la abundancia bacteriana, siendo que en congruencia con otros estudios (Stanley y col., 2013; Feye y col., 2020) se observaron en íleon y ciego, como filos bacterianos principales Firmicutes y Bacteroidetes, los cuales junto con Proteobacteria son predominantes en las aves de corral y algunos mamíferos.

No se observó diferencia en la α diversidad de los diferentes segmentos intestinales, tampoco existió β diversidad entre tratamientos a nivel del íleon, sólo se observaron diferencias en familias y géneros del ciego, como ya ha sido reportado en desafíos con *Eimeria* spp. (Choi y Kim, 2022; Jebessa y col., 2022; Campos et al, 2023)

La coccidiosis experimental alteró la microbiota digestiva, lo que concuerda con Mohammadi y col. (2015) que menciona que tanto los patógenos intestinales como los parásitos alteran la microbiota intestinal, causan disbiosis e inflamación crónica, lo que disminuye el rendimiento productivo. También en nuestro experimento, se mostró que los grupos bajo desafío con *Eimeria* spp., tuvieron números más importantes de enteropatógenos de la familia *Enterobacteriaceae* (*Proteus*,

Escherichia, *Shigella*), así como de patógenos oportunistas de los géneros *Tyzerella*, *Eggertella* y *Biophila*. Si bien, estas representan menos del 1 % de la microbiota intestinal normal, pueden proliferar bajo ciertas condiciones de disbiosis y dañar el epitelio intestinal (Requena y col., 2022); lo que provocaría una digestión deficiente de las proteínas, cuyas fracciones no digeridas arribarían al intestino grueso para ser fermentadas por la microbiota o en su defecto entrarían en putrefacción (Apajalahti y Vienola, 2016). La putrefacción de la proteína genera compuestos nocivos y tóxicos (aminas, indoles, fenoles, cresol y amoníaco) que en altas concentraciones pueden afectar negativamente la salud del huésped o de las células, así como causar efectos adversos en el crecimiento y el rendimiento de los pollos (Apajalahti y Vienola, 2016). En aves desafiadas se ha observado una mayor proliferación del género *Campylobacter*, aunque se ha reportado (Stern y col., 1995) que la microbiota intestinal del pollo contiene varias especies no patógenas de este género que rara vez provocan enfermedad en el pollo de engorda; sin embargo, pueden contaminar los productos cárnicos del ave y dar lugar a decomisos (Rouger y col., 2017). Diferentes grupos de investigación (Pelicano y col., 2005; Kumar y col., 2010; Kim y col., 2011; Frick y Autenrieth, 2013; Peinado y col., 2013) han observado que la disminución de enterobacterias, mejora el ambiente intestinal, reduce el efecto negativo del sobrecrecimiento de ellas en la mucosa, y promueve la absorción de nutrientes. En este sentido, Ruiz y col. (2010) mostraron *in vitro* que el PTSO, tiene una actividad antimicrobiana afectando sobre todo a las poblaciones de enterobacterias y coliformes; afectando a su vez las curvas de multiplicación de *Escherichia coli* y *Salmonella*.

Los grupos desafiados que recibieron 500 g Ae/t alimento (C500) presentaron más organismos de los géneros *Ruminococcus*, *Firmicutes* e *Intestinimonas* en comparación con el grupo Clon. Es necesario señalar que los *Ruminococcus* producen celulasas, xilanasas y celobiasas (Pettipher y Latham, 1979; Flint y col., 1991; Saburi y col., 2010); además producen ácido butírico a partir de carbohidratos estructurales (Apajalahti y Vienola, 2016). Se ha consignado que algunas especies

de *Ruminococcus* producen bacteriocinas en beneficio de la salud intestinal del pollo de engorda, ya que se incrementa la absorción intestinal y se promueve el crecimiento de *Lactobacillus* (Wang y col., 2011). La modificación en la microbiota intestinal (experimento 2) puede contribuir a explicar la mejora en digestibilidad de nutrientes (experimento 1) y del comportamiento productivo de las aves (experimentos 2 y 3) siendo evidente, cuando el género *Ruminococcus* está presente en abundancia (Gharib-Naseri y col., 2021). Aunado a esto, las *Intestinimonas* son productoras de ácidos grasos de cadena corta, relacionadas con el incremento de ácidos acético y butírico al utilizar sustratos como azúcares y aminoácidos como la lisina (Bui y col., 2015). Esta característica es única en el ecosistema intestinal, ya que conecta dos importantes características metabólicas, producción de ácido butírico y fermentación de aminoácidos (Zhang y col., 2022). El ácido butírico contribuye al crecimiento de las células epiteliales intestinales (Biddle y col., 2013; Bui y col., 2015); condición que fue notada en el experimento 3. Además, es una fuente de energía para el ave, mejora la función de barrera intestinal regulando la expresión de proteínas de unión estrecha de las células epiteliales intestinales, y la producción de mucina (Wei y col., 2018). Además, se le atribuye la capacidad de afectar negativamente bacterias patógenas intestinales como *Salmonella typhimurium* y *Clostridium perfringens* (Namkung et al, 2011). Con todas estas acciones, el ácido butírico promueve la salud intestinal (Zhang y col., 2022).

Por otra parte, Ur Rahman y col. (2017) utilizaron un extracto de *Allium cepa* observando la disminución en la población de *E. coli* y el aumento en las especies de *Lactobacillus* y *Streptococcus*; mientras que Sidiropoulou y col. (2020) usaron una mezcla de aceites esenciales de orégano con ajo encontrando mayores conteos de *E. coli* y *Enterobacteriaceae*, y menores conteos de *Clostridium perfringens* respecto a un grupo control. Por el contrario Peinado y col. (2012) incluyendo PTSO en el alimento no encontraron diferencias en cuanto a la presencia de *Clostridium perfringens* y *Campylobacter jejuni* en el tracto gastrointestinal; pero sí, observaron un menor número de copias de *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* en los contenidos

de íleon y ciego. Los efectos beneficiosos del Ae sobre la modulación de la microbiota intestinal que se observaron en el experimento 2 de este proyecto están en concordancia con los resultados de *Veza y col. (2021)* quienes demostraron que el consumo de 0.1, 0.5, 1 mg PTSO/kg/día contrarrestan y normalizan la disbiosis intestinal en un modelo murino de síndrome metabólico.

Como ya se mencionó, la eimeriosis daña los intestinos de las aves afectando la absorción de nutrientes; además de la de los carotenoides incluidos en las dietas que garantizan la pigmentación cutánea de las aves (*Muñoz-Díaz y col., 2012*). En consecuencia, la deficiente absorción de xantofilas provoca falta de pigmentación de la piel del ave (*Bletner y col., 1966, Allen, 1987*). En el experimento 3, la V/C de duodeno y yeyuno de los grupos Ae, NC0 y Clon no fueron diferentes entre sí, a los 28 y 35 d ($p > 0.05$); siendo que Ae tuvo una mejor V/C ($p < 0.05$) que lo alcanzado en el C0, tanto en duodeno (21, 28 y 35 d) como en yeyuno (21 d). *Peinado y col. (2012)* y *Ur Rahman y col. (2017)* incluyeron en las dietas de pollos de engorda compuestos de *Allium* spp., lo que mejoró la altura y anchura de las vellosidades intestinales, además de incrementar la superficie de absorción para una mayor absorción de nutrientes. Los resultados de pigmentación de las aves del NC0 que tuvieron entre 60 y 80 % mayor concentración plasmática de xantófilas a los 21 y 28 días de edad en comparación con el grupo C0, muestran la importancia de la salud intestinal. En el caso de los grupos que recibieron Ae tuvieron también una mayor (41, 44 y 24 %) concentración de carotenoides (días 21, 28 y 49, respectivamente) en comparación con C0. Además, de un mayor amarillamiento cutáneo a los 28 días de edad en comparación con C0. Cabe señalar que en el experimento 3 se utilizaron Ae y butirato de sodio (B); los tratamientos con butirato de sodio (C250B, C500B), mostraron el beneficio del uso de B, ya que tuvieron vellosidades en duodeno y yeyuno más largas a los 21 d de edad, que los tratamientos C250 y C500, coincidiendo con los resultados de otros autores (*Smulikowska et al, 2009; Pardo et al, 2014; Wu y col., 2018*). Este resultado favoreció la concentración plasmática de

xantofilas (día 21); pero no la pigmentación de piel, ni el desempeño productivo de las aves.

En los experimentos 2 y 3, los grupos NC0, fueron considerados como el modelo de animales sanos, quienes mostraron de forma generalizada los valores más importantes en las variables de producción, morfología intestinal, y pigmentación cutánea en vivo y en la canal fría, y los valores menos importantes en cuanto a la severidad de la infección (OPG, LS). Lo que una vez más remarca la importancia de la salud intestinal para la digestión, absorción de nutrientes y en consecuencia hacer la producción eficiente (McCaffrey y col., 2021).

El hecho de que los resultados de las dosis usadas de este extracto encapsulado de aliáceas sean en muchas de las variables evaluadas no diferentes al uso de ionóforos; pero, sí del control desafiado (C0) es relevante; además, apoyaría el uso del Ae como una alternativa anticoccidiano factible. El Ae en conjunto con butirato de sodio (usado en el experimento 3) favorecerían la morfología intestinal. Hay que considerar que el Ae no está actualmente clasificado como anticoccidiano.

De los resultados de los tres experimentos se puede consignar que una sola dosis no puede favorecer el efecto óptimo en todas las variables estudiadas (digestibilidad de nutrientes, ganancia de peso, consumo de alimento, conversión alimenticia, severidad de la infección (OPG, LS), morfología intestinal, índice anticoccidiano, microbiota intestinal, xantofilas en sangre y pigmentación cutánea), en pollos sanos o infectados con *Eimeria* spp., por lo que deben realizarse mayores estudios en la búsqueda de dosis-respuesta. Los resultados del proyecto son relevantes, debido a la importancia de determinar la edad adecuada teniendo en cuenta el ciclo de vida de la *Eimeria* spp., para utilizar una intervención anticoccidiana, asegurando que el producto ejerza su efecto. En este sentido, algunos estudios (Adjei-Mensah y Atuahene, 2022) *in vitro* han reportado que el ajo y sus derivados inhiben la

esporulación de ooquistes, sin embargo, el modo de acción aún no está claro (Ali y col., 2019), por lo que debe de estudiarse.

8. CONCLUSIONES GENERALES

Con los resultados obtenidos en este estudio, parece razonable proponer al extracto encapsulado de aliáceas como un producto natural eficaz para prevenir y controlar la coccidiosis, reduciendo los ooquistes que se excretan y el grado de las lesiones en la mucosa intestinal causadas por este protozoario, promoviendo el crecimiento de bacterias intestinales productoras de ácidos grasos volátiles principalmente butírico, el cual desempeña un papel importante en la protección de la integridad de la mucosa intestinal, incrementando la digestibilidad de nutrientes, logrando, disminuir la afectación en el crecimiento, la conversión alimenticia y la pigmentación del pollo de engorda desafiado con *Eimeria* spp. Sin embargo, es importante llevar a cabo estudios más amplios para entender el mecanismo por el cual el Ae (PTSO) utilizado ejerce su acción sobre *Eimeria* spp., la dosis óptima de uso, así como entender los mecanismos con los que tiene efecto en las funciones biológicas implicadas en la salud intestinal y el rendimiento productivo del ave.

10.REFERENCIAS

- AARTI, C. y KHUSRO, A. 2020. Role of garlic (*Allium sativum*) as feed supplements in poultry industries: An overview. *World's News of Natural Science* 29, 151-161.
- ABAD, P., ARROYO-MANZANARES, N., RIVAS-MONTOYA, E., OCHANDO-PULIDO, J. M., GUILLAMON, E., GARCÍA-CAMPAÑA, A. M., MARTINEZ-FEREZ, A. y PLAIZIER, J. 2019. Effects of different vehiculation strategies for the *Allium* derivative propyl propane thiosulfonate during dynamic simulation of the pig gastrointestinal tract. *Canadian Journal of Animal Science*, 99, 244-253.
- ABBAS, R. Z., IQBAL, Z., BLAKE, D., KHAN, M. N. y SALEEMI, M. K. 2011. Anticoccidiano drug resistance in fowl coccidia: the state of play revisited. *World's Poultry Science Journal*, 67, 337-350.
- ABDELLI, N., PEREZ, J. F., VILARRASA, E., CABEZA LUNA, I., MELO-DURAN, D., D'ANGELO, M. y SOLA-ORIOLO, D. 2020. Targeted-release organic acids and essential oils improve performance and digestive function in broilers under a necrotic enteritis challenge. *Animals (Basel)*, 10.
- ADJEI-MENSAH, B. y ATUAHENE, C. C. 2022. Avian coccidiosis and anticoccidial potential of garlic (*Allium sativum* L.) in broiler production: A Review. *Journal of Applied Poultry Research*, 32, 100314.
- AGBOR, G. A., MOUMBEGNA, P., OLUWASOLA, E. O., NWOSU, L. U., NJOKU, R. C., KANU, S., EMEKABASI, E. I., AKIN, F., OBASI, A. P. y ABUDEI, F. A. 2011. Antioxidant capacity of some plant foods and beverages consumed in the Eastern Region of Nigeria. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 8, 362-9.
- AGHAZADEH, A. M., y TAHAYAZDI, M. 2012. Effect of butyric acid supplementation and whole wheat inclusion on the performance and carcass traits of broilers. *South African Journal of Animal Science*, 42(3), 241-248.
- ALBERTUZ-CRESPO, M. 2021. Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana de dos compuestos derivados de *Allium cepa* (propil propano tiosulfinato y propil propano tiosulfonato) frente a microorganismos patógenos humanos.
- ALI, M., CHAND, N. y KHAN, R. 2019. Anticoccidial effect of garlic (*Allium sativum*) and ginger (*Zingiber officinale*) against experimentally induced coccidiosis in broiler chickens. *Journal of Applied Animal Research*, 1, 79-84.
- ALLEN, P. C. 1987. Physiological responses of chicken gut tissue to coccidial infection: comparative effects of *Eimeria acervulina* and *Eimeria mitis* on mucosal mass, carotenoid content, and brush border enzyme activity. *Poult Sci*, 66, 1306-15.
- ALNASSAN, A. A., THABET, A., DAUGSCHIES, A. y BANGOURA, B. 2015. In vitro efficacy of allicin on chicken *Eimeria tenella* sporozoites. *Parasitol. Res.*, 114, 3913-5.
- AMAD, A. A., MANNER, K., WENDLER, K. R., NEUMANN, K. y ZENTEK, J. 2011. Effects of a phytogetic feed additive on growth performance and ileal nutrient digestibility in broiler chickens. *Poult Sci*, 90, 2811-6.

- APAJALAHTI, J. y VIENOLA, K. 2016. Interaction between chicken intestinal microbiota and protein digestion. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 221, 323-330.
- ARUWA, C. E., PILLAY, C., NYAGA, M. M. y SABIU, S. 2021. Poultry gut health - microbiome functions, environmental impacts, microbiome engineering and advancements in characterization technologies. *J Anim Sci Biotechnol*, 12, 119.
- BARBA, F. J., Y ORLIENA, V. 2017. Processing, bioaccessibility and bioavailability of bioactive sulfur compounds: Facts and gaps. *Journal of Food composition and Analysis*.
- BARBIERI, R., COPPO, E., MARCHESI, A., DAGLIA, M., SOBARZO-SÁNCHEZ, E., NABAVI, S. F. y NABAVI, S. M. 2017. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiol Res*, 196, 44-68.
- BATIHA, GES., MAGDY BESHBIHY, A., L, G. W., ELEWA, Y. H. A., A, A. A.-S., ABD EL-HACK, M. E., TAHA, A. E., Y, M. A.-E. y PRASAD DEVKOTA, H. 2020. Chemical constituents and pharmacological activities of garlic (*Allium sativum* L.): A Review. *Nutrients*, 12.
- BEAM, A., CLINGER, E. y HAO, L. 2021. Effect of diet and dietary components on the composition of the gut microbiota. *Nutrients*, 13.
- BIDDLE, A., STEWART, L., BLANCHARD, J. y LESCHINE, S. 2013. Untangling the genetic basis of fibrolytic specialization by *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae* in diverse gut communities. *Diversity*, 5, 627-640.
- BLAKE, D. P., KNOX, J., DEHAECK, B., HUNTINGTON, B., RATHINAM, T., RAVIPATI, V., AYOADE, S., GILBERT, W., ADEBAMBO, A. O., JATAU, I. D., y col. 2020a. Re-calculating the cost of coccidiosis in chickens. *Vet. Res.*, 51, 115.
- BLAKE, D. P., VRBA, V., Xia, D., JATAU, I. D., SPIRO, S., NOLAN, M. J., ... & TOMLEY, F. M. 2021. Genetic and biological characterization of three cryptic *Eimeria* operational taxonomic units that infect chickens (*Gallus gallus domesticus*). *International J. Parasitol.*, 51(8), 621-634.
- BLAKE, D. P., WORTHING, K. y JENKINS, M. C. 2020b. Exploring *Eimeria* genomes to understand population biology: Recent progress and future opportunities. *Genes (Basel)*, 11.
- BLETNER, J. K., MITCHELL, R. P., JR. y TUGWELL, R. L. 1966. The effect of *Eimeria maxima* on broiler pigmentation. *Poult Sci*, 45, 689-94.
- BOELENS, M., DE VALOIS, P. J., WOBVEN, H. J. y VAN DER GEN, A. 1971. Volatile flavor compounds from onion. *J. Agr. Food Chem.*, 19, 984-991.
- BORTOLUZZI, C., ROTHROCK, M. J., VIEIRA, B. S., MALLO, J. J., PUYALTO, M., HOFACRE, C. y APPLGATE, T. J. 2018. Supplementation of protected sodium butyrate alone or in combination with essential oils modulated the cecal microbiota of broiler chickens challenged with coccidia and clostridium perfringens. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2.

- BOTAS, J., FERNANDES, Â., BARROS, L., ALVES, M. J., CARVALHO, A. M., y FERREIRA, I. C. 2019. A comparative study of black and white *Allium sativum* L.: Nutritional composition and bioactive properties. *Molecules*, 24(11), 2194.
- BOZKURT, M., GIANNENAS, I., KÜÇÜKYILMAZ, K., CHRISTAKI, E. y FLOROU-PANERI, P. 2013. An update on approaches to controlling coccidia in poultry using botanical extracts. *British Poultry Science*, 54, 713-727.
- BRZÓSKA, F., ŚLIWIŃSKI, B., MICHALIK-RUTKOWSKA, O. y ŚLIWA, J. 2015. The effect of garlic (*Allium sativum* L.) on growth performance, mortality rate, meat and blood parameters in broilers. *Annals of Animal Science*, 15, 961-975.
- BUI, T. P. N., RITARI, J., BOEREN, S., DE WAARD, P., PLUGGE, C. M. y DE VOS, W. M. 2015. Production of butyrate from lysine and the Amadori product fructose lysine by a human gut commensal. *Nature Communications*, 6, 10062.
- CAMPOS, P. M., MISKA, K. B., JENKINS, M. C., YAN, X. y PROSZKOWIEC-WEGLARZ, M. 2023. Effects of *Eimeria acervulina* infection on the luminal and mucosal microbiota of the duodenum and jejunum in broiler chickens. *Frontiers in Microbiology*, 14.
- CASTANON, J. I. R. 2007. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poult. Sci.*, 86, 2466-2471.
- CENCIC, A. y CHINGWARU, W. 2010. The role of functional foods, nutraceuticals, and food supplements in intestinal health. *Nutrients*, 2, 611-25.
- CHAPMAN, H. D. 1989. *Eimeria tenella*, *E. acervulina* and *E. maxima*: studies on the development of resistance to diclazuril and other anticoccidial drugs in the chicken. *Parasitology*, 99 Pt 2, 189-92.
- CHAPMAN, H. D. 2014. Milestones in avian coccidiosis research: a review. *Poult Sci*, 93, 501-11.
- CHAPMAN, H. D., BARTA, J. R., BLAKE, D., GRUBER, A., JENKINS, M., SMITH, N. C., SUO, X. y TOMLEY, F. M. 2013. A selective review of advances in coccidiosis research. *Adv Parasitol*, 83, 93-171.
- CHASSER, K. M., DUFF, A. F., WILSON, K. M., BRIGGS, W. N., LATORRE, J. D., BARTA, J. R. y BIELKE, L. R. 2020. Research Note: Evaluating fecal shedding of oocysts in relation to body weight gain and lesion scores during *Eimeria* infection. *Poult Sci*, 99, 886-892.
- CHOI, I. H., PARK, W. Y. y KIM, Y. J. 2010. Effects of dietary garlic powder and {alpha}-tocopherol supplementation on performance, serum cholesterol levels, and meat quality of chicken. *Poult Sci*, 89, 1724-31.
- CHOI, J. y KIM, W. 2022. Interactions of microbiota and mucosal immunity in the ceca of broiler chickens infected with *Eimeria tenella*. *Vaccines*, 10, 1941.
- CHOWDHURY, S., MANDAL, G. P., PATRA, A., KUMAR, P., SAMANTA, I., MUKHOPADHAYAY, S. K. y SAMANTA, A. 2017. Different essential oils in diets of broiler chickens: 2. Gut microbes and morphology, immune response, and some blood profile and antioxidant enzymes. *Animal Feed Science and Technology*, 236.

- CLAUDIA, C., MAREIKE, K., ELODIE, V., MARIO, D., CLAUS, J. y MARC, D. 2011. Naturally Occurring Organic Sulfur Compounds: An Example of a Multitasking Class of Phytochemicals in Anti-Cancer Research. In: IRAJ, R. (ed.) Phytochemicals. Rijeka: IntechOpen.
- CONAFAB 2022. La Industria Alimentaria Animal en México. CONAFAB. México.
- CONWAY, D. P., MCKENZIE, M. E. y 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 Pathol*, 19, 489-96.
- CÓRDOVA B., M. D. L. Á. 2010. Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas (Doctoral dissertation).
- CUELLAR-SAENZ, J. A. 2022. Overview of egg and broiler production in Mexico. Poultry farming dedicated to egg and broiler production in Mexico plays a very important role in the Mexican economy. *Veterinaria Digital*. Panamá: Veterinaria Digital SA.
- DALLOUL, R. A. y LILLEHOJ, H. S. 2006. Poultry coccidiosis: recent advancements in control measures and vaccine development. *Expert Rev Vaccines*, 5, 143-63.
- DHAMI, N. y MISHRA, A. 2015. Phytochemical variation: How to resolve the quality controversies of herbal medicinal products?. *J. Herbal Med.* 5. 118-127. 10.1016/j.hermed.2015.04.002.
- DEY, A. y SAMANTA, A. R. 1993. Effect of feeding garlic (*Allium sativum* Linn.) as a growth promoter in broilers. *Indian J. Anim. Health*, 32, 17-19.
- DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS, 2001, Reglamento (CE) No 2205/2001 de la Comisión, L 297/3-4, Bruselas 14 Nov 2001.
- EDGAR, S. A. 1970. Coccidiosis: Evaluations of coccidiostats under field conditions; statement of problems. *Experimental Parasitology*, 28(1), 90-94.
- ELKHTAM, A., SHATA, A. y EL-HEWAITY, M. H. 2014. Efficacy of turmeric (*Curcuma longa*) and garlic (*Allium sativum*) on *Eimeria* species in broilers. *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 3.
- ELNESR, S. S., ALAGAWANY, M., ELWAN, H. A. M., FATHI, M. A. y FARAG, M. R. 2020. Effect of sodium butyrate on intestinal health of poultry – A review. *Annals An Sci*, 20, 29-41.
- ELNESR, S. S., ROPY, A., y ABDEL-RAZIK, A. H. 2019. Effect of dietary sodium butyrate supplementation on growth, blood biochemistry, haematology and histomorphometry of intestine and immune organs of Japanese quail. *Animal*, 13(6), 1234-1244.
- EL-SHAZLY, K., EL-LATIF, A., EL-AZIZ, M., SOBHY, W., EL-MORSEY, A. y EL-MOGAZY, H. 2020. The anticoccidial activity of the fluoroquinolone lomefloxacin against experimental *Eimeria tenella* infection in broiler chickens. *Parasitology Research*, 119, 1-14.
- FETTERER, R. H., MISKA, K. B., JENKINS, M. C. y BARFIELD, R. C. 2004. A conserved 19-kDa *Eimeria tenella* antigen is a profilin-like protein. *J Parasitol.*, 90, 1321-1328, 8.

- FEYE, K. M., BAXTER, M. F. A., TELLEZ-ISAIAS, G., KOGUT, M. H., y RICKE, S. C. 2020. Influential factors on the composition of the conventionally raised broiler gastrointestinal microbiomes. *Poultry science*, 99(2), 653-659.
- FLINT, H. J., MCPHERSON, C. A. y MARTIN, J. 1991. Expression of two xylanase genes from the rumen cellulolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens* 17 cloned in pUC13. *Microbiology*, 137, 123-129.
- FRICK, J. S. y AUTENRIETH, I. B. 2013. The gut microflora and its variety of roles in health and disease. *Curr Top Microbiol Immunol*, 358, 273-89.
- GÁLFI, P., y NEOGRÁDY, S. 2001. The pH-dependent inhibitory action of n-butyrate on gastrointestinal epithelial cell division. *Food Res. Int.*, 34(7), 581-586.
- GARCIA, J. L., GUIMARAES JDA, S., JR., HEADLEY, S. A., BOGADO, A. L., BUGNI, F. M., RAMALHO, D. C. y DE SOUZA, L. M. 2008. *Eimeria tenella*: utilization of a nasal vaccine with sporozoite antigens incorporated into Iscom as protection for broiler breeders against a homologous challenge. *Exp Parasitol*, 120, 185-90.
- GAZONI, F. 2020. La importancia del monitoreo de la coccidiosis. https://www.engormix.com/avicultura/coccidiosis-aviar/importancia-monitoreo-coccidiosis_a45688/
- Germosén- Robineau, L. 2005. *Farmacopea Vegetal Caribeña*. 2 ed. TRAMIL Ed. Universitaria, UANL.
- GHARIB-NASERI, K., DORIGAM, J. C. P., DORANALLI, K., MORGAN, N., SWICK, R. A., CHOCT, M. y WU, S.-B. 2021. *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 improves performance and gut function in broilers fed different levels of protein and/or under necrotic enteritis challenge. *Animal Nutrition*, 7, 185-197.
- GIANNENAS, I., FLOROU-PANERI, P., PAPAZHARIADOU, M., CHRISTAKI, E., BOTSOGLOU, N. A. y SPAIS, A. B. 2003. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. *Arch Tierernahr*, 57, 99-106.
- GIRARD, F., FORT, G., YVORÉ, P. y QUÉRÉ, P. 1997. Kinetics of specific immunoglobulin A, M and G production in the duodenal and caecal mucosa of chickens infected with *Eimeria acervulina* or *Eimeria tenella*. *International J. Parasitol.*, 27, 803-809.
- GOMEZ-OSORIO L-M. 2021 *Uso Estratégico de Anticoccidiales Ionóforos, Ionóforos Potencializados y Anticoccidiales Naturales en la Industria Avícola*. *Plumazos* 69:16–31.
- González-Robles, 2021. Anticoccidiales o vacunas: ¿qué fue primero? <https://www.avicultura.mx/destacado/anticoccidiales-o-vacunas-que-fue-primero>
- GUILLOTEAU, P., MARTIN, L., EECKHAUT, V., DUCATELLE, R., ZABIELSKI, R. y VAN IMMERSEEL, F. 2010. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutr Res Rev*, 23, 366-84.
- HAFEZ, H. 2008. Poultry coccidiosis: Prevention and control approaches. *Archiv fur Geflugelkunde*, 72, 2-7.

- HALL, A., TROUPIN, A., LONDONO-RENTERIA, B. y COLPITTS, T. M. 2017. Garlic Organosulfur Compounds Reduce Inflammation and Oxidative Stress during Dengue Virus Infection. *Viruses*, 9.
- HASHEMI, S. R. y DAVOODI, H. 2010. Phytochemicals as new class of feed additive In poultry industry. *J Anim Vet Adv*, 9, 2295-2304.
- HASHEMI, S. R., IDRUS, Z., HAIR-BEJO, M., KARAMI, M. y SOLEIMANI FARJAM, A. 2009. The effects of *Euphorbia hirta* and acidifier supplementation on growth performance and antioxidant activity in broiler chickens.
- HASHEMI, S. R., ZULKIFLI, I., HAIR BEJO, M., FARIDA, A. y SOMCHIT, M. N. 2008. Acute toxicity study and phytochemical screening of selected herbal aqueous extract in broiler chickens. *International J Pharmacol*, 4, 352-360.
- HIGDON J. 2005 Garlic <https://lpi.oregonstate.edu/mic/food-beverages/garlic#authors-reviewers>
- HOLDSWORTH, P. A., CONWAY, D. P., MCKENZIE, M. E., DAYTON, A. D., CHAPMAN, H. D., MATHIS, G. F., SKINNER, J. T., MUNDT, H. C., WILLIAMS, R. B. y WORLD ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF VETERINARY, P. 2004. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) guidelines for evaluating the efficacy of anticoccidial drugs in chickens and turkeys. *Vet Parasitol*, 121, 189-212.
- JANG, I., KO, Y., KANG, S. y LEE, C. 2007. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. *Anim Feed Sci Tech.*, 134, 304-315.
- JAVANDEL F., N. B., SEIFDAVATI J., POURRAHIMI G.H., BANUYAGHOUB S. 2008. The favorite dosage of garlic meal as a feed additive in broiler chicken ratios. *Pakistan J. Biol. Sci.*, 11, 1746-1749.
- JEBESSA, E., GUO, L., CHEN, X., BELLO, S. F., CAI, B., GIRMA, M., HANOTTE, O. y NIE, Q. 2022. Influence of *Eimeria maxima* coccidia infection on gut microbiome diversity and composition of the jejunum and cecum of indigenous chicken. *Frontiers in Immunology*, 13.
- JEFFERS, T. K. 1974. Anticoccidial drug resistance: differences between *Eimeria acervulina* and *E. tenella* strains within broiler houses. *Poult Sci*, 53, 1009-13.
- JOHNSON, J. y REID, W. M. 1970. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Exp Parasitol*, 28, 30-6.
- KAIRALLA, M. A., ALSHELMANI, M. I. y ABURAS, A. A. 2022. Effect of diet supplemented with graded levels of garlic (*Allium sativum* L.) powder on growth performance, carcass characteristics, blood hematology, and biochemistry of broilers. *Open Vet J*, 12, 595-601.
- KIM, D. K., LILLEHOJ, H. S., LEE, S. H., LILLEHOJ, E. P. y BRAVO, D. 2013b. Improved resistance to *Eimeria acervulina* infection in chickens due to dietary supplementation with garlic metabolites. *Br J Nutr*, 109, 76-88.

- KIM, D., LILLEHOJ, H., LEE, S., JANG, S., PARK, M., MIN, W., LILLEHOJ, E. y BRAVO, D. 2013a. Immune effects of dietary anethole on *Eimeria acervulina* infection. Poultry science, 92, 2625-34.
- KIM, G. B., SEO, Y. M., KIM, C. H. y PAIK, I. K. 2011. Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. Poult Sci, 90, 75-82.
- KIM, W. H., CHAUDHARI, A. A. y LILLEHOJ, H. S. 2019. Involvement of T cell immunity in avian coccidiosis. Frontiers in Immunology, 10.
- KLEESSEN, B., ELSAYED, N. A., LOEHREN, U., SCHROEDL, W. y KRUEGER, M. 2003. Jerusalem artichokes stimulate growth of broiler chickens and protect them against endotoxins and potential cecal pathogens. J Food Prot, 66, 2171-5.
- KOTHARI, D., LEE, W. D., NIU, K. M. y KIM, S. K. 2019. The genus *Allium* as poultry feed additive: A Review. Animals (Basel), 9.
- KOVAROVIČ, J., BYSTRICKA, J., VOLLMANNOVÁ, A., TÓTH, T., y BRINDZA, J. 2019. Biologically valuable substances in garlic (*Allium sativum* L.)—A review. Journal of Central European Agriculture, 20(1), 292-304.
- KUMAR, H., KAWAI, T. y AKIRA, S. 2011. Pathogen Recognition by the Innate Immune System. International Reviews of Immunology, 30, 16-34.
- KUMAR, S., SHARADAMMA, K. C. y RADHAKRISH, P. M. 2010. Effects of a garlic active based growth promoter on growth performance and specific pathogenic intestinal microbial counts of broiler chicks. International Journal of Poultry Science, 9, 244-246.
- LAPARRA, J. M. y SANZ, Y. 2010. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. Pharmacol Res, 61, 219-25.
- LAURENT, F., MANCASSOLA, R., LACROIX, S., MENEZES, R. y NACIRI, M. 2001. Analysis of chicken mucosal immune response to *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* infection by quantitative reverse transcription-PCR. Infect Immun, 69, 2527-34.
- LAWSON, L.D. 1996. The composition and chemistry of garlic cloves and processed garlic. In: Garlic: the science and therapeutic application of *Allium sativum* L. and related species, Koch, H.D., Lawson, L.D. (chief ed.), Williams & Wilkins, Baltimore, MD, pp. 37-107.
- LE LEU, R. K., HU, Y., BROWN, I. L., y YOUNG, G. P. 2009. Effect of high amylose maize starches on colonic fermentation and apoptotic response to DNA-damage in the colon of rats. Nutrition & metabolism, 6, 1-9.
- LEE, S. H., LILLEHOJ, H. S., JANG, S. I., LEE, K. W., PARK, M. S., BRAVO, D. y LILLEHOJ, E. P. 2011. Cinnamaldehyde enhances in vitro parameters of immunity and reduces *In vivo* infection against avian coccidiosis. Br J Nutr, 106, 862-9.
- LILLEHOJ, H. 1998. Role of T lymphocytes and cytokines in coccidiosis. International journal for parasitology, 28, 1071-1081.

- LILLEHOJ, H. 1994. Analysis of *Eimeria acervulina* - induced changes in the intestinal T lymphocyte subpopulations in two chicken strains showing different levels of susceptibility to coccidiosis. *Research in veterinary science*, 56 (1), 1-7.
- LILLEHOJ, H. S. 1987. Effects of immunosuppression on avian coccidiosis: cyclosporin A but not hormonal bursectomy abrogates host protective immunity. *Infection and immunity*, 55, 1616-1621.
- LILLEHOJ, H. S., MIN, W. y DALLOUL, R. A. 2004. Recent progress on the cytokine regulation of intestinal immune responses to *Eimeria*. *Poult Sci*, 83, 611-23.
- LÓPEZ-OSORIO, S., CHAPARRO-GUTIÉRREZ, J. J. y GÓMEZ-OSORIO, L. M. 2020. Overview of poultry *Eimeria* life cycle and host-parasite interactions. *Front Vet Sci*, 7, 384.
- LUENGO, L. T. 2007. El ajo, propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas, ámbito farmacéutico. *Fitoter*.
- MALLO, J. J., PUYALTO, M., y RAO, S. R. 2012. Evaluation of the effect of sodium butyrate addition to broiler diets on energy and protein digestibility, productive parameters and size of intestinal villi of animals. *Feed Compounder*, 32 (1), 30-33.
- MARTÍNEZ S., 2015. Programas anticoccidiales y rendimientos productivos. <https://seleccionesavicolas.com/avicultura/2015/02/programas-anticoccidiales-y-rendimientos-productivos/>
- MATHLOUTHI, N., BOUZAIENNE, T., OUESLATI, I., RECOQUILLAY, F., HAMDI, M., URDACI, M. y BERGAOUI, R. 2012. Use of rosemary, oregano, and a commercial blend of essential oils in broiler chickens: in vitro antimicrobial activities and effects on growth performance. *J Anim Sci*, 90, 813-23.
- MCCAFFREY, C., CORRIGAN, A., MOYNAGH, P. y MURPHY, R. 2021. Effect of yeast cell wall supplementation on intestinal integrity, digestive enzyme activity and immune traits of broilers. *Br Poult Sci*, 62, 771-782.
- MCKNIGHT, L., PEPPLER, W., WRIGHT, D., PAGE, G. y HAN, Y. 2019. A blend of fatty acids, organic acids, and phytochemicals induced changes in intestinal morphology and inflammatory gene expression in coccidiosis-vaccinated broiler chickens. *Poultry Science*, 98.
- MOHAMMADI, R., HOSSEINI-SAFA, A., EHSANI ARDAKANI, M. J. y ROSTAMI-NEJAD, M. 2015. The relationship between intestinal parasites and some immune-mediated intestinal conditions. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 8, 123-31.
- MORA-GONZALES B. M., 2022. Vacunas contra coccidias en aves: tipos de vacuna y procedimientos de vacunación. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima Perú.
- <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/18435>
- MUÑOZ-DÍAZ, J. I., FUENTE-MARTÍNEZ, B., HERNÁNDEZ-VELASCO, X. y 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.
- NAMKUNG, H., YU, H., GONG, J. y LEESON, S. 2011. Antimicrobial activity of butyrate glycerides toward *Salmonella Typhimurium* and *Clostridium perfringens*. Poult. Sci., 90, 2217-2222.
- OKORO, B. C., DOKUNMU, T. M., OKAFOR, E., SOKOYA, I. A., ISRAEL, E. N., OLUSEGUN, D. O., y UGBOGU, E. E. A. 2023. The ethnobotanical, bioactive compounds, pharmacological activities and toxicological evaluation of garlic (*Allium sativum*): A Review. Pharmacological Research-Modern Chinese Medicine, 100273.
- OSHO, S. O., XIAO, W. W. y ADEOLA, O. 2019. Response of broiler chickens to dietary soybean bioactive peptide and coccidia challenge. Poult Sci, 98, 5669-5678.
- OSHO, S. O., & ADEOLA, O. 2019. Impact of dietary chitosan oligosaccharide and its effects on coccidia challenge in broiler chickens. British Poult. Sci., 60(6), 766-776.
- OZMA, M. A., ABBASI, A., AHANGARZADEH REZAAE, M., HOSSEINI, H., HOSSEINZADEH, N., SABAHI, S., ALI NOORI, S. M., SEPORDEH, S., KHODADADI, E., LAHOUTY, M., KAFIL, H. S. 2023. A critical review on the nutritional and medicinal profiles of garlic's (*Allium sativum* L.) bioactive compounds. Food Reviews Int., 39(9), 6324-6361.
- PARDO, F., PUYALTO, M., ORTIZ, A., TORREALBA, H., MALLO, J. y RIBOTY, R. 2014. Effect of partially protected sodium butyrate on performance, digestive organs, intestinal villi and e. coli development in broilers chickens. Int. J. Poult. Sci., 13.
- PEEK, H. W. y LANDMAN, W. J. 2011. Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. Vet Q, 31, 143-61.
- PEINADO, M. J., RUIZ, R., ECHAVARRI, A. y RUBIO, L. A. 2012. Garlic derivative propyl propane thiosulfonate is effective against broiler enteropathogens *In vivo*. Poult Sci, 91, 2148-57.
- PEINADO, M. J., RUIZ, R., ECHÁVARRI, A., ARANDA-OLMEDO, I. y RUBIO, L. A. 2013. Garlic derivative PTS-O modulates intestinal microbiota composition and improves digestibility in growing broiler chickens. Anim. Feed Sci. Tech., 181, 87-92.
- PELICANO, E. R., SOUZA, P. A., SOUZA, H. B. A., FIGUEIREDO, D. F., BOIAGO, M. M., CARVALHO, S. R. y BORDON, V. F. 2005. Intestinal mucosa development in broiler chickens fed natural growth promoters. Brazilian J. Poult. Sci., 7, 221-229.
- PEÑUELAS, J., Y SARDANS, J. 2022. The global nitrogen-phosphorus imbalance. Science, 375(6578), 266-267.
- PETROVSKA Y CEKOVSKA, 2010. Extracts from the history and medical properties of garlic. Pharmacognosy reviews, 4(7), 106.
- PETTIPHER, G. L. y LATHAM, M. J. 1979. Characteristics of enzymes produced by *Ruminococcus flavefaciens* which degrade plant cell walls. Microbiology, 110, 21-27.
- PIRGOZLIEV, V., ROSE, S. P. y IVANOVA, S. 2019. Feed additives in poultry nutrition. Bulgarian J. Agric. Sci., 25, 8-11.

- POP, L. M., VARGA, E., COROIAN, M., NEDISAN, M. E., MIRCEAN, V., DUMITRACHE, M. O., FARCZADI, L., FULOP, I., CROITORU, M. D., FAZAKAS, M., y col. 2019. Efficacy of a commercial herbal formula in chicken experimental coccidiosis. *Parasit Vectors*, 12, 343.
- POURALI, M., KERMANSHAHI, H., GOLIAN, A., RAZMI, G. y SOUKHTANLOO, M. 2014. Antioxidant and anticoccidial effects of garlic powder and sulfur amino acids on *Eimeria*-infected and uninfected broiler chickens. *Iranian J. Vet. Res.*, 15, 227-232.
- PUTNIK, P., GABRIC, D., ROOHINEJAD, S., BARBA, F. J., GRANATO, D., MALLIKARJUNAN, K., LORENZO, J. M. y BURSAC KOVACEVIC, D. 2019. An overview of organosulfur compounds from *Allium* spp.: From processing and preservation to evaluation of their bioavailability, antimicrobial, and anti-inflammatory properties. *Food Chem*, 276, 680-691.
- PUVAČA, N., STANAČEV, V., GLAMOČIĆ, D., LEVIĆ, J., PERIĆ, L., STANAČEV, V. y MILIĆ, D. 2013. Beneficial effects of phyto additives in broiler nutrition. *World's Poult. Sci. J.*, 69, 27-34.
- RANDLE, W. M., Y LANCASTER, J. E. 2002. 14 sulphur compounds in *Alliums* in relation to flavour quality. *Allium Crop Sci.*, 329.
- REID, W. M. y JOHNSON, J. 1970. Pathogenicity of *Eimeria acervulina* in light and heavy coccidial infections. *Avian Diseases*, 14, 166-171.
- REQUENA, T., SOLO DE ZALDÍVAR, B., PELÁEZ, C. y MARTÍNEZ-CUESTA, M. C. 2022. Chapter 4 - Dietary influence on human microbiome. In: GOEL, G., REQUENA, T. & BANSAL, S. (eds.) *Human-Gut Microbiome*. Academic Press.
- RINGENIER, M., CAEKEBEKE, N., DE MEYER, F., VAN LIMBERGEN, T., EECKHAUT, V., DUCATELLE, R., VAN IMMERSEEL, F. y DEWULF, J. 2021. A field study on correlations between macroscopic gut health scoring, histological measurements and performance parameters in broilers. *Avian Pathol.*, 50, 500-506.
- RITZI, M. M., ABDELRAHMAN, W., MOHNL, M. y DALLOUL, R. A. 2014. Effects of probiotics and application methods on performance and response of broiler chickens to an *Eimeria* challenge. *Poult Sci*, 93, 2772-8.
- ROUGER, A., TRESSE, O. y ZAGOREC, M. 2017. Bacterial contaminants of poultry meat: sources, species, and dynamics. *Microorganisms*, 5.
- RUIZ, R., GARCIA, M. P., LARA, A. y RUBIO, L. A. 2010. Garlic derivatives (PTS and PTS-O) differently affect the ecology of swine faecal microbiota in vitro. *Vet Microbiol*, 144, 110-7.
- SABURI, W., YAMAMOTO, T., TAGUCHI, H., HAMADA, S. y MATSUI, H. 2010. Practical preparation of epilactose produced with cellobiose 2-epimerase from *Ruminococcus albus* NE1. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 74, 1736-1737.
- SIDIROPOULOU, E., SKOUFOS, I., MARUGAN-HERNANDEZ, V., GIANNENAS, I., BONOS, E., AGUIAR-MARTINS, K., LAZARI, D., BLAKE, D. P. y TZORA, A. 2020. In vitro anticoccidial study of oregano and garlic essential oils and effects on growth

- performance, fecal oocyst output, and intestinal microbiota *In vivo*. *Front Vet Sci*, 7, 420.
- SMULIKOWSKA, S., CZERWIŃSKI, J., MIECZKOWSKA, A. y JANKOWIAK, J. 2009. The effect of fat-coated organic acid salts and a feed enzyme on growth performance, nutrient utilization, microflora activity, and morphology of the small intestine in broiler chickens. *J. Anim. Feed Sci.*, 18, 478–489.
- SOMANI, S. J., MODI, K. P., MAJUMDAR, A. S. y SADARANI, B. N. 2015. Phytochemicals and their potential usefulness in inflammatory bowel disease. *Phytother Res*, 29, 339-50.
- SORLOZANO-PUERTO, A., ALBERTUZ-CRESPO, M., LOPEZ-MACHADO, I., ARIZA-ROMERO, J. J., BANOS-ARJONA, A., EXPOSITO-RUIZ, M. y GUTIERREZ-FERNANDEZ, J. 2018. In vitro antibacterial activity of Propyl-propane-thiosulfinate and propyl-propane-thiosulfonate derived from *Allium* spp. against gram-negative and gram-positive multidrug-resistant bacteria isolated from human samples. *Biomed Res Int*, 2018, 7861207.
- STANLEY, D., GEIER, M. S., DENMAN, S. E., HARING, V. R., CROWLEY, T. M., HUGHES, R. J., y MOORE, R. J. 2013. Identification of chicken intestinal microbiota correlated with the efficiency of energy extraction from feed. *Vet. Microbiol.*, 164(1-2), 85-92.
- STEFANELLO, C., ROSA, D. P., DALMORO, Y. K., SEGATTO, A. L., VIEIRA, M. S., MORAES, M. L. y SANTIN, E. 2019. Protected blend of organic acids and essential oils improves growth performance, nutrient digestibility, and intestinal health of broiler chickens undergoing an intestinal challenge. *Front Vet Sci*, 6, 491.
- STERN, N. J., CLAVERO, M. R., BAILEY, J. S., COX, N. A. y ROBACH, M. C. 1995. *Campylobacter* spp. in broilers on the farm and after transport. *Poult Sci*, 74, 937-41.
- SUBRAMANIAN, M. S., NANDAGOPAL MS, G., AMIN NORDIN, S., THILAKAVATHY, K. y JOSEPH, N. 2020. Prevailing knowledge on the bioavailability and biological activities of sulphur compounds from *Alliums*: A potential drug candidate. *Molecules*, 25.
- SWINKELS, W. J. C., POST, J., CORNELISSEN, J. B., ENGEL, B., BOERSMA, W. J. A., y REBEL, J. M. J. 2007. Immune responses to an *Eimeria acervulina* infection in different broilers lines. *Veterinary immunology and immunopathology*, 117(1-2), 26-34.
- TEWARI, A. K. y MAHARANA, B. R. 2011. Control of poultry coccidiosis: changing trends. *J Parasit Dis*, 35, 10-7.
- TSAO, S. M. y YIN, M. C. 2001. In-vitro antimicrobial activity of four diallyl sulphides occurring naturally in garlic and Chinese leek oils. *J Med Microbiol*, 50, 646-649.
- TUDU, C. K., DUTTA, T., GHORAI, M., BISWAS, P., SAMANTA, D., OLEKSAK, P., JHA NK., KUMAR M., RADHA, PROCKOW J, PEREZ DE LA LASTRA JM., DEY, A. 2022. Traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology of garlic (*Allium sativum*), a storehouse of diverse phytochemicals: A review of research from the last decade focusing on health and nutritional implications. *Frontiers in Nutrition*, 9, 929554. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.929554>

- TYZZER, E. E. 1929. Coccidiosis in gallinaceous birds. American Journal of Hygiene vol. 10, no. 2, 269-383.
- TYZZER, E. E., THEILER, H., y JONES, E. E. 1932. Coccidiosis in gallinaceous birds: II. A comparative study of species of *Eimeria* of the chicken. American J. Epidemiol., 15(2), 319-393.
- U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE. 2019. Food data central, Garlic raw <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/169230/nutrients>
- ULLAH, Z., AHMED, G., NISA, M. U. y SARWAR, M. 2016. Standardized ileal amino acid digestibility of commonly used feed ingredients in growing broilers. Asian-Australas J Anim Sci, 29, 1322-30.
- UR RAHMAN, S., KHAN, S., CHAND, N., SADIQUE, U. y KHAN, R. U. 2017. *In vivo* effects of *Allium cepa* L. on the selected gut microflora and intestinal histomorphology in broiler. Acta Histochem, 119, 446-450.
- VAN DER WIELEN P. 2002 Dietary strategies to influence the gastrointestinal microflora of young animals and its potential to improve intestinal health. In: Nutrition and health of the gastrointestinal tract, M.C. Blok, H.A. Vahl, L. de Lange, A.E. van de Braak, G. Hemke, and M. Hessing (eds.). Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands, pp. 37–60.
- VEZZA, T., GARRIDO-MESA, J., DIEZ-ECHAVE, P., HIDALGO-GARCÍA, L., RUIZ-MALAGÓN, A. J., GARCÍA, F., SÁNCHEZ, M., TORAL, M., ROMERO, M., DUARTE, J., y col. 2021. *Allium*-derived compound Propyl propane thiosulfonate (PTSO) attenuates metabolic alterations in mice fed a high-fat diet through its anti-inflammatory and prebiotic properties. Nutrients, 13.
- WANG, H.-T., YU, C., HSIEH, Y.-H., CHEN, S.-W., CHEN, B.-J. y CHEN, C.-Y. 2011. Effects of albusin B (a bacteriocin) of *Ruminococcus albus* 7 expressed by yeast on growth performance and intestinal absorption of broiler chickens—its potential role as an alternative to feed antibiotics. J. Sci Food and Agriculture, 91, 2338-2343.
- WANG, L., GUO, W., HAQ, S. U., GUO, Z., CUI, D., YANG, F., CHENG, F., WEI, X. y LV, J. 2021. Anticoccidial activity of Qinghao powder against *Eimeria tenella* in broiler chickens. *Front. Vet. Sci.*, 8.
- WAQAS, M., AKHTAR, R., AKBAR, H., LATEEF, M., RASHID, I. y IJAZ, M. 2018. Evaluation of anti-Coccidial activity of different extraction products of *Allium sativum* (Garlic) in broilers. J. Hellenic Vet. Med. Soc., 69, 1055-1058.
- WEI, X., TAO, J., XIAO, S., JIANG, S., SHANG, E., ZHU, Z., QIAN, D. y DUAN, J. 2018. Xiexin Tang improves the symptom of type 2 diabetic rats by modulation of the gut microbiota. Scientific Reports, 8, 3685.
- WILLIAMS, R. B. 2005. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. Avian Pathol, 34, 159-80.
- WINDISCH, W., SCHEDLE, K., PLITZNER, C. y KROISMAYR, A. 2008. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. J Anim Sci, 86, E140-8.

- WINK, M. 2004. Phytochemical Diversity of Secondary Metabolites., Encyclopedia of plant and crop science.
- WU, S. Q., WANG, M., LIU, Q., ZHU, Y. J., SUO, X. y JIANG, J. S. 2004. Construction of DNA vaccines and their induced protective immunity against experimental *Eimeria tenella* infection. Parasitol Res, 94, 332-6.
- WU, W., XIAO, Z., AN, W., DONG, Y. y ZHANG, B. 2018. Dietary sodium butyrate improves intestinal development and function by modulating the microbial community in broilers. PLOS ONE, 13, e0197762.
- YUN, C. H., LILLEHOJ, H. S. y LILLEHOJ, E. P. 2000. Intestinal immune responses to coccidiosis. Developmental & Comparative Immunology, 24, 303-324.
- YUÑO, M. M., y GOGORZA, L. M. 2008. Coccidiosis aviar: respuesta inmune y mecanismos de control en la industria avícola. Revista veterinaria, 19(1), 61-66.
- ZHANG, Q., ZHANG, S., WU, S., MADSEN, M. H. y SHI, S. 2022. Supplementing the early diet of broilers with soy protein concentrate can improve intestinal development and enhance short-chain fatty acid-producing microbes and short-chain fatty acids, especially butyric acid. J. Anim. Sci. Biotech., 13, 97.

11.ANEXOS

PCR y secuenciación Sanger del inóculo de *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella*, facultad de Química de la UAQ.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

22 de agosto, 2019

DR. LUIS MIGUEL GÓMEZ
DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN
E INNOVACIÓN EN ADITIVOS E
INGREDIENTES FUNCIONALES

Estimado Dr. Gómez

A través de la presente hago de su conocimiento los resultados del análisis molecular para la identificación de *Eimeria* spp. Las muestras (cepas aisladas) fueron sometidas a proceso de extracción de ADN, amplificación del gen *18S rRNA* con un ensayo de PCR y secuenciación con la metodología Sanger. Las cinco muestras sometidas pertenecen al género *Eimeria* y a continuación se detalla la identificación de la especie.

Muestra ID	Resultado de la identificación molecular	Homología (% ID)*	Vínculo
<i>Eimeria acervulina</i>	<i>Eimeria acervulina</i>	99.65%	@
<i>Eimeria mivati</i>	<i>Eimeria acervulina</i>	100.00%	@
<i>Eimeria tenella</i>	<i>Eimeria tenella</i>	100.00%	@
<i>Eimeria praecox</i>	<i>Eimeria praecox</i>	99.27%	@
<i>Eimeria maxima</i>	<i>Eimeria maxima</i>	100.00%	@

*% de identidad

Sin más por el momento me despido de usted. No dude en contactarme si tiene preguntas o comentarios.

Atentamente

Gerardo M. Nava, Ph.D., D.V.M., M.S.
Universidad Autónoma de Querétaro
Departamento de Investigación y Postgrado en Alimentos
Tels: (442) 192-1307 y 192-1304, ext. 5595

C.U. Cerro de las Campanas S/N Santiago de Querétaro, Gro. México. A.P., 184 C.P: 76010
Tels. 01 (442) 192 13 04 y 192 13 07

Titulación, diferenciación y nivel de esporulación del inóculo analizado en la FMVZ de la UNAM.



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MEDICINA Y ZOOTECNIA DE AVES



FAM-DMZA-MV-011/R:3

Cd. Universitaria, CDMX. a 12 De 02 de 2020.

No. de Caso: 20 - 027 Identificado por Ud.: PTO1 Coccidia

Propietario (a): Jesús Gael Ocampo Sánchez
Remitente: Jesús Gael Ocampo Sánchez
Con relación a los estudios solicitados a este Departamento el día: 10/02/2020
A partir de las siguientes muestras: Inoculo de coccidia
ESPECIE: N/A ESTIRPE O NOMBRE COMÚN: N/A EDAD: N/A
Nos permitimos informarle los siguientes resultados:

TITULACIÓN DE VACUNA DE COCCIDIA:

Título: 175,000/ml

95% Esporulación

55% *E. acervulina*

40% *E. tenella*

5% *E. máxima*

**ESTA CONSTANCIA SÓLO AMPARA LAS MUESTRAS SOMETIDAS A PRUEBAS Y/O ANÁLISIS.
Prohibida la reproducción parcial o total de este documento sin la autorización por escrito del
Responsable de Diagnóstico o Jefe del DMZA.**

ATENTAMENTE

**Dr. Reynaldo Moreno Díaz.
Responsable de Diagnóstico.**

Av. Universidad 3000, Col. UNAM, C.U., Del. Coyoacán, Cd. Mx., CP 04510.
Tels.: 01(55) 5616 6923 y 5620 5867, ext.: 219,5622 5868, ext.:202, correo electrónico: aves.fmz.unam@gmail.com

1/1

FAM-DMZA-MV-011/R:3