



**Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable**

**Evaluación de las SH extraídas de una lombricomposta para reducir infecciones por *Eimeria acervulina***

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

**Maestro en Salud y Producción Animal Sustentable**

Presenta

**MVZ. Eugenio Ruíz Marín**

Dirigida por:

**Dr. Sergio Gómez Rosales**

Santiago de Querétaro, Qro. 18 de febrero de 2022



**Universidad Autónoma de Querétaro**  
**Facultad de Ciencias Naturales**  
**Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable**

**Evaluación de las SH extraídas de una lombricomposta para  
reducir infecciones por *Eimeria acervulina***

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestro en Salud y Producción Animal Sustentable

**Presenta**

MVZ. Eugenio Ruíz Marín

**Dirigida por**

Dr. Sergio Gómez Rosales

Asesores

Dr. Sergio Gómez Rosales  
Presidente

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez  
Secretario

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón  
Vocal

Dr. José Guadalupe Gómez Soto  
Asesor

Dra. Araceli Aguilera Barreyro  
Asesor

Centro Universitario, Santiago de Querétaro, Qro.

Fechas de aprobación por consejo universitario, diciembre de 2021

## Resumen

La coccidiosis aviar es una enfermedad parasitaria entérica que afecta a pollos en su crecimiento y sistema inmunitario ocasionando pérdidas de más de 3 mil millones de dólares anuales. Existen diferentes medidas de control y prevención contra *Eimeria* spp. Sin embargo, estas medidas no son eficaces al cien por ciento debido a la resistencia que estos parásitos desarrollan y la elevada mortalidad causada por un debilitamiento en el sistema inmunitario de las aves. Por lo que nuevas estrategias eficaces y menos dañinas deben desarrollarse para disminuir la coccidiosis en aves. Las Sustancias Húmicas (SH) son posibles candidatas para tratamiento contra la coccidiosis. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del extracto de SH sobre la esporulación de oocistos de *E. acervulina*. en un experimento *in vitro* y *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella* y *E. necatrix* en un experimento *in vivo*. Primeramente, se desarrolló un sistema *in vitro* para favorecer la esporulación de oocistos, en donde se realizaron una serie de experimentos, para tener las condiciones adecuadas del sistema de incubación de oocistos, manteniendo los oocistos de 48 a 72 horas, incubándose a una temperatura de 25-29°C y 80% de humedad. Posteriormente, se evaluó el efecto de dos dosis de extracto de ácido húmico (AH) sobre la inhibición de la esporulación de *E. acervulina*, por duplicado en dos bloques, para comparar los niveles de inhibición. Los tratamientos a evaluar fueron: A. control negativo, oocistos no esporulados ( $1 \times 10^6$ ) + 5 ml de agua destilada; B. control positivo, oocistos no esporulados ( $1 \times 10^6$ ) + 5 ml de dicromato de potasio, C. tratamiento inhibidor, oocistos no esporulados ( $1 \times 10^6$ ) + 5 ml de formalina al 10%, D. oocistos no esporulados ( $1 \times 10^6$ ) + dosis de 1.25 mg de AH/ml + 5 ml de dicromato de potasio, E. oocistos no esporulados ( $1 \times 10^6$ ) + dosis 0.6 mg de AH/ml + 5 ml de dicromato de potasio. Los conteos de oocistos se hicieron por triplicado a las 6, 12, 24 y 48 h al microscopio con hemocitómetro. El experimento *in vivo* tuvo como objetivo evaluar la suplementación de 0.5% de extracto de SH en las dietas de las aves previamente inoculadas con una vacuna atenuada de *Eimeria* spp. para medición de los parámetros de crecimiento y conteo de oocistos / g de heces. Los tratamientos a evaluar en este experimento fueron A. Dieta con coccidiostato comercial. B. Dieta libre de coccidiostato (control). C. Dieta con 0.05% de SH. Los resultados de porcentaje de

esporulación fueron transformados a arcoseno y analizados por un ANOVA en bloques al azar en el programa SPSS para saber si hubo diferencia entre tratamientos. Los resultados de los conteos de oocistos / g de heces y parámetros productivos se trabajó con un modelo lineal general, con ANOVA univariado. En conclusión, se obtuvo el sistema *in vitro* para evaluar el porcentaje de esporulación de coccidias; sin embargo las dos dosis (1.25 y 0.6mg) de extractos de AH no inhibieron la esporulación de *E. acervulina* ( $P \geq 0.05$ ). De igual forma la adición de 0.5% de SH en la dieta de las aves tampoco mostró diferencias significativas comparadas con el resto de los grupos ( $P \geq 0.05$ ).

Palabras clave: *Eimeria acervulina*, *Eimeria* spp, extracto de sustancias húmicas, aves.

## Abstract

Avian coccidiosis is an enteric parasitic disease that affects the growth and immune system of chickens causing annually losses of more than 3 billion dollars. There are different control and prevention measures against *Eimeria* spp. However, these measures are not one hundred percent effective due to the resistance developed by these parasites and the high mortality caused by weakening of the bird's immune system. Therefore, new effective and less harmful strategies must be developed to reduce coccidiosis in birds. Humic substances (HS) are possible candidates for the treatment against coccidiosis. The objective of this research was to evaluate the effect of humic substances (HS) extract on the sporulation of *E. acervulina* oocysts. in an *in vitro* experiment and *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella* and *E. necatrix* in an *in vivo* experiment. First, an *in vitro* system was developed to promote oocyst sporulation, where a series of experiments was carried out, in order to have the adequate conditions of the oocyst incubation system, maintaining the oocysts for 48 to 72 hours, incubating at a temperature of 25-29°C and 80% humidity. Subsequently, the effect of two doses of HA extract on the inhibition of *E. acervulina* sporulation was evaluated, in duplicate in two blocks, to compare the levels of inhibition. The treatments evaluated were: A. negative control, non-sporulated oocysts ( $1 \times 10^6$ ) + 5 ml of distilled water; B. positive control, non-sporulated oocysts ( $1 \times 10^6$ ) + 5 ml of potassium dichromate, C. inhibitor treatment, non-sporulated oocysts ( $1 \times 10^6$ ) + 5 ml of 10% formalin, D. non-sporulated oocysts ( $1 \times 10^6$ ) + dose of 1.25 mg of HA / ml + 5 ml of potassium dichromate, E. non-sporulated oocysts ( $1 \times 10^6$ ) + dose of 0.6 mg of HA / ml + 5 ml of potassium dichromate. Oocyst counts were made in triplicate at 6, 12, 24 and 48 h under a hemocytometer microscope. The objective of the *in vivo* experiment was to evaluate the supplementation of 0.5% HS extract in the diets of the birds previously inoculated with an attenuated *Eimeria* spp vaccine. for measurement of growth parameters and oocyst count / g of excreta. The treatments evaluated were: A. Diet with commercial coccidiostat. B. Free coccidiostat diet (control). C. Diet with 0.05% HS. The results of the percentage of sporulation were transformed to arcsen and analyzed by an ANOVA in random blocks in the SPSS program to know if there was a difference between treatments. The results of the counts of oocysts / g of excreta and productive parameters

were worked with a general linear model, with univariate ANOVA. In conclusion, the in vitro system was obtained to evaluate the percentage of coccidia sporulation; however, the two doses (1.25 and 0.6mg) of HA extract did not inhibit the sporulation of *E. acervulina* ( $P \geq 0.05$ ). In the same way, the addition of 0.5% of HS in the diet of the birds also showed significant differences with the rest of the groups ( $P \geq 0.05$ ).

Key words: *Eimeria acervulina*, *Eimeria* spp, humic substances extract, birds.

## **Dedicatoria**

A mi familia: Desde mi abuelita Virginia y mi abuelito Emilio, porque sé que en donde quiera que estén, estarán compartiendo mis logros y alegrías. A mi mamá Virginia y a mis tías María Elena, Adriana y Ana María Ruíz porque siempre me apoyaron y me respaldaron incondicionalmente en las decisiones que tomé para llegar hasta aquí. Les estoy agradecido de todo corazón, tienen todo mi amor los que están y los que ya no están, gracias.

## **Agradecimientos**

Primero quiero agradecer a mi familia por estar conmigo siempre apoyándome en lo que fuera necesario de manera incondicional.

Agradezco enormemente por ser parte de mi crecimiento académico y profesional, por el tiempo, consejos y apoyo brindado por los integrantes de mi comité tutorial: Dr. Sergio Gómez Rosales, Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez, Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón, Dr. José Guadalupe Gómez Soto, Dra. Araceli Aguilera Barreyro. Y, al técnico del laboratorio de Nutrición Animal perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, ubicadas en Ajuchitlán, Querétaro. José Julián Gabriel Martínez.

Finalmente, por el apoyo económico brindado a: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

## Índice

Resumen.....	i
Abstract.....	iii
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos.....	vi
Índice.....	vii
Índice de cuadros.....	x
I. Introducción.....	1
II. Antecedentes.....	3
2.1. Situación de la avicultura nacional y mundial.....	3
2.1.1 Crecimiento de la avicultura.....	3
2.1.2 Producción nacional.....	5
2.1.3 Consumo.....	5
2.2 Promotores de crecimiento.....	6
2.3. Anticoccidianos.....	7
2.3.1 Efectos adversos de ionóforos.....	9
2.4. La coccidiosis en la avicultura.....	10
2.4.1 Ciclo biológico de <i>Eimeria</i> y transmisión.....	12
2.4.1.1 Ciclo biológico.....	12
2.4.1.2 Vectores.....	14
2.4.2 Oocistos y sus características.....	14
2.5 Sustancias húmicas.....	15
2.5.1 Generalidades de las sustancias húmicas.....	15
2.5.1.2 SH(humus) de lombricomposta.....	16
2.5.2 Las SHcomo antiinflamatorios y antibacterianos.....	16
2.5.3 Las SHcomo antitumorales.....	17

2.5.4 Las SH como antiparasitarios .....	18
2.5.5 Las SH como antivirales .....	18
2.5.6 SH como promotores de crecimiento .....	19
2.6 Alternativas disponibles para prevenir y combatir la coccidiosis .....	20
2.6.1 Vacunas contra la coccidiosis .....	20
2.6.2 Bioseguridad y gestión .....	21
2.7 Alternativas disponibles para sustituir los coccidiostatos .....	21
2.7.1 Probióticos .....	21
2.7.2 Prebióticos .....	22
2.7.3 Aceites esenciales .....	23
2.7.4 Ácidos orgánicos .....	23
2.8 Estudios <i>in vitro</i> que inhiben la esporulación de <i>Eimeria</i> spp .....	24
III. Justificación .....	25
IV. Hipótesis .....	26
V. Objetivo general .....	27
5.1 Objetivos específicos .....	27
VI. Metodología .....	28
6.1 Lugar experimental .....	28
6.2 Obtención de sustancias húmicas .....	28
6.3 Obtención de oocistos .....	29
6.4 Experimentos <i>in vitro</i> .....	29
6.5 Experimentos <i>in vivo</i> .....	30
6.5.1 Desarrollo .....	30
6.5.2 Experimento 1. Inoculación controlada de <i>Eimeria</i> spp. ....	31
6.5.4 Análisis estadísticos .....	32
VII. Resultados .....	33
7.1 Experimentos <i>in vitro</i> . Análisis de varianza para la esporulación media de <i>Eimeria acervulina</i> por hora de conteo .....	33
7.1.1. Esporulacion media entre tratamientos .....	36
7.1.2. Análisis de varianza sobre la esporulación media entre bloques X hora X tratamiento. ....	38

7.2 Experimentos <i>in vivo</i> .....	41
7.2.1 Medición de parámetros productivos de pollos de engorda. Experimento 1	41
7.2.2 valores de excreción de oocistos / g de heces. Experimento 1 .....	42
7.2.3 Medición de los parámetros productivos. Experimento 2 .....	44
7.2.4 Valores de excreción de oocistos / g de heces. Experimento 2 .....	45
VIII. Discusión .....	47
IX. Conclusiones .....	53
IX. Referencias.....	54

## Índice de cuadros

Cuadro		Página
1	Principales coccidiostatos sintéticos.	8
2	Principales coccidiostatos ionóforos.	9
3	Tratamientos <i>in vivo</i> .	33
4	Efecto de la hora 6 post – incubación sobre la esporulación, no esporulación y porcentaje de la inhibición de oocistos de <i>Eimeria acervulina</i> .	34
5	Efecto de la hora 12 post – incubación sobre la esporulación, no esporulación y porcentaje de la inhibición de oocistos de <i>Eimeria acervulina</i> .	35
6	Efecto de la hora 24 post – incubación sobre la esporulación, no esporulación y porcentaje de la inhibición de oocistos de <i>Eimeria acervulina</i> .	36
7	Efecto de la hora 48 post – incubación sobre la esporulación, no esporulación y porcentaje de la inhibición de oocistos de <i>Eimeria acervulina</i> .	37
8	Esporulación media de oocistos de <i>Eimeria acervulina</i> de cada uno de los tratamientos a la hora 48 post-incubación con ácidos húmicos.	38
9	Medias de la no esporulación de oocistos de <i>Eimeria acervulina</i> de cada uno de los tratamientos a la hora 48 post-incubación con ácidos húmicos.	38
10	Medias del porcentaje de inhibición de esporulación de <i>Eimeria acervulina</i> de cada uno de los tratamientos a la hora 48 post-incubación con ácidos húmicos.	39
11	Comportamiento productivo en pollo de engorda de 5 a 22 días de edad.	43
12	Comportamiento productivo de 13 a 27 días de edad.	46

## Índice de figuras

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Producción y consumo aparente de huevo (UNA, 2020).	4
2	Producción y consumo aparente de carne de pollo (UNA, 2020).	4
3	Aporte de proteína por el sector pecuario (UNA, 2020).	6
4	Sitios de infección de <i>Eimeria</i> por especie.	11
5	Ciclo biológico de <i>Eimeria</i> spp.	13
6	Esporulación media a la hora 48.	40
7	Comparación de medias de oocistos de <i>Eimeria acervulina</i> sin esporular a la hora 48.	41
8	Comparación de medias del % Inhibición de la esporulación de oocistos de <i>Eimeria acervulina</i> a la hora 48.	41
9	Figura 9. Oocistos de <i>E. acervulina</i> , identificados en la muestra de SH a una dosis de 1.25mg de SH/ml. por microscopía con objetivo (40x).	42
10	Representación gráfica de las medias del comportamiento productivo en el experimento 1 <i>in vivo</i> .	43
11	Número de oocistos excretados a los 0, 6 y 9 días post-inoculación de vacuna Livacox-Q.	44
12	Número de oocistos excretados a los 12 y 15 días post-inoculación de vacuna Livacox-Q.	45
13	Representación gráfica de las medias del comportamiento productivo en el experimento 2 <i>in vivo</i> .	46
14	Número de oocistos excretados a los días 0, 5 y 8 post-inoculación.	47
15	Número de oocistos excretados a los días 11 y 14 post-inoculación y su promedio.	48

## I. Introducción

En la actualidad el crecimiento de la población humana se ha extendido a 7.6 mil millones de personas y según el Departamento de Asuntos Económicos y Sociales de Naciones Unidas (UN DESA, 2017), por sus siglas en inglés, se proyecta un crecimiento de la población a 9.8 mil millones para 2050. Esto es un impulso para la producción pecuaria, ya que se deberán cubrir las necesidades alimentarias de la población.

La industria avícola se ha reconocido mundialmente como el sector más dinámico en cuanto a producción de carne para consumo humano (Mottet & Tempio, 2017). El consumo per cápita mundial de la última década fue superior al registrado en consumo de carne de cerdo, res y pescado (FAO, 2018).

En México la producción de huevo y carne de pollo tiene un constante crecimiento, debido a la alta demanda gracias a los bajos costos (USDA, 2019). Seis de cada 10 personas los incluyen en la dieta, ya que es la proteína más accesible para las clases económicas bajas y medias, la carne de pollo tiene una participación del 38.4%, seguida del huevo con 17%, representando el 55.4% de consumo de proteína animal en el país (UNA, 2020). Durante la primera mitad del año 2020, la producción de carne de pollo creció 4% en relación al mismo periodo del año pasado según (SADER, 2020). Siendo el sector avícola una de las principales fuerzas impulsoras de la economía.

La coccidiosis aviar es una enfermedad parasitaria entérica que afecta a pollos en su crecimiento y sistema inmunitario ocasionando pérdidas de más de 3 mil millones de dólares anuales (Dalloul & Lillehoj, 2006; Blake & Tomley, 2014). Esta enfermedad es causada por protozoos de la familia *Eimeridae* del filo apicomplexa (Blake, 2015).

Existen siete especies de *Eimeria* que son reconocidas como infectantes de pollo (*Eimeria acervulina*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria máxima*, *Eimeria mitis*, *Eimeria necatrix*, *Eimeria praecox* y *Eimeria tenella*), cada una genera enfermedad, pero los signos clínicos y la patogenicidad van a variar según la especie infectante, incluso diferentes especies pueden presentarse al mismo tiempo ya que son ubicuas (Williams, 1999). Sin embargo, dependiendo el género de *Eimeria*, causará lesiones en distintos segmentos del intestino (Morris *et al.*, 2007). Las especies de *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella* son

reconocidas económicamente como las más significantes debido a su alta prevalencia y mortalidad (Thenmozhi *et al.*, 2014). Además, pueden existir coinfecciones de especies de *Eimeria* spp. lo que incrementa la patogenicidad y confusión en los diagnósticos (Jenkins *et al.*, 2008).

Diferentes medidas de control y prevención contra *Eimeria* spp se han desarrollado como medicamentos anticoccidiales, vacunas y buenas prácticas de manejo (Godwin & Morgan, 2015). Sin embargo, ninguna de estas medidas resulta cien por ciento segura debido a la resistencia que estos medicamentos pueden generar en el parásito o una elevada mortalidad causada por un debilitamiento en el sistema inmunitario de las aves generado por las vacunas y las cepas de campo (Quiroz - Castañeda & Dantán - Gonzales, 2015).

Es por esto que se ha estimulado el interés en el desarrollo de estrategias más efectivas y menos dañinas para las aves contra la coccidiosis. El presente trabajo evaluó la acción de un extracto de SH *jjin vitro* como posible inhibidor de la esporulación de los oocistos de *Eimeria* spp.

## **II. Antecedentes**

### **2.1. Situación de la avicultura nacional y mundial**

#### **2.1.1 Crecimiento de la avicultura**

En la actualidad la industria avícola es reconocida como el sector más productivo y con el crecimiento más acelerado en el mercado mundial de producción de carne con destino a la alimentación humana. Según el departamento de Asuntos Económicos y Sociales de Naciones Unidas (UN DESA, 2017). El crecimiento de la población humana se ha extendido a 7.6 mil millones de personas y se proyecta un crecimiento de la población a 9.8 mil millones para 2050.

En México la producción de huevo y carne de pollo continúa teniendo un constante crecimiento (Figura 1 y 2) esto por la alta demanda gracias a los bajos costos. Por otro lado, Estados Unidos continúa siendo la principal fuente de importación de carne de pollo a México con 86% de participación en el mercado. En cambio, Brasil ha incrementado su participación en el mercado y aunque aún es pequeña con un 12.7%, está ha crecido un 77% desde 2016 con la exportación de productos congelados (USDA, 2019).

El crecimiento en producción nacional avícola para 2021 se estima que será hasta un 3.2% respecto a 2020, finalizando el año con una producción de 6.4 millones de toneladas de alimento (huevo, pollo y pavo) con un crecimiento del 3%, en la producción de huevo en 2020 cerrando con un aproximado de 2.9 millones de toneladas. Y un crecimiento en la producción de carne del 3.5% para 2021, cerrando la producción con un total de 3.5 millones de toneladas. Esto reflejó en 2020 a la avicultura mexicana a nivel mundial como el cuarto productor de huevo, detrás de China, Estados Unidos e India, y, el sexto productor de carne de pollo, detrás de Estados Unidos con una producción de 19.8 millones de toneladas, Brasil con 13.6 millones, China con 13.8 millones, India con 4.9 millones y Rusia con 5.1 millones de toneladas (UNA, 2020).



Figura 1. Producción y consumo aparente de huevo (UNA, 2020).



Figura 2. Producción y consumo aparente de carne de pollo (UNA, 2020).

La producción mundial de carne de ave está dominada por Estados Unidos, China, Brasil, México, Rusia e India. Esta demanda de carne creciente se relaciona con el incremento de la población mundial, el incremento del poder adquisitivo y el hecho de que la carne de pollo es más barata que otras carnes. Aunque la oferta de la carne en el mundo ha aumentado, aún existen factores que limitan el progreso de esta industria como son el manejo, control de enfermedades (nutricionales, enfermedades metabólicas y

parasitarias). En una industria que recauda aproximadamente 40 mil millones de pollos anualmente, la coccidiosis aviar representa una grave enfermedad que resulta en pérdidas económicas globales anuales de aproximadamente \$ 2.4 mil millones de dólares. Esta enfermedad es una causa importante de mortalidad, bajo rendimiento y pérdida de productividad (Quiroz-Castañeda & Dantán-González, 2015).

### **2.1.2 Producción nacional**

Las entidades del país con mayor producción de carne de pollo en 2020 fueron Veracruz, Aguascalientes, Querétaro, La Laguna (Coahuila y Durango), Jalisco, Puebla, Chiapas, Guanajuato y Yucatán y en conjunto representan el 53% de participación total en producción de carne de pollo (UNA, 2020).

En producción de huevo los estados de la república que mas producen son Jalisco, Puebla, Sonora, La Laguna, (Coahuila y Durango) Yucatán, Sinaloa y Guanajuato (UNA, 2020).

### **2.1.3 Consumo**

Seis de cada 10 personas incluyen en su dieta huevo y pollo en México, ya que es la proteína más accesible para las clases económicas bajas y medias. El huevo en México tiene el primer lugar mundial en consumo per – cápita de 23 kg, seguido de Rusia, Colombia, Argentina y Nueva Zelanda. La carne de pollo tiene una participación en el aporte de proteína del 38.9%, el huevo con 16.5%, representando el 55.4% de consumo de proteína animal en el país (UNA, 2020) (Figura 3).

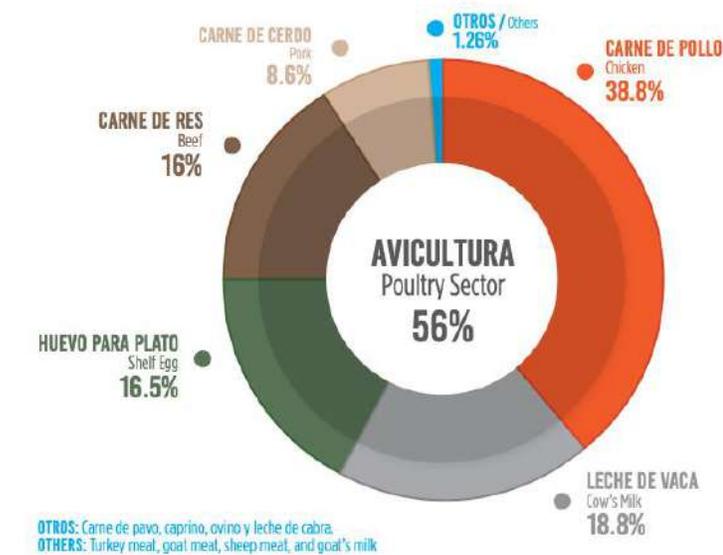


Figura 3. Aporte de proteína por el sector pecuario (UNA, 2020).

En México, el consumo per-cápita actual de pollo ha aumentado a los 32.88 kg por habitante. En cuanto a huevo fresco, México es el principal consumidor a nivel mundial, siendo el consumo per cápita del mexicano de 23 kg, en segundo lugar, se encuentra Rusia con 18.44 kg, seguido de Colombia con 16.38 kg y después Argentina con 15.56 kg (UNA, 2020).

## 2.2 Promotores de crecimiento

La práctica en el uso de promotores de crecimiento, se ha llevado a cabo aproximadamente durante 50 años en la producción animal en Estados Unidos y otros países (Dibner & Richards, 2005). Existen reportes de efectos benéficos en el uso de promotores de crecimiento en la eficiencia productiva en cerdos y pollos (Moore *et al.*, 1946). Starr & Reynolds (1951), publicaron los primeros reportes de resistencia a antibióticos en pavos.

El riesgo existente en consumir carne con residuos de antibióticos que puedan ocasionar alergias o intoxicaciones en humanos es muy bajo, ya que solo los antibióticos que no se absorben en tracto digestivo están autorizados como promotores de crecimiento (Donoghue, 2003).

En la actualidad los antibióticos son la principal herramienta terapéutica para tratar y prevenir enfermedades bacterianas en hombres y animales, y como promotores de crecimiento a nivel subterapéutico en animales, sin embargo, durante las últimas décadas el incremento del uso de estos fármacos y su mal uso han generado la emergencia de resistencia antimicrobiana la cual es un importante problema en la salud pública que afecta gran parte de los países del mundo (San Martín *et al.*, 2005).

La resistencia a los antibióticos se da por la capacidad natural de la bacteria con rasgos inusuales para sobrevivir, permitiendo así que las cepas resistentes se multipliquen, y también se da gracias a la transmisión de la resistencia adquirida a su progenie (Apata, 2009). Por lo que la creciente preocupación de que las bacterias resistentes pueden pasar de los animales a los humanos, se ha incrementado el interés público y gubernamental en la eliminación del uso inapropiado de antibióticos. La Organización Mundial de la Salud ha señalado que la resistencia antimicrobiana debe ser considerado como un problema internacional y que es conveniente poner en marcha un sistema global de vigilancia, recomendando que se fijen políticas gubernamentales orientadas al uso racional de estos medicamentos en medicina humana y veterinaria (OMS, 1997).

Es por esto por lo que el Parlamento Europeo y el consejo sobre aditivos para uso en nutrición animal crearon el reglamento 1831/2003 que permitía la comercialización y el uso de antibióticos y coccidiostatos como aditivos para piensos solo hasta el 31 de diciembre de 2005, permitiéndose únicamente el uso de medicinas en alimento para animales con fines terapéuticos por prescripción veterinaria (EUR-lex, 2003).

### **2.3. Anticoccidianos**

Los anticoccidianos son otras alternativas para el control de la coccidiosis. Se clasifican como compuestos de síntesis química (**anticoccidianos sintéticos**) quinolonas, diclazuril, zoalene, nicarbazina, entre otros. Estos actúan en las etapas intracelulares del parásito después de invadir las células intestinales (Williams, 1999) y con efecto coccidicida, disminuyendo lesiones intestinales en el huésped, pero pueden provocar efectos secundarios en pollos en ambientes calurosos (Yuño & Gogorza, 2008)

(Cuadro 1). El uso de drogas químicas debe estar limitado a dos meses a fin de reducir el riesgo de resistencia (Palacios, 2009). La otra clasificación son los compuestos por fermentación de *Streptomyces* spp. O *Actinomadura* spp. (**ionóforos**) los cuales poseen capacidad antibiótica en microorganismos gram positivos (Peek & Landman, 2011). En la actualidad son seis los que se utilizan en la producción avícola (Williams, 1999), se clasifican en **monovalentes**: (salinomicina, monensina, narasina), ya que se combinan con cationes monovalentes  $K^+$  y  $Na^+$ , en cambio los **divalentes** (lasalocid, maduramicina, semduramicina) se combinan con cationes bivalentes y monovalentes  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $K^+$  y  $Na^+$  (Cuadro 2). Estos compuestos ionóforos forman complejos que envuelven a los cationes sobre los que tienen tropismo, introduciendo dentro del coccidio en la fase de esporozoito (etapa parasitaria en la luz del intestino antes de penetrar la célula intestinal) sobre la que son activos, causando un desequilibrio, aumenta la presión osmótica con relación al medio interno, los cationes introducidos en la célula arrastran agua y causan ruptura y destrucción del parásito (Tovar, 1996). Smith *et al.* (1981), indican que estos ionóforos también dirigen sus efectos hacia las fases sexuales y no sexuales de los coccidios haciendo que el transporte de iones de sodio y potasio a través de las membranas superficiales fallen.

Gracias al mecanismo de acción tan amplio y complejo de los ionóforos, estos no inducen el mismo grado de presión selectiva (resistencia) sobre los parásitos, a diferencia de los anticoccidios químicos (Chapman *et al.*, 2010).

Cuadro1. Principales coccidiostatos sintéticos

Producto activo	Nombre comercial	Dosificación ppm	Modo de acción
Zoalene	Dot	125	Merozoítos de 1ª generación
Metilclorpidol	Coyden	125	Esporozoíto
Nicarbazina	Carbigran	125	Esquizontes de 2ª generación
Diclazuril	Clinacox	1	Esquizontes y Gametocitos

(Tovar, 1996).

Cuadro 2. Principales coccidiostatos ionóforos

Producto	Nombre comercial	Dosificación ppm	Modo de acción	Periodo de retiro
Lasalocid	Avatec	90	Ionóforos divalente	5 días
Monensina	Elancoban	100	Ionóforos monovalente	3 días
Narasina	Monteban	70	Ionóforos monovalente	5 días
Salinomicina	Sacox	60	Ionóforos monovalente	5 días
Maduramicina	Cygro	5	Ionóforos + químico	5 días
Semduramicina	Aviax			5 días

(Tovar, 1996).

La resistencia cruzada entre ionóforos de la misma clase se ha demostrado que existe por lo que es importante al momento de rotar escoger ionóforos diferentes. Para esto se usan los programas duales de anticoccidiales, que consisten en el uso durante los primeros 14 – 21 días de edad combinándolo con otra clase de anticoccidial del día 15 o 23 hasta el retiro del producto (Palacios, 2009).

Los tipos de programas duales son:

- ❖ Químico + ionóforos.
- ❖ Ionóforos + Químico.
- ❖ Químico A + Químico B.
- ❖ Ionóforos A + Ionóforos B

### 2.3.1 Efectos adversos de ionóforos

Los efectos adversos incluyen falta de coordinación, diarrea, reducción de consumo de alimento y pérdida de peso (Beck & Harries, 1979).

Cuando se usan a altas concentraciones de ionóforos la interferencia con el transporte de iones de la membrana puede afectar a las células huésped (Dowling, 1992). Van Vleet *et al.* (1983), propusieron que la toxicidad de las drogas en tejido miocárdial y músculo esquelético podría ser por un excesivo incremento de  $Ca^{++}$  intracelular lo cual

excede la capacidad de los componentes celulares como la mitocondria de secuestrar  $Ca^{++}$  de manera efectiva. El exceso de calcio genera unas series de alteraciones degradativas a la célula seguido de un daño a la membrana culminando con tumefacción de la célula huésped.

Por otro lado, Mc Dougald & Mc Quiston (1980) reportaron un crecimiento compensatorio después de la retirada de los medicamentos ionóforos con monensina y salinomicina, pero no un crecimiento compensatorio en comparación con las aves control que no recibieron tratamiento.

#### **2.4. La coccidiosis en la avicultura**

La coccidiosis aviar es una enfermedad parasitaria que se conoce desde hace muchos años y todavía es considerada la que mayores pérdidas económicas causa a nivel mundial de hasta \$ 3 mil millones de dólares por año, causada por protozoos de la Familia *Eimeridae*, Subclase Coccidia, Filo Apicomplexa del Género *Eimeria*, que se desarrollan en el interior del intestino de las aves y los animales. Existen siete especies de *Eimeria* (*E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. máxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* y *E. tenella*) que se reconocen como infectantes de pollos (Williams, 1999). Los niveles de lesión que causan estas especies de *Eimeria* en las diferentes áreas del intestino están relacionados con su nivel de patogenicidad (Morris *et al.*, 2007), los cuales pueden ir de leves a severas. En la figura 4 se muestran las distintas especies de *Eimeria* y los segmentos del intestino que infectan en pollos. *E. acervulina* y *E. praecox*, se desarrollan en el duodeno, *E. mitis*, *E. maxima* y *E. necatrix* se desarrollan en el intestino medio (yeyuno), *E. tenella* se desarrolla en los ciegos y *E. brunetti* que se desarrolla en el intestino posterior o (íleon) (Joyner, 1978). Dependiendo la especie y sitio de infección la coccidiosis puede causar enteritis con pérdida de líquidos y una mala absorción de nutrientes (*E. acervulina* y *E. mitis*), puede causar inflamación de la pared intestinal con hemorragias puntuales (petequias) y desprendimiento del epitelio (*Eimeria brunetti* y *E. maxima*), o destrucción completa de los cilios que concluye con hemorragia y muerte (*E. necatrix* y *E. tenella*) (Johnson y Reid, 1970).

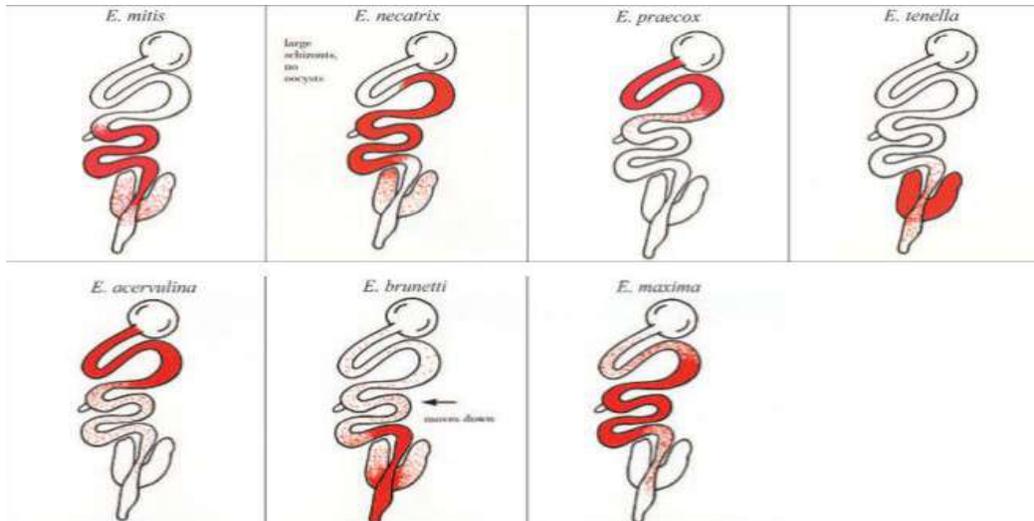


Figura 4. Sitios de infección de *Eimeria* por especie.

Esquema de las siete especies de *Eimeria* infectivas de pollos, en relación con el sitio de infección (Burrell *et al.*, 2020).

También suelen existir defectos óseos, principalmente asociados a trastornos en huesos largos o tibias y estos problemas están estrechamente relacionados con la rápida ganancia de peso corporal (Applegate & Lilburn, 2002). Esto repercute con el caminar de las aves y posteriormente mueren por deshidratación o falta de alimentación (Fleming, 2008). Las especies *Eimeria* invaden las células intestinales, en el caso de *E. acervulina*, el duodeno (Williams, 1999). Un estudio realizado por Van Der Klis *et al.* (1990), con el objetivo de reconocer el sitio de absorción de diferentes minerales entre ellos K, Ca, Mg, Na, arrojó como resultados que la mayor parte de absorción se realiza en el duodeno, más que en otras regiones de todo el tracto gastrointestinal, esto nos indica que la presencia de *E. acervulina* interfiere directamente con la absorción de estos minerales. Akbari *et al.* (2018) reportaron una disminución de minerales en tibia y sangre, en términos de cenizas y concentración de Ca, en un grupo de pollitos Ross 708 desafiados al día nueve con 1 ml de cultivo con 100,000 ooquistes esporulados de *E. acervulina* y 25,000 ooquistes esporulados de *E. maxima*.

Infecciones entéricas y problemas nutricionales aunados al estrés tendrán como consecuencia un pobre desarrollo óseo que llevará a problemas en la calcificación de

tibias, pollos incapaces de caminar conforme ganen peso y posteriormente la muerte (Rath *et al.*, 2000).

## **2.4.1 Ciclo biológico de *Eimeria* y transmisión**

### **2.4.1.1 Ciclo biológico**

Los ciclos de vida de *Eimeria* spp. consisten en dos etapas de desarrollo en el huésped: Una fase endógena que tiene lugar dentro del hospedador y comprende dos fases de reproducción, una asexual (esquizogonia) y una sexual (gametogonia) que dará formación del cigoto (ooquiste inmaduro) y una fase exógena que tiene lugar fuera del huésped y se lleva a cabo una multiplicación asexual por esporogonia (Blake & Tomley, 2014).

Durante la fase endógena los ooquistes esporulados son ingeridos por el hospedador, el dióxido de carbono y la acción mecánica de la molleja, producida por su musculatura y algunos restos de pienso o piedras logran alterar la estructura y permeabilidad de la pared del ooquiste y esto permite que la acción de las sales biliares y la tripsina liberen los esporocistos. Posteriormente los esporozoítos abandonan los esporocistos mediante su propio movimiento e invaden y destruyen las células de la mucosa intestinal (Jeurissen *et al.*, 1996). Dando inicio a su ciclo reproductivo asexual, la esquizogonia, en donde una vez que invaden a los enterocitos forman una vacuola y se transforman en trofozoítos, estos sufren divisiones nucleares, las cuales reciben el nombre de esquizogonia y se forman los esquizontes de primera generación, los cuales al madurar rompen la membrana celular del enterocito destruyéndolo y saliendo como merozoítos 72 horas post infección. Estos merozoítos invadirán otras enterocitos y sufrirán una segunda división nuclear formando a los esquizontes de segunda generación, los cuales al madurar romperán las membranas de la célula huésped y saldrán al medio como merozoítos de segunda generación e invadirán células epiteliales de las criptas de Lieberkühn, dando lugar al ciclo reproductivo sexual gametogonia. Aquí los merozoítos formarán dentro de los enterocitos los gametos masculinos microgamontes los cuales continuarán teniendo una división nuclear y madurarán a microgametos los cuales romperán la membrana celular y serán liberados. Por otro lado, otro grupo de merozoítos al invadir a las células

epiteliales de las criptas, formarán al gameto femenino macrogamonte el cual será único en la célula y al madurar cambiará a macrogameto. Los microgametos al invadir las células huésped infectadas con macrogametos, llevarán a cabo la fertilización del macrogameto y se formará el cigoto u ooquiste inmaduro (Ferguson *et al.*, 2003). Finalmente será liberado de la mucosa intestinal sin esporular junto con las heces (Lal *et al.*, 2009).

Durante la fase exógena se lleva a cabo una multiplicación asexual "esporogonia" que tiene lugar fuera del hospedador y se llevará a cabo cuando el ooquiste encuentra las condiciones adecuadas de temperatura, oxigenación y humedad. El esporoblasto se divide en dos y después en cuatro y es envuelto en una doble membrana para formar los esporocistos los cuales sufren una división nuclear para terminar este proceso de esporulación, el cual da como resultado ocho esporozoítos a partir de un ooquiste inicial mediante un proceso de meiosis (del Cacho Malo & Bosch, 2014) (Figura 5).

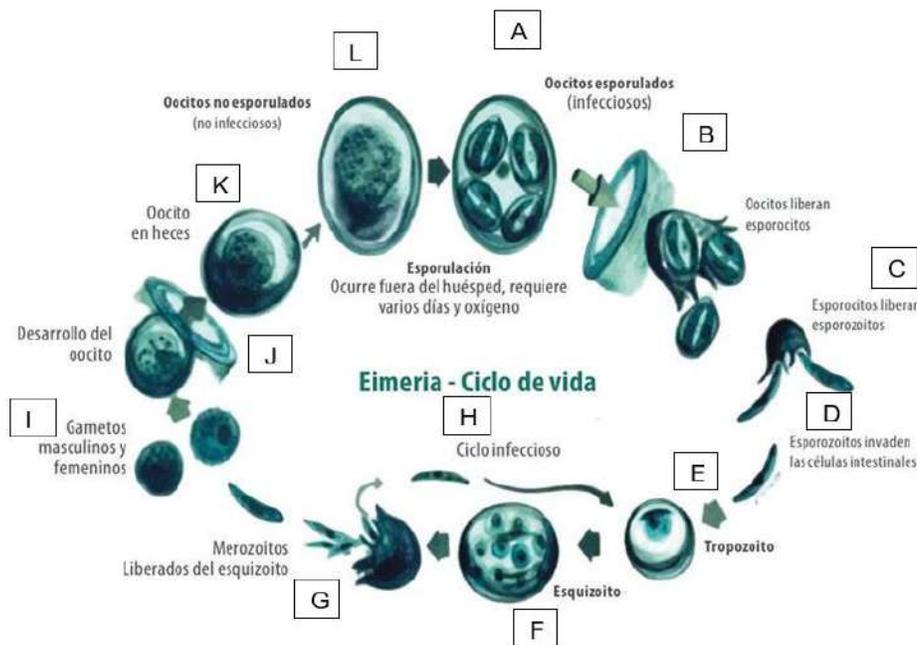


Figura 5. Ciclo biológico de *Eimeria* spp.

(Canales-Serrano, 2019)

(adaptado de <https://www.avicultura.mx/destacado/Recomendaciones-en-el-tratamiento-de-Coccidiosis-en-aves>)

**A.** Oocistos esporulados deben ser ingeridos ya que son las formas infectivas, **B.** Oocistos liberan esporocistos. **C.** Esporocistos liberan esporozoítos, **D.** Los esporozoítos invaden las células intestinales (enterocitos), **E.** Dentro del enterocito el esporozoíto madura a trofozoíto, **F.** Trofozoíto se encapsula en una vacuola (esquizonte de primera generación), **G.** El esquizonte revienta y libera miles de merozoítos, **H.** Merozoítos invadirán enterocitos, formarán esquizontes de 2.º generación y liberarán merozoítos de 2.º generación que invadirán nuevos enterocitos, **I.** Formación de gametos sexuales masculinos y femeninos de *Eimeria*, **J.** Invasión de enterocitos por gametos sexuales y formación de cigoto, **K.** Eliminación del cigoto en heces, **L.** Cambio de cigoto a oocisto no esporulado (fase no infectiva).

#### **2.4.1.2 Vectores**

Los oocistos de *Eimeria* spp son la principal causa de coccidiosis al ser ingeridos por los pollos, ya sea que se encuentren en su alimento o en el agua de bebida, así como basura o polvo contaminado (Shivaramaiah *et al.*, 2014). También estos oocistos pueden ser transportados de una caseta o granja a otra a través del personal, si es que estuvieron en contacto con material contaminado de oocistos, por otros animales o escarabajos (Belli *et al.*, 2006).

#### **2.4.2 Oocistos y sus características**

Los oocistos de *Eimeria* spp tienen una pared gruesa que resiste tratamientos mecánicos, químicos y degradación proteolítica, también son impermeables a las sustancias solubles en agua, incluidos muchos detergentes y desinfectantes, permitiendo que los oocistos sobrevivan y permanezcan infecciosos en un ambiente húmedo durante largos períodos de tiempo (Mai *et al.*, 2009). Esta pared está conformada por dos capas, una capa interna y una capa externa lo que se asocia al grosor de la pared y esta estructura de bicapa está compuesta de lípidos y proteínas, esta capa de proteínas le proporciona al oocisto protección contra el calor y frío extremo, mientras que la capa de lípidos brinda amortiguamiento contra daños químicos (Belli *et al.*, 2006).

Un ooquiste será infeccioso dependiendo de su capacidad para esporular, los ooquistes esporulados son infecciosos y los no esporulados no serán infecciosos (Lal *et al.*, 2009). Los ooquistes esporulan en 48 horas y los ooquistes de *E. acervulina* lo pueden hacer dentro de las 17 horas hasta con un porcentaje de entre el 85 y 95% si se mantienen las condiciones óptimas como temperatura de 29-30°C y humedad del 40-80% (Edgar, 1955; Reid & Long, 1979). Los ooquistes esporulados pueden sobrevivir fuera del huésped durante 602 días y los no esporulados hasta 7 meses en el ciego del hospedador (Quiroz-Castañeda & Dantán-González, 2015).

## 2.5 Sustancias húmicas

### 2.5.1 Generalidades de las sustancias húmicas

Las sustancias húmicas (**SH**) son estructuras supramoleculares de moléculas heterogéneas que comprenden carbohidratos, ácidos grasos, polipéptidos, anillos aromáticos unidos por interacciones hidrofóbicas como las fuerzas de Van der Waals y enlaces de hidrógeno (Mirza, 2018). Se forman a partir de la descomposición natural de materia orgánica, principalmente plantas, por lo tanto, las SH constituyen la mayor parte de la materia orgánica en el mundo porque representan la mayoría de los materiales orgánicos del suelo como (turba, lignitos, carbón aguas residuales y aguas naturales) (MacCarthy *et al.*, 1979). Las SH están compuestas por diferentes ácidos que contienen grupos carboxilo, fenolato, carbonilo, hidroxilo, amina y amida. Entre estos ácidos está el ácido húmico, ácido fúlvico y huminas. Los ácidos húmicos (**AH**) presentan un color oscuro y tienen un tamaño molecular menor que el de las huminas, es la fracción de SH soluble en agua con bajo pH alcalino, pero insoluble en un pH ácido, tienen un alto peso molecular de 50000 a 100000 Da (Mirza, 2018).

Los **ácidos fúlvicos (AF)** presentan un color anaranjado y tienen un tamaño molecular más pequeño que el de los AH con un peso molecular de 5000 a 10000 Da, son solubles en agua en todas las condiciones de pH (Mirza, 2018).

**Las huminas** son la fracción insoluble en agua a cualquier valor de pH y son moléculas grandes con un peso molecular de 100000 a 10000000 Da (Peña-Méndez *et al.*, 2005; Mirza, 2018).

Las SH se han utilizado durante siglos en la agricultura como un suplemento nutricional tanto del suelo como de las plantas, esto porque ayudan a romper suelos compactos, así como a mejorar sus propiedades físicas y su fertilidad estimulando el desarrollo de microflora en el mismo, mejorando la transferencia de micronutrientes desde el suelo hasta las plantas, mejoran la retención de agua y aumentan el promedio de germinación de semillas (Lotosh, 1991).

También se sabe que los AH y AF sirven como medio de transporte mediante absorción de metales pesados tóxicos como hierro, níquel, mercurio, cadmio y cobre, químicos orgánicos antropogénicos y otros contaminantes del agua para su eliminación, lo que las hace quelantes (Samanidou *et al.*, 1991). Por esto, se han desarrollado filtros a base de humus para purificar aguas residuales contaminadas (Verstraete & Devliegher, 1996).

#### **2.5.1.2 Sustancias húmicas (humus) de lombricomposta**

Las lombrices transforman los remanentes orgánicos en humus, esta es una sustancia generada en el proceso final de descomposición de la materia orgánica, tales como desechos vegetales o animales (Agrario, 1987). Es la mineralización de materia orgánica en complejos coloidales, la cual se lleva a cabo en el primer segmento del intestino y después se lleva a cabo la humificación por acción de la microbiota en la parte posterior del intestino de la lombriz, generando una materia granulosa, inodora, color café oscuro "**humus**" (Ríos & Calle, 1991).

El proceso de degradación de la materia orgánica generado por la lombriz para la formación del humus es acelerado en comparación con el proceso de descomposición natural, y esto dependerá de la composición química del sustrato, la relación C/N y el contenido de minerales tales como N, P, S, Ca, Mg y K de la materia orgánica (Ruiz, 2011).

#### **2.5.2 Las sustancias húmicas como antiinflamatorios y antibacterianos**

Productos derivados de SH han sido utilizados contra enfermedades inflamatorias, principalmente en ratas con úlceras gástricas donde se observó significativamente su curación (Brzozowski *et al.*, 1994). La inflamación tiene un papel importante durante las infecciones virales y bacterianas (Nakayama *et al.*, 1993) Por lo que el control efectivo de la inflamación podría ser empleado para proteger a individuos predispuestos a estos patógenos. Pflug & Ziechman (1982), demostraron que la bacteria *Micrococcus luteus* tenía interacciones altamente específicas con los AH por lo que el organismo quedaba protegido contra la alteración de la pared celular por la enzima lisozima.

van Rensburg *et al.* (2001), trabajaron con distintos grupos de ratones, 10 ratones por grupo, los cuales presentaban inflamación en la oreja derecha. Las orejas inflamadas de los ratones en cada grupo fueron tratadas tópicamente 4 veces al día durante 2 días con uno de los siguientes tratamientos: 1. Cremas acuosas de ácido oxifúlvico (4.5% y 9%). 2. Diclofene sódico al 1% (Voltaren Emulgel). 3. Betametasona 0.1% (Betnovate). 4. Ungüento emulsionante BP como control. Los cuatro tratamientos disminuyeron la inflamación del oído, pero solo los tratamientos con Diclofene sódico al 1% y la crema acuosa de ácido oxifúlvico al 9% demostraron ser mejores que los demás tratamientos, sin embargo, los ratones en el grupo de tratamiento con diclofene sódico mostró graves signos de estrés, apatía y pérdida de apetito. Estas propiedades antiinflamatorias, junto con sus propiedades antimicrobianas, sugieren que el ácido oxifúlvico, aplicado tópicamente, podría ser un tratamiento efectivo y seguro para afecciones inflamatorias de la piel.

### **2.5.3 Las sustancias húmicas como antitumorales**

El potencial de las SH contra el tumor apenas ha sido investigado. Dicha actividad antitumoral, se estudió en experimento *in vivo* del extracto de humus contra leucemia linfocítica en ratones endogámicos. Los ratones tuvieron un crecimiento tumoral lento significativo, por lo que la masa tumoral media fue significativamente menor en comparación con el grupo control, lo que indica que los ratones a los que se les administró

el extracto pueden sobrevivir por un período más largo. Aunque, el mecanismo por el cual el extracto de humus suprime el crecimiento tumoral no está claro en la actualidad, la actividad antitumoral puede implicar una mejora de la resistencia innata del huésped (Kodama, 2007).

#### **2.5.4 Las sustancias húmicas como antiparasitarios**

El impacto de las SH y su potencial interacción con parásitos y bacterias de peces fue demostrado por Meinelt *et al.* (2007), quienes observaron que el daño causado por estos agentes patógenos a los peces era rápidamente reparado en presencia de SH. Kodama *et al.* (2008), trataron dos grupos de ratones endogámicos a los que se les inoculó intraperitonealmente en sangre periférica *Tripanosoma brucei brucei* a un grupo y *Tripanosoma brucei gambiense* a otro grupo con un extracto de humus a distintas concentraciones administrado en el agua de bebida, otro grupo de ratones control se les fue administrada agua sin extracto de humus. En el primer experimento, después de 21 días el 67% de ratones tratados con extracto de humus sobrevivieron al desafío de *T. brucei gambiense* mientras que los ratones control todos murieron dentro de los 7 días posteriores al desafío. En el segundo desafío se utilizó *T. brucei brucei* y de los 12 ratones control todos murieron dentro de los 10 días posteriores al desafío en contraste con los ratones que recibieron el extracto de humus, los cuales presentaron una tasa de sobrevivencia del 40 % a los 20 días después del desafío, los grupos de ratones que mostraron mayor resistencia fueron aquellos a los que se les dio el extracto de humus a una concentración del 3%.

#### **2.5.5 Las sustancias húmicas como antivirales**

Los AH también ejercen actividad antiviral contra varios virus de ADN y ARN (Klöcking & Helbig, 1991). Esta posible interacción entre virus y AH fue discutida por primera vez en 1962 por Schultz quien utilizó AH en contra de un brote de fiebre aftosa en cerdos logrando la eliminación del virus y se supuso que estas SH tenían un efecto desnaturalizante sobre los virus (Klöcking & Sprössig, 1972). Décadas más tarde se hicieron estudios más detallados con aislados de AH en los que se demostró que estos

AH también afectan virus ARN y ADN patógenos para el hombre interfiriendo principalmente con el primer paso de interacción virus-célula. Algunos ejemplos de estos virus son el herpes tipo 1 y tipo 2, influenza A, y rinovirus (Klöcking & Helbig, 1991).

Por lo tanto, se puede afirmar que las SH tienen propiedades antiinflamatorias, antivirales, antitumorales y antibacterianas en el hombre y en animales, pues ya se han empleado en la medicina veterinaria como agentes antidiarreicos, analgésicos, inmunomoduladores y antimicrobianos, con base en lo establecido por el Comité Veterinario de la Agencia Europea de Medicina para la Evaluación de Medicamentos (EMA, 1999).

### **2.5.6 Sustancias húmicas como promotores de crecimiento**

Gracias a sus propiedades antioxidantes, antisépticas, inmunoestimulante, antifúngicas y antivirales se emplean como potenciadores de crecimiento natural (Rath *et al.*, 2006). En pollos de engorda ayudan a promover el crecimiento cuando se agrega al agua potable o al alimento (Ozturk *et al.*, 2010). También en un estudio realizado por Windisch *et al.*, en el 2008, se evaluó el efecto de los AH como promotores de crecimiento en pollos de engorda y se demostró que mejoraban la digestibilidad de nutrientes al mantener estable la microbiota intestinal generando un aumento de peso en los pollos y esto puede deberse a la mejora inducida por AH de la conversión alimenticia. En otro conjunto de experimentos realizados por Edmonds *et al.* (2014), evaluaron el rendimiento y la mortalidad de pollos de engorda mediante una serie de tratamientos divididos en: Tratamiento control (C), tratamiento de humatos (MFG) los cuales son un conjunto de minerales, AH y AF, en un ambiente con altas temperaturas, en donde la tasa de crecimiento mejoró y la mortalidad disminuyó significativamente con la dieta MFG, en comparación a la dieta control sin tratamiento.

Taklimi *et al.* (2012), demostraron que las SH modifican la división del metabolismo de los nutrientes y esto permite que mejore el crecimiento. Adicionalmente tienen un impacto en la profundidad de las criptas en las vellosidades del yeyuno en pollos de engorda, ya que el ácido húmico tiene la capacidad de reducir el pH y disminuir la carga

de bacterias patógenas en el intestino. En cambio, Schepetkin *et al.* (2003), demostraron en un experimento *in vitro* que Mumie, una resina cuya formación se da por humificación, y constituida por AF y AH una vez fraccionada en estos ácidos y administrados los AF en un cultivo junto con macrófagos peritoneales aislados de ratón, estimularon la proliferación de estos macrófagos por lo que sugieren que la fracción de AF tiene una actividad inmunomoduladora.

## **2.6 Alternativas disponibles para prevenir y combatir la coccidiosis**

### **2.6.1 Vacunas contra la coccidiosis**

Consisten en desarrollar una inmunidad protectora al huésped, en este caso al pollo. La primer vacuna con parásitos vivos se desarrolló hace más de 60 años. En la actualidad existen vacunas vivas con ooquistes esporulados atenuados o no atenuados e incluso pueden estar hechas con mezclas de múltiples especies de *Eimeria* spp (Shivaramaiah *et al.*, 2014). Las vacunas no atenuadas contienen los parásitos de *Eimeria* spp a los cuales no se les ha hecho ninguna modificación para disminuir su patogenicidad y son provenientes de cepas de campo o de laboratorio (Peek & Landman 2011). Aunque el uso de estas vacunas es limitado, debido al riesgo de brote inducido por los parásitos vivos, por lo que su uso se da junto a tratamientos químicos que controlen la patogenicidad de los parásitos (Quiroz - Castañeda & Dantán - González, 2015). Las vacunas atenuadas contienen cepas de *Eimeria* spp las cuales han sido manipuladas para reducir su patogenicidad por medio de pases seriados del parásito en embriones de pollo (Peek & Landman, 2011). Estas vacunas atenuadas son muy utilizadas, pero su bajo grado de protección inmunitaria hace necesario el uso de adyuvantes lo que incrementa los costos de estas vacunas (Ahmad *et al.*, 2016). Debido a esto también se han desarrollado vacunas recombinantes que poseen antígenos de la especie *Eimeria* que inducen inmunidad, sin embargo, estas vacunas han sido ineficaces durante la coinfección de la especie *Eimeria* lo que ha llevado a modificaciones de estas vacunas. Las vacunas son una adición para el control de la coccidiosis, y estas tendrán mejores resultados si se usan en combinación con ionóforos en el alimento y no por sí solas (Mathis *et al.*, 2014).

La preocupación que causa el uso de vacunas anticoccidiales en la industria avícola, son los altos costos de producción y el daño al tejido epitelial del intestino de los pollos, aunándole que durante la vacunación puede haber pollos que no alcancen a ser vacunados y entonces halla un desarrollo de inmunidad inconsistente que puede poner en riesgo la salud de la parvada ante coccidiosis u otras enfermedades intestinales (Chapman *et al.*, 2005).

## **2.6.2 Bioseguridad y gestión**

Estrategias adicionales y alternativas para el uso de anticoccidianos son implementar medidas estrictas de bioseguridad como el cambio de camas entre parvadas, limpiar rigurosamente las casetas y equipo utilizado, mantener las granjas libres de plagas, entre otras medidas. Sin embargo, aún con estas medidas estrictas de bioseguridad es casi imposible mantener a las parvadas libres de coccidiosis durante la práctica, no obstante, siempre una granja con medidas de bioseguridad estrictas permitirá que cualquier infección, presente menos complicaciones (Chapman, 2003). Por otro lado, también es importante tener medidas generales de manejo que salvaguarden los requisitos básicos de las aves, como alimentarlas adecuadamente, acceso ilimitado al agua potable, camas adecuadas, humedad, temperatura, ventilación e iluminación. Estas medidas en conjunto permitirán prevenir o disminuir la intensidad de cualquier agente patógeno en la granja incluyendo *Eimeria* spp (Peek & Landman, 2011).

## **2.7 Alternativas disponibles para sustituir los coccidiostatos**

Entre las medidas alternativas exploradas se encuentra el uso de productos naturales los cuales han informado una reducción en la mortalidad de aves (Gholamrezaie *et al.*, 2013; Habibi *et al.*, 2016). Entre los que se incluyen:

### **2.7.1 Probióticos**

Los probióticos son microorganismos vivos con efectos benéficos sobre la salud (Ganguly *et al.*, 2011). Muchos de estos microorganismos forman parte de la microbiota intestinal natural donde viven de manera simbiótica con el organismo huésped y son empleados para tratar afecciones gastrointestinales, se clasifican como bacterias y levaduras no patógenas y vivas como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. en el caso de bacterias grampositivas, y *Saccharomyces*. como levadura (Islam, 2016). Los probióticos al ser ingeridos se adhieren a la mucosa intestinal y de esta manera se evita la unión de bacterias patógenas al epitelio (Scarpellini *et al.*, 2008). La producción de ácido acético, ácido propiónico y ácido láctico, está dada por probióticos a base de bacterias gram positivas, lo que conlleva a una reducción de pH e inhiben el crecimiento de bacterias patógenas (Islam *et al.*, 2016). También por tener una función similar a la microbiota comensal se considera que poseen una acción inmunomoduladora reduciendo casos de diarreas (Scarpellini *et al.*, 2008).

### **2.7.2 Prebióticos**

Son sustratos utilizados por microorganismos comensales, principalmente *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* que brindan un beneficio para la salud (Gibson *et al.*, 2017). Entre las funciones de esta microbiota comensal está la de conversión de carbohidratos dietéticos, proteínas y algunas grasas en metabolitos para beneficio del huésped (Kasubuchi *et al.*, 2015; Verbeke *et al.*, 2015). Actualmente los prebióticos predominantes están basados en carbohidratos, pero existen otros grupos como polifenoles o ácidos grasos poliinsaturados (Gibson *et al.*, 2017). Por ejemplo, *Bifidobacterium* puede metabolizar carbohidratos de bajo peso molecular gracias a sus glucocidasas extracelulares y sistemas de transporte específicos los cuales les permiten asimilar carbohidratos de bajo peso molecular (Falony *et al.*, 2009; Riviere *et al.*, 2018). Mejoran la absorción de minerales debido a que hay mayor solubilidad de calcio a causa de la disminución de pH (Chonan *et al.*, 1995). Por lo tanto, son reconocidos como defensas contra patógenos intestinales debido a que nutren a las bacterias comensales y

estas reducen el pH lo que inhibe el crecimiento de patógenos y reduce la disponibilidad de nutrientes y espacio para las bacterias patógenas (Fooks & Gibson, 2002).

### **2.7.3 Aceites esenciales**

Los aceites esenciales son mezclas naturales volátiles extraídas de plantas (flores, semillas, hojas, etc.) (Seow *et al.*, 2014), como hidrocarburos, monoterpenos y sesquiterpenos y compuestos no volátiles como hidrocarburos, ácidos grasos, esteroides, carotenoides y flavonoides (de Groot & Schmidt, 2016). Estos metabolitos secundarios en la planta funcionan como defensa por sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes (Najafian, 2014). Estos extractos naturales de plantas alteran las membranas bacterianas dañando sus procesos metabólicos y eliminan especies reactivas de oxígeno por su acción antioxidante al igual de prevenir la síntesis de toxinas bacterianas (Horky *et al.*, 2019).

### **2.7.4 Ácidos orgánicos**

Los ácidos orgánicos son un grupo de ácidos grasos de cadena corta que reducen el pH del alimento y del tracto digestivo creando un entorno negativo para el crecimiento de microorganismos patógenos (Suiryanrayna & Ramana, 2015). Además de tener un efecto antimicrobiano contra bacterias Gram negativas principalmente y su producción de metabolitos tóxicos y mejoran la disponibilidad de proteínas y minerales (Roth & Kirchgessner, 1998).

Los ácidos al atravesar la membrana bacteriana por simple difusión se disocian y liberan protones y aniones, los que disminuirán el pH interno de la bacteria y esta, para estabilizarlo, consume su energía metabólica, lo que eventualmente hará que deje de crecer o muera y a su vez la toxicidad de los aniones causará problemas osmóticos (Gauthier, 2002).

## 2.8 Estudios *in vitro* que inhiben la esporulación de *Eimeria* spp

Diferentes estudios *in vitro* se han descrito para determinar el efecto de inhibición de esporulación de diferentes sustancias. Gadelhaq *et al.* (2018), realizaron un estudio para conocer la actividad de dos hierbas: *Allium sativum* (ajo) y *Moringa olifera*, reportando que no hubo efecto sobre la esporulación de los ooquistes con ambas hierbas. En cambio, Habibi *et al.* (2014), observaron una inhibición en la esporulación de *E. tenella* con extractos de hierbas *P. ferulaceae* y *C. intybus*. Además, You (2014), demostró que el ácido acético, la sopa de cresol y el benceno + xileno suprimen la esporulación de ooquistes de *E. tenella*. Adicionalmente, Abbas *et al.* (2015), demostraron que *Saccharum officinarum* (caña de azúcar) inhibe la esporulación de *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. mitis*, *E. brunetti*.

Por otro lado, estudios *in vitro* han utilizado líneas celulares para mantener las coccidias y para ver la invasión de la coccidias a nivel celular. Strout *et al.* (1965), demostraron que se pueden obtener los esporozoitos de *E. acervulina* y ocasionar la infección celular en células embrionarias de riñón y fibroblastos de pollo, fibroblastos de ratón amnióticas del humano y en la línea celular HeLa. Posteriormente, Hofmann & Raether (1990), demostraron que los ooquistes *E. tenella* se podían recuperar de los cultivos de una línea celular de riñón de pollo. En el cual tuvieron un resultado positivo, pero el rendimiento de los ooquistes fue bajo en comparación con los ooquistes que pasan a través de los pollos. Dichas pruebas permitieron que los investigadores pudieran utilizar tanto las pruebas de inhibición de la esporulación como la invasión de líneas celulares. Tal es el caso de Jitviriyanon *et al.* (2016), quienes evaluaron las propiedades anticoccidiales de diferentes aceites esenciales de plantas contra *E. tenella* utilizando ambas pruebas; encontrando que los aceites esenciales *Boesenbergia pandurata* y *Ocimum basilicum* tuvieron una fuerte actividad de inhibición de la esporulación y propiedades citotóxicas contra las coccidias.

Chaudhari *et al.* (2020), utilizaron pollos de engorda de un día y los desafiaron con *E. tenella*, *E. maxima* y *E. acervulina*, para evaluar un probiótico con 10 clases de *Bacillus* para disminuir lesiones intestinales, excreción de oocistos y aumentar la ganancia de

peso. De las cuales solo *Bacillus licheniformis* y dos *Bacillus amyloliquefaciens* fueron los que mostraron una mayor ganancia de peso, disminución de lesiones y reducción de excreta de oocistos en los pollitos infectados en comparación con el grupo control.

Por otro lado, estudios recientes han demostrado que utilizar pruebas tanto *in vitro* como *in vivo*, pueden ser utilizadas para tener el modo de acción de coccidiostatos. Yang *et al.* (2019), utilizaron experimentos *in vitro* e *in vivo* para evaluar el efecto coccidiostato de la planta *B. Pilosa*, encontrando que suprime *E. tenella*, debido a que reduce el porcentaje de mortalidad, la excreción de oocistos y la severidad de lesiones en pollos; ya que disminuye la esporulación de los oocistos, la invasión del esporozoíto y los esquizontes en el ciclo de vida del parásito.

### **III. Justificación**

Actualmente se están buscando alternativas naturales que suplan a los antibióticos promotores de crecimiento, debido al uso desmedido que se les han dado en dietas y a la resistencia que estos han generado en los microorganismos. Las SH son un producto de la biodegradación de la materia orgánica y han demostrado tener propiedades antiinflamatorias, antivirales, antitumorales, antiparasitarias y antibacterianas en el hombre y en animales. Debido a esto en el presente proyecto se busca analizar a las SH como potenciales inhibidores de la esporulación de ooquistes de *E. acervulina* en un experimento *in vitro* y reducir la excreción de oocistos de *Eimeria* spp en pollos de engorda desafiados en un experimento *in vivo* sin comprometer la salud intestinal.

#### **IV. Hipótesis**

Las SH producirán la reducción de la esporulación de *E. acervulina*, y reducirán la producción de oocistos en pollos de engorda desafiados a *Eimeria* spp.

## **V. Objetivo general**

Evaluar el efecto del extracto de SH sobre la esporulación de oocistos de *E. acervulina* y la reducción en el número de oocistos excretados en pollo de engorda.

### **5.1 Objetivos específicos**

- Desarrollar un sistema *in vitro* para favorecer la esporulación de oocistos.
- Evaluar el extracto de SH *in vitro* como inhibidor de la esporulación de oocistos de *E. acervulina*.
- Evaluar el potencial de SH *in vivo* como coccidiostato en pollo de engorda.
- Evaluar la cantidad de oocistos de *Eimeria* spp. en heces de pollo suplementados con o sin SH en la dieta.

## **VI. Metodología**

### **6.1 Lugar experimental**

Los experimentos *in vitro* y los análisis de laboratorio se realizaron en el laboratorio de Microbiología Veterinaria en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Naturales, campus Juriquilla, de la UAQ. El proyecto fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro con la emisión de la resolución **95FCN2019/20FCN2020** (Anexo 1).

El experimento *in vivo* se realizó en las instalaciones del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal (CENID-FyMA), perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, ubicadas en Ajuchitlán, Colón Querétaro

### **6.2 Obtención de sustancias húmicas**

Las muestras de SH se obtuvieron del humus de una lombricomposta, hecha con lombriz roja Californiana (*Eisenia foetida*) y alimentadas con una pre-composta de

estiércol de borrego. El humus obtenido fue la única fuente de obtención de SH, y el proceso de extracción se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Maguey-González *et al.* (2018).

Para el proceso de extracción alcalina de SH, se usó hidróxido de sodio (NaOH 0.1 M), en solución acuosa. Se dejó agitando en una platina durante una hora, se dejó reposar 24 h a temperatura ambiente y se filtró con una malla de 125  $\mu\text{m}$ , este sobrenadante se acidificó con ácido sulfúrico al 10% ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) para reducir su pH a 2. Esto se hizo posterior a una separación por decantación. La fracción líquida en la parte superior AF y la fracción sólida en la parte inferior AH. La fracción sólida de AH se lavó dos veces con agua destilada para eliminar los residuos de ácido sulfúrico y entre los lavados se centrifugó durante 20 min a 5000 rpm. En un rotoevaporador se desecó la muestra a una temperatura de 60 °C hasta tener una consistencia gelatinosa. Después se secó en un horno a 60 °C hasta obtener finalmente un polvo color marrón con un pH de 7 a 8.

### **6.3 Obtención de oocistos**

Los oocistos de *E. acervulina* fueron comprados en Jiutepec Morelos y recibidos y resguardados en un refrigerador en el laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Naturales a 4°C el día 13 de agosto de 2020. Los oocistos sin esporular venían en un tubo de ensayo con un volumen de 13 ml en agua potable a una concentración de  $5 \times 10^6$  oocistos / ml.

### **6.4 Experimentos *in vitro***

**Los experimentos *in vitro* se dividieron en dos etapas:**

**Etapas 1.** Desarrollo del sistema *in vitro*, en el cual se llevó a cabo la estandarización de una serie de experimentos *in vitro* para obtener el porcentaje de esporulación de los oocistos, mediante la implementación de condiciones adecuadas del sistema de incubación de oocistos, en el cual se pretendió mantener los oocistos 48 horas, incubándose a una temperatura de 25-29 °C y 80% de humedad. Los tratamientos a evaluar fueron los siguientes: A. control negativo, oocistos no esporulados ( $1 \times 10^5 \mu\text{l}$ ) +

5 ml de agua destilada; B. control positivo, ooquiste no esporulados ( $1 \times 10^5 \mu\text{l}$ ) + 5 ml de dicromato de potasio para prevenir bacterias (Molan *et al.*, 2009); C. tratamiento inhibidor 1, ooquistes no esporulados ( $1 \times 10^5 \mu\text{l}$ ) + 5 ml de etanol al 70%; y D. tratamiento inhibidor 2, ooquistes no esporulados ( $1 \times 10^5 \mu\text{l}$ ) + 5 ml formalina al 10%. El tiempo de esporulación y el número de ooquistes esporulados se registraron a las 6, 12, 24 y 48h mediante método de hemocitómetro y se registraron las deformidades de la pared del oocisto. La inhibición de la esporulación (IE) se determinó en porcentaje de acuerdo a la siguiente ecuación (You, 2014; Gadelhaq *et al.*, 2018):  $IE\% = \text{esporulación de control} - \text{esporulación del tratado} / \text{esporulación del control} \times 100$ .

**Etapa 2.** Evaluación de diferentes dosis de SH como inhibidores de esporulación de oocistos. En esta etapa se pretendió revisar el efecto de diferentes dosis de SH, en el cual se revisaron primeramente las dosis que se trabajaron en campo de acuerdo a lo descrito por Domínguez-Negrete *et al.* (2019), y posteriormente se trabajaron dosis bajas e intermedias para revisar el efecto. Cada experimento se corrió al menos con cinco tratamientos, por duplicado, por ejemplo para el primer experimento los tratamientos a evaluar fueron: A. control negativo, ooquistes no esporulados ( $1 \times 10^6$ ) + 5ml de agua destilada; B. control positivo, ooquistes no esporulados ( $1 \times 10^6$ ) + 5 ml de dicromato de potasio; C. tratamiento inhibidor, ooquistes no esporulados ( $1 \times 10^6$ ) + 5 ml formalina al 10%; D. ooquistes no esporulados ( $1 \times 10^6$ ) + 5 ml de dicromato de potasio + dosis de 0.6 mg de AH/ml; E. ooquistes no esporulados ( $1 \times 10^6$ ) + 5 ml de dicromato de potasio + dosis 1.25 mg de AH/ml. El tiempo de esporulación y el número de ooquistes esporulados y la obtención del porcentaje de inhibición de la esporulación se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en la etapa 1.

## 6.5 Experimentos *in vivo*

### 6.5.1 Desarrollo

#### Se realizaron dos experimentos *in vivo*

Los experimentos *in vivo* se realizaron en las instalaciones del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología Animal, perteneciente al Instituto Nacional de

Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, ubicadas en Ajuchitlán, Querétaro. Las SH se obtuvieron a partir del humus de una lombricomposta, hecha con lombriz roja Californiana *Eisenia foetida* y alimentadas con una pre-composta de estiércol de borrego. El humus obtenido fue la única fuente de SH, y el proceso de extracción se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Maguey-González *et al.* (2018), la dosis de SH a evaluar fue del 0.5%. Los tratamientos de ambos experimentos se describen en el Cuadro 3. Las dietas experimentales fueron formuladas de acuerdo a las recomendaciones de la Guía de Manejo de pollo Ross (2002), con maíz molido y pasta de soya. El agua y alimento formulado y preparado en la planta de alimentos perteneciente al (CENID-FyMA), fueron proporcionados a libre acceso. El número de animales por ambos experimentos fue de 90, 45 pollos para experimento 1 y 45 pollos para el experimento 2.

#### **6.5.2 Experimento 1. Inoculación controlada de *Eimeria* spp.**

Para el primer experimento *in vivo*, se utilizaron 45 pollos machos de la raza Ross de 5 a 22 días de edad. Los cuales se dividieron en tres pollos por jaula en jaulas elevadas. Durante los primeros cinco días los pollos fueron tratados con un coccidiostato comercial para eliminar cualquier posible infección con *Eimeria* spp. Del día cinco al día 22 cada pollo del primer experimento fue inoculado con la vacuna atenuada "Livacox Q" compuesta por *E. acervulina*, *E. máxima*, *E. tenella* y *E. necatrix*, con una dosis de 0.5 ml con 10,000 oocistos esporulados. Los tres tratamientos fueron; A. control positivo (con coccidiostato y antibiótico sin inclusión de SH); B. control negativo (sin inclusión de SH y sin coccidiostato ni antibiótico); y C. Inclusión de SH, utilizando cinco jaulas por tratamiento y tres pollos por jaula. Las excretas fueron recolectadas desde el día tres post infección (para revisar que no hubiera oocistos) hasta los días siete post infección haciendo un pool por jaula para llevar a cabo conteos de oocistos en el microscopio. La variable productiva a medir para este experimento fue peso corporal, donde se tomó el peso por jaula en el día 1 previo a la inoculación de *E. acervulina* y el día 17 previo al sacrificio de los pollos.

#### **6.5.3 Experimento 2. Exposición natural de *Eimeria* spp.**

Para el segundo experimento *in vivo*, se tuvieron los mismo tratamientos que el experimento 1, con cinco jaulas por tratamiento (n=5, 30 animales en total). Cada jaula tenía dos pollos libres de *Eimeria* spp. y a cada jaula se le añadió un tercer pollo expuesto a *Eimeria* spp. durante el primer experimento (pollo proveniente del control negativo, tratamiento B). Los pollos que se usaron para ser infestados naturalmente debieron de mantenerse previamente a los tratamientos en el alimento durante los 7 días previos a la infestación natural con los pollos. El conteo de oocistos se hizo primeramente a los pollos inoculados previamente 1 día antes de iniciar el experimento. A los pollos que fueron desafiados se tomó el primer pool de heces para conteo en microscopio en el día cero y posteriormente se puso el pollo infestado. Los conteos de oocistos se hicieron obteniendo un pool los días 5, 8, 11 y 14. La variable productiva a medir fue peso corporal, por lo que se tomó el peso por jaula en los días 1 y 14.

Cuadro 3. Tratamientos *in vivo*

Tratamiento	Características	Desafío con <i>Eimeria</i> spp.
A	Grupo con dosis de 0.5g/kg de coccidiostato y dosis de 0.5g/kg antibiótico en el alimento.	Si
B	Grupo control negativo sin tratamientos en el alimento.	Si
C	Grupo con dosis de 5g/kg del extracto de SH sin coccidiostato ni antibiótico en el alimento.	Si

#### 6.5.4 Análisis estadísticos

Los resultados de porcentaje de inhibición de esporulación fueron transformados a arcoseno y analizados por un análisis de varianza (ANOVA) en bloques al azar en el programa SPSS para saber si hubo diferencia entre tratamientos. En el experimento *in vivo* para la estimación de las medias de excreción de oocisto, como la estimación de las

medias de los parámetros productivos en todos los grupos bajo distintos tratamientos se trabajó con un modelo lineal general con ANOVA univariado.

## VII. Resultados

### 7.1 Experimentos *in vitro*. Análisis de varianza para la esporulación media de *Eimeria acervulina* por hora de conteo.

La suplementación de 0.6mg/ml (AH1) y 1.2mg/ml (AH2), extraído de una composta de lombriz, en un modelo *in vitro* no mostró resultados significativos sobre la esporulación de oocistos de *Eimeria acervulina* a la hora 6, 12 y 24. A la hora 48 se observó un aumento en la esporulación con el tratamiento de AH con la dosis de 0.6mg/ml. mientras que con el tratamiento inhibidor de formol al 10% se obtuvo un incremento en la inhibición de la esporulación. En cuanto a los bloques, estos no tuvieron diferencia significativa en ninguna hora tal como se muestra en los cuadros 4, 5 y 6.

Se realizó un análisis de varianza por cada hora de conteo para comparar la esporulación media por horas. La esporulación media a la hora 6 no presentó diferencia significativa entre los grupos. Ningún tratamiento fue efectivo a esta hora por qué no hubo inhibición de la esporulación (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto de la hora 6 post – incubación sobre la esporulación, no esporulación y porcentaje de la inhibición de oocistos de *Eimeria acervulina*.

Tratamiento	Oocistos esporulados		P	Oocistos no esporulados		P	% inhibición de la esporulación		P	Bloque	P
	Media	EE		Media	EE		Media	EE			
A) Control negativo	4.50 ± 0.70		NS	8.66 ± 0.92		NS	0.00 ± 0.06		NS	2	NS
B) Control positivo	4.16 ± 0.70			5.16 ± 0.92			0.31 ± 0.06			3	
C) Tratamiento inhibidor	4.60 ± 0.70			7.33 ± 0.92			0.16 ± 0.06				
D) 0.6 mg de AH/ml	4.66 ± 0.70			7.66 ± 0.92			0.14 ± 0.06				
E) 1.25 mg de AH/ml	5.75 ± 0.70			8.08 ± 0.92			0.10 ± 0.06				

**Total**      **4.73 ± 0.31**                      **7.38 ± 0.41**                      **0.14 ± 0.03**

NS: P>0.05. Análisis de medias por hora para comparaciones de Tukey. Se muestra la media por grupo como el total.

En el Cuadro 5 se muestra que no hubo una diferencia significativa en las medias de esporulación, no esporulación e inhibición. Todos los grupos son iguales a las 12 horas.

Cuadro 5. Efecto de la hora 12 post – incubación sobre la esporulación, no esporulación y porcentaje de la inhibición de oocistos de *Eimeria acervulina*.

Tratamiento	Oocistos esporulados		P	Oocistos no esporulados		P	% inhibición de la esporulación		P	Bloque	P
	Media	EE		Media	EE		Media	EE			
A) Control negativo	4.00 ± 0.70		NS	7.91 ± 0.92		NS	0.00 ± 0.06		NS	2	NS
B) Control positivo	4.66 ± 0.70			5.50 ± 0.92			0.11 ± 0.06			3	
C) Tratamiento inhibidor	2.66 ± 0.70			9.25 ± 0.92			0.40 ± 0.06				
D) 0.6 mg de AH/ml	4.50 ± 0.70			6.66 ± 0.92			0.13 ± 0.06				
E) 1.25 mg de AH/ml	5.08 ± 0.70			7.58 ± 0.92			0.17 ± 0.06				
<b>Total</b>	<b>4.18 ± 0.31</b>			<b>7.38 ± 0.41</b>			<b>0.16 ± 0.03</b>				

NS: P>0.05.

En el Cuadro 6 se muestra que no hubo una diferencia significativa en las medias de esporulación, no esporulación e inhibición, entre los tratamientos. Todos los grupos son iguales a las 24 horas.

Cuadro 6. Efecto de la hora 24 post – incubación sobre la esporulación, no esporulación y porcentaje de la inhibición de oocistos de *Eimeria acervulina*.

Tratamiento	Oocistos esporulados		P	Oocistos no esporulados		P	% inhibición de la esporulación		P	Bloque	P
	Media	EE		Media	EE		Media	EE			

A) Control negativo	4.91 ± 0.70	NS	9.50 ± 0.92	NS	0.00 ± 0.06	NS	2	NS
B) Control positivo	5.75 ± 0.70		6.41 ± 0.92		0.11 ± 0.06		3	
C) Tratamiento inhibidor	4.25 ± 0.70		8.00 ± 0.92		0.21 ± 0.06			
D) 0.6 mg de AH/ml	5.91 ± 0.70		9.08 ± 0.92		0.08 ± 0.06			
E) 1.25 mg de AH/ml	4.25 ± 0.70		7.83 ± 0.92		0.26 ± 0.06			
<b>Total</b>	<b>5.01 ± 0.31</b>		<b>8.16 ± 0.41</b>		<b>0.13 ± 0.03</b>			

NS: P>0.05.

El análisis de varianza mostró que a las 48 horas post – incubación, había diferencia significativa en la esporulación de oocistos de *E. acervulina* entre algunos tratamientos con respecto al control negativo (Cuadro 7).

Cuadro 7. Efecto de la hora 48 post – incubación sobre la esporulación, no esporulación y porcentaje de la inhibición de oocistos de *Eimeria acervulina*.

Tratamiento	Oocistos esporulados		P	Oocistos no esporulados		P	% inhibición de la esporulación		P	Bloque	P
	Media	EE		Media	EE		Media	EE			
A) Control negativo	7.83 ± 0.70		<0.05	12.25 ± 0.92		<0.05	0.00 ± 0.06		NS	2	NS
B) Control positivo	7.08 ± 0.70			6.83 ± 0.92			0.23 ± 0.06			3	
C) Tratamiento inhibidor	3.50 ± 0.70			13.25 ± 0.92			0.62 ± 0.06				
D) 0.6 mg de AH/ml	13.41 ± 0.70			15.16 ± 0.92			0.04 ± 0.06				
E) 1.25 mg de AH/ml	7.25 ± 0.70			11.66 ± 0.92			0.24 ± 0.06				
<b>Total</b>	<b>7.81 ± 0.31</b>			<b>11.83 ± 0.41</b>			<b>0.23 ± 0.03</b>				

NS: P>0.05. Análisis de medias por hora para comparaciones de Tukey.

### 7.1.1. Esporulaci3n media entre tratamientos

Se hizo un an3lisis de varianza para la esporulaci3n media entre tratamientos a las 48 hrs. Hubo diferencia estadística con el tratamiento inhibidor el cual inhibió la esporulaci3n media de los oocistos, mientras que los tratamientos con 1.25 mg de AH/ml y el control positivo no tuvieron una diferencia significativa en relaci3n al control negativo, mientras que el tratamiento con 0.6 mg de AH/ml estimul3 la esporulaci3n en relaci3n al control negativo (Cuadro 8).

Cuadro 8. Esporulaci3n media de oocistos de *Eimeria acervulina* de cada uno de los tratamientos a la hora 48 post-incubaci3n con ácidos húmicos.

Tratamiento	Oocistos esporulados		P	Bloque	P
	Media	EE			
A) Control negativo	5.31 <sup>b</sup> ± 0.35		NS	1	NS
B) Control positivo	5.41 <sup>b</sup> ± 0.35		NS	2	
C) Tratamiento inhibidor	3.75 <sup>a</sup> ± 0.35		P<0.05		
D) 0.6 mg de AH/ml	7.12 <sup>c</sup> ± 0.35		P<0.05		
E) 1.25 mg de AH/ml	5.58 <sup>b</sup> ± 0.35		NS		

NS: P>0.05. <sup>ab</sup> Letra distinta indica diferencia significativa (P<0.05). An3lisis de medias por tratamiento para comparaciones de Tukey.

El Cuadro 9 muestra que a la hora 48 post – incubaci3n no se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos de AH y el tratamiento inhibidor con relaci3n al tratamiento control negativo, sin embargo, si se obtuvo una diferencia estadística entre el tratamiento control positivo y el control negativo.

Cuadro 9. Medias de la no esporulaci3n de oocistos de *Eimeria acervulina* de cada uno de los tratamientos a la hora 48 post-incubaci3n con ácidos húmicos.

Tratamiento	Oocistos no esporulados	P	Bloque	P
-------------	-------------------------	---	--------	---

	Media	EE			
A) Control negativo	9.58 <sup>b</sup> ± 0.46		NS	2	NS
B) Control positivo	5.97 <sup>a</sup> ± 0.46		P<0.05	3	
C) Tratamiento inhibidor	9.45 <sup>b</sup> ± 0.46		NS		
D) 0.6 mg de AH/ml	9.64 <sup>b</sup> ± 0.46		NS		
E) 1.25 mg de AH/ml	8.79 <sup>b</sup> ± 0.46		NS		

NS: P>0.05. <sup>ab</sup> Letra distinta indica diferencia significativa (P<0.05). Análisis de medias por tratamiento para comparaciones de Tukey.

En el Cuadro 10. se muestra que hubo una menor inhibición de la esporulación en el tratamiento con 0.6 mg de AH/ml en comparación al resto de los tratamientos y el tratamiento inhibidor presentó una mayor inhibición de la esporulación en relación al control negativo, mientras que la inhibición de los tratamientos control positivo y tratamiento con 1.25 mg de AH/ml no tuvieron diferencia significativa entre ellos.

Cuadro 10. Medias del porcentaje de inhibición de esporulación de *Eimeria acervulina* de cada uno de los tratamientos a la hora 48 post-incubación con ácidos húmicos.

Tratamiento	% inhibición de la esporulación		P	Bloque	P
	Media	EE			
A) Control negativo	0.00 <sup>a</sup> ± 0.03		NS	2	NS
B) Control positivo	0.19 <sup>b</sup> ± 0.03		NS	3	
C) Tratamiento inhibidor	0.35 <sup>c</sup> ± 0.03		P<0.05		
D) 0.6 mg de AH/ml	0.10 <sup>ab</sup> ± 0.03		P<0.05		
E) 1.25 mg de AH/ml	0.19 <sup>b</sup> ± 0.03		NS		

NS: P>0.05. <sup>ab</sup> Letra distinta indica diferencia significativa (P<0.05). Análisis de medias por tratamiento para comparaciones de Tukey.

### **7.1.2. Análisis de varianza sobre la esporulación media entre bloques X hora X tratamiento.**

Los resultados obtenidos indicaron que en la hora 48 hubo una diferencia significativa entre el tratamiento con 0.6 mg de AH/ml y el Tratamiento inhibidor con respecto a los demás tratamientos. Sin embargo, el tratamiento con 0.6 mg de AH/ml mostró una mayor esporulación en los dos bloques, mientras que el tratamiento con 1.25 mg de AH/ml no tuvo diferencia significativa con el tratamiento control negativo, por otro lado en los resultados obtenidos en los análisis de medias de la no esporulación, muestran que la única diferencia significativa a la hora 48 fue la del tratamiento control positivo (dicromato de potasio), en comparación al resto de los tratamientos, debido a que este induce a la esporulación, en cambio los demás tratamientos no tuvieron una diferencia significativa en relación al tratamiento control negativo. Por último, en el análisis de medias de la inhibición de la esporulación, el tratamiento control positivo no tuvo una diferencia significativa con el tratamiento de 0.6 mg de AH/ml y 1.25 mg de AH/ml, mientras que el tratamiento con 0.6 mg de AH/ml presentó una ligera similitud con el tratamiento control negativo, siendo el tratamiento inhibidor el que más porcentaje de inhibición tuvo, lo que lo hizo diferente significativamente entre el resto de los tratamientos, demostrando así, que la suplementación de 0.6 y 1.25mg de AH/ml de manera *in vitro* en comparación con el tratamiento control negativo no cumplió con el objetivo general de este trabajo de investigación.

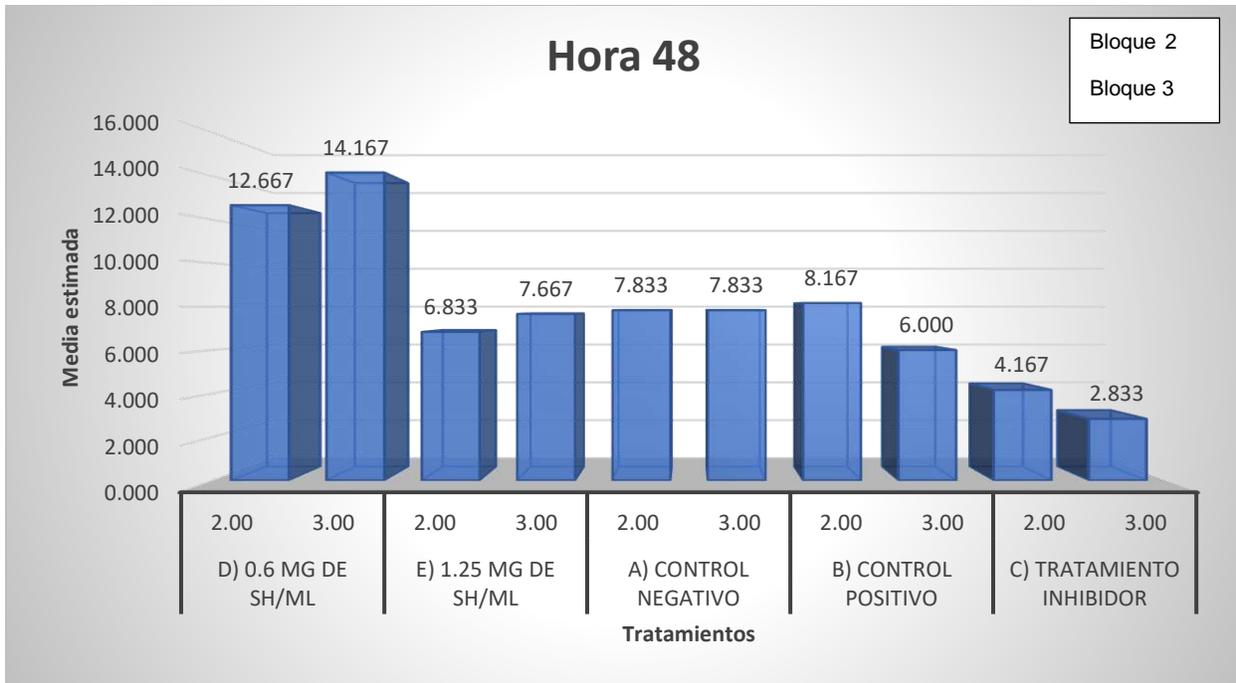


Figura 6. Esporulaci3n media a la hora 48. Comparaci3n de la esporulaci3n media de *Eimeria acervulina* en los dos bloques con los distintos tratamientos a la hora 48.

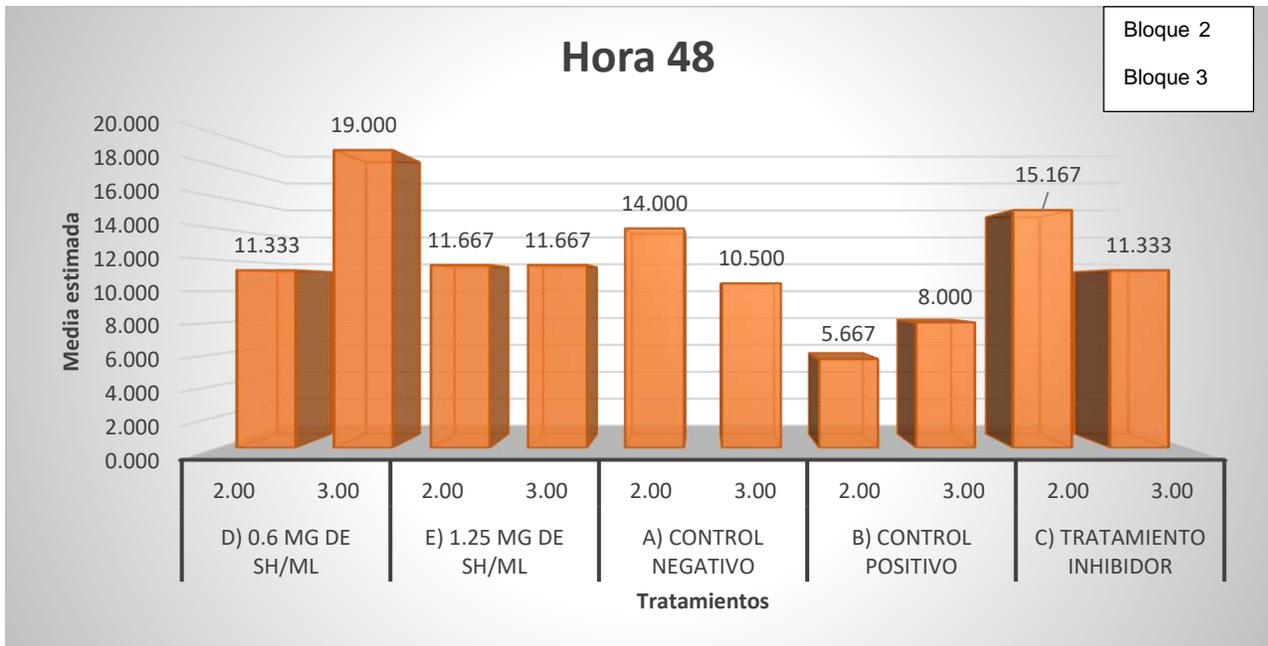


Figura 7. Comparaci3n de medias de oocistos de *Eimeria acervulina* sin esporular a la hora 48.



Figura 8. Comparación de medias del % Inhibición de la esporulación de oocistos de *Eimeria acervulina* a la hora 48.

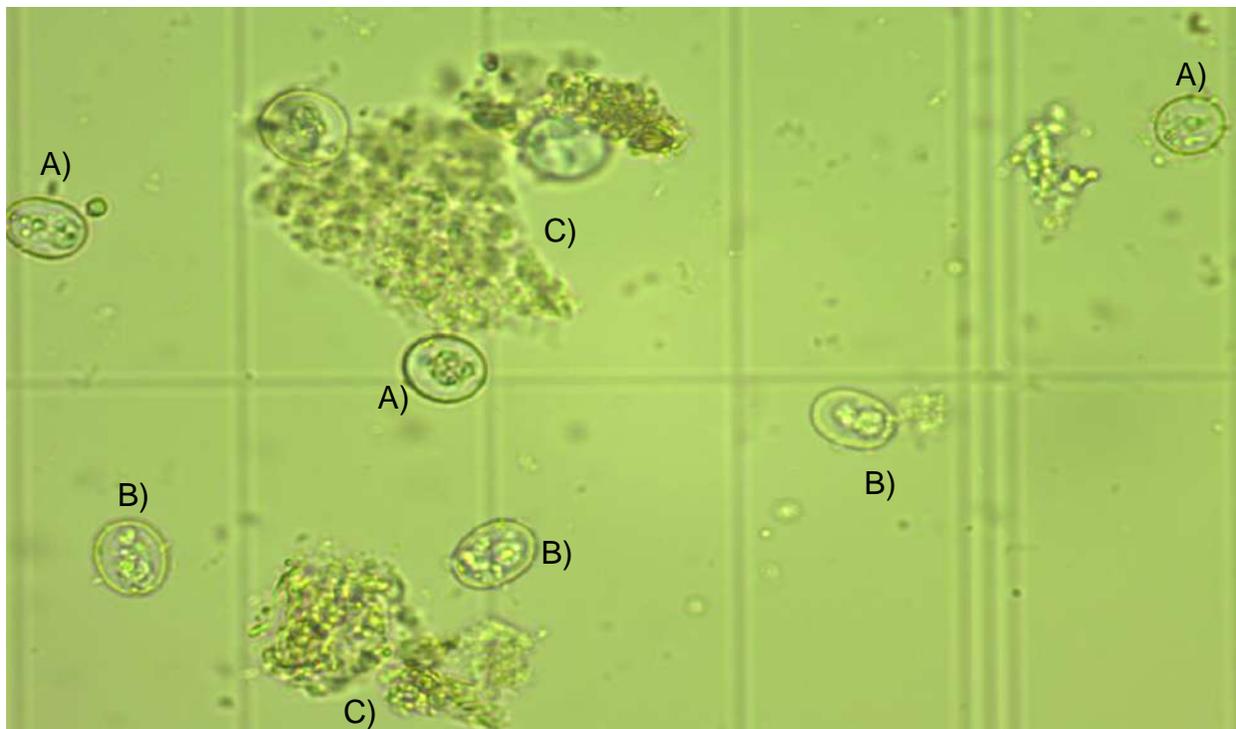


Figura 9. Oocistos de *E. acervulina*, identificados en la muestra de AH a una dosis de 1.25mg de AH/ml. por microscopía con objetivo (40x). A) oocisto no esporulados; B) oocistos esporulados; C) extracto de ácidos húmicos.

## 7.2 Experimentos *in vivo*

### 7.2.1 Medición de parámetros productivos de pollos de engorda. Experimento 1

En el Cuadro 11 se muestran los resultados del comportamiento productivo durante el periodo de 5 a 22 días de edad de los pollos de engorda, suplementados con 0.5% de SH en la dieta. Al final de ese periodo, no se tuvo un efecto significativo en los parámetros productivos en comparación con la dieta del grupo B. y el grupo A. dieta con coccidiostato ( $P>0.05$ ).

Cuadro 11. Comportamiento productivo en pollo de engorda de 5 a 22 días de edad.

Variables productivas	A) Control positivo (Coccidiostato y antibiótico sin inclusión de SH )	B) Control negativo (Sin inclusión de SH y sin coccidiostato ni antibiótico)	C) SH (inclusión de SH )	EEM
Peso día 5, Kg	0.24	0.23	0.24	0.006
Peso día 21, Kg	1.74	1.76	1.8	0.052
Consumo de alimento, Kg	2.98	2.97	2.94	0.021

<b>Ganancia de peso, Kg</b>	1.5	1.53	1.55	0.051
<b>Conversión alimenticia</b>	1.99	1.95	1.89	0.067

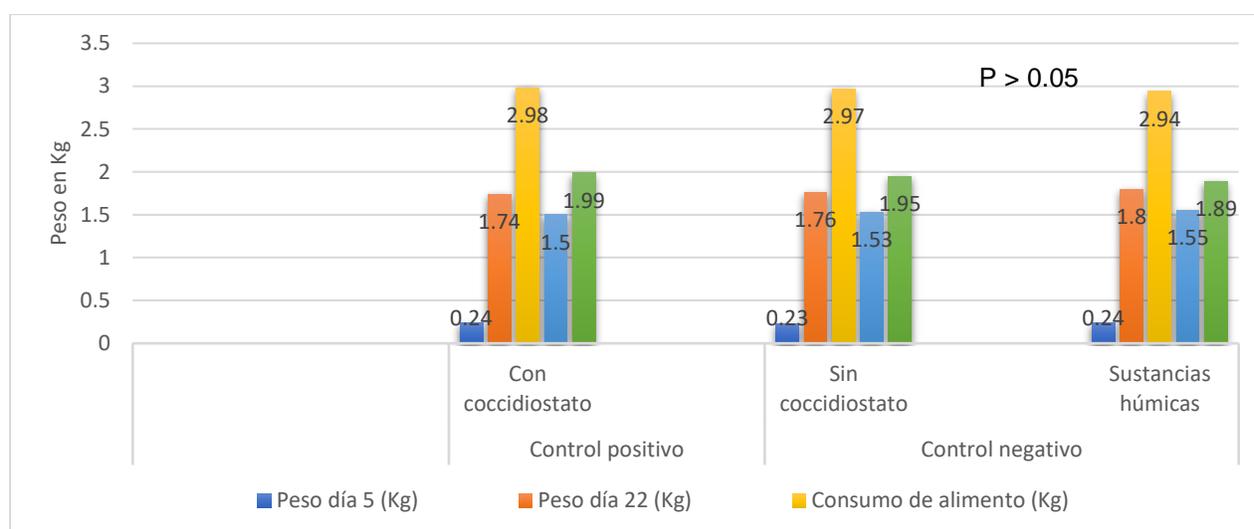


Figura 10. Representación gráfica de las medias del comportamiento productivo en el experimento 1 *in vivo*

### 7.2.2 Valores de excreción de oocistos / g de heces. Experimento 1

Durante este experimento, se hicieron conteos de oocistos/g de excretas de los pollos inoculados de manera controlada y se observó que con la suplementación del extracto de SH en la dieta no tuvo un efecto significativo en la disminución de excreción de oocistos en comparación con los grupos control positivo y negativo (Figura 11, Figura 12  $P > 0.05$ ), debido a una gran variabilidad en el número de oocistos contados/g de excreta.

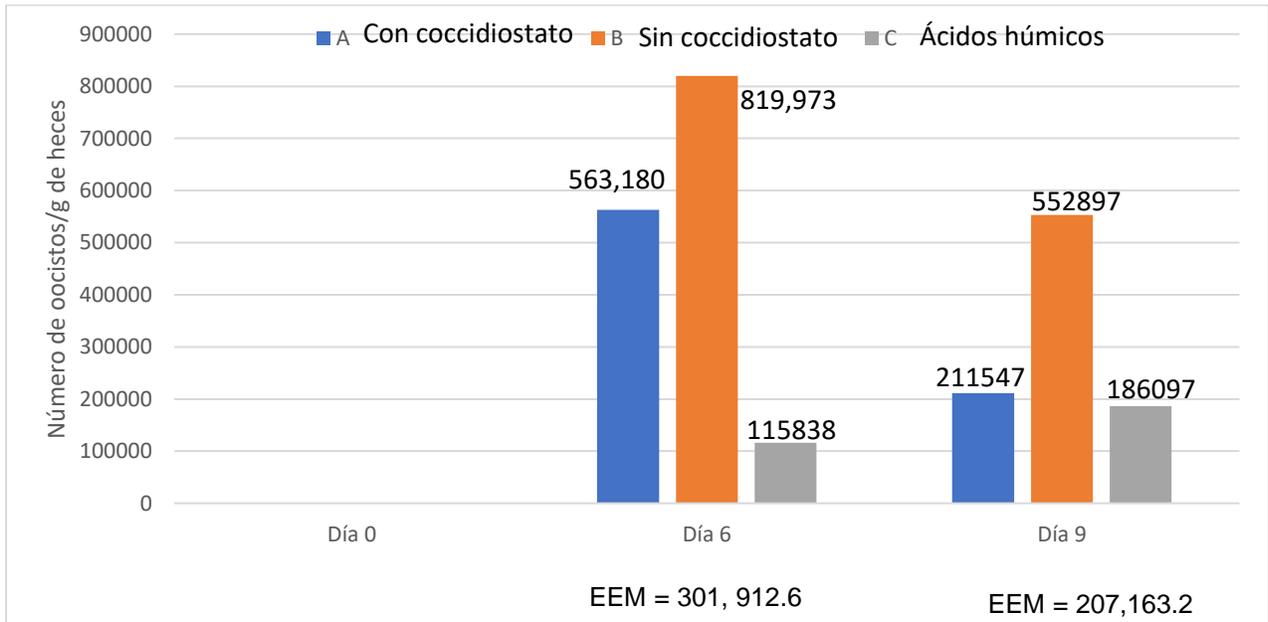


Figura 11. Número de oocistos excretados a los 0, 6 y 9 días post-inoculación de vacuna Livacox-Q

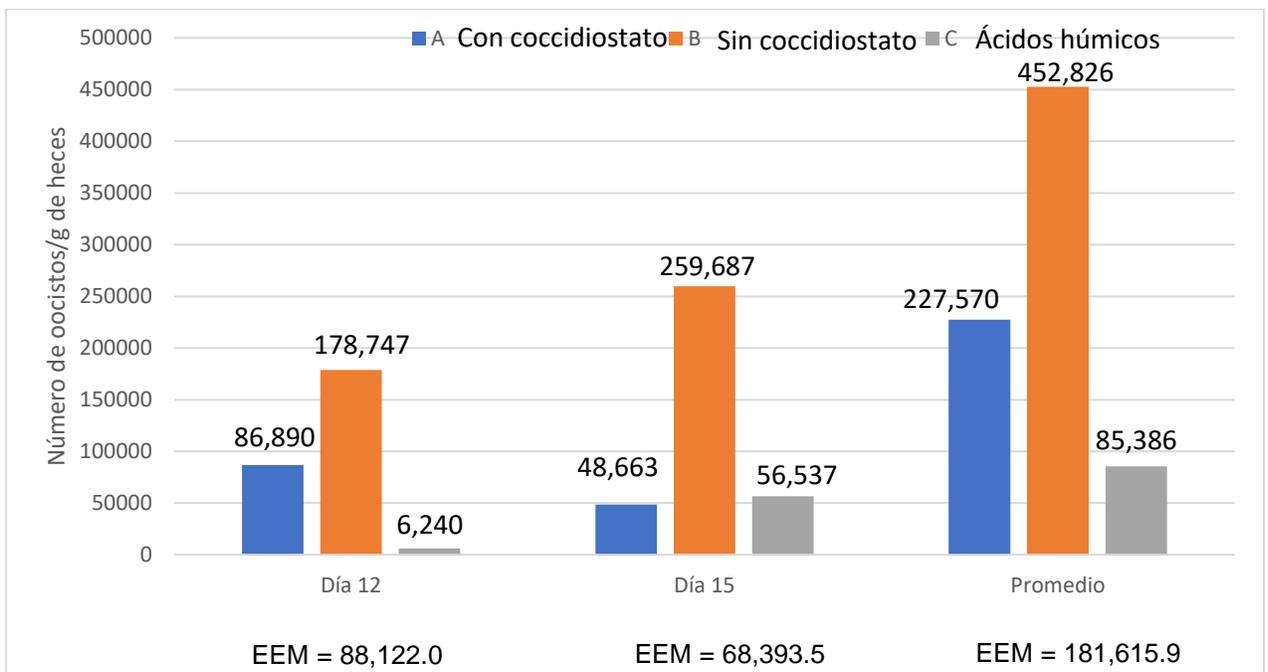


Figura 12. Número de oocistos excretados a los 12 y 15 días post-inoculación de vacuna Livacox-Q

### 7.2.3 Medición de los parámetros productivos. Experimento 2

Comportamiento productivo de los pollos durante el periodo de 13 a 27 días de edad suplementados con 0.5% del extracto de SH en la dieta para el segundo experimento *in vivo* en pollos de engorda (Cuadro 12). No presentó diferencias significativas en los parámetros productivos en comparación al grupo control positivo y negativo ( $P>0.05$ ). Sin embargo, para el día tres de haber iniciado este experimento, por razones desconocidas murió un pollo del grupo de SH lo cual pudo interferir en los resultados obtenidos.

Cuadro 12. Comportamiento productivo de 13 a 27 días de edad.

<b>Variables productivas</b>	<b>A) Control positivo (Coccidiostato y antibiótico sin inclusión de SH )</b>	<b>B) Control negativo (Sin inclusión de SH y sin coccidiostato ni antibiótico)</b>	<b>C) (inclusión de SH )</b>	<b>EEM</b>
<b>Peso día 13, Kg</b>	0.78	0.91	0.83	0.056
<b>Peso día 27, Kg</b>	2.68	2.96	2.6	0.097
<b>Consumo de alimento, Kg</b>	3.9	4.03	3.68	0.101
<b>Ganancia de peso, Kg</b>	1.89	2.04	1.77	0.06
<b>Conversión alimenticia</b>	2.06	1.97	2.08	0.058

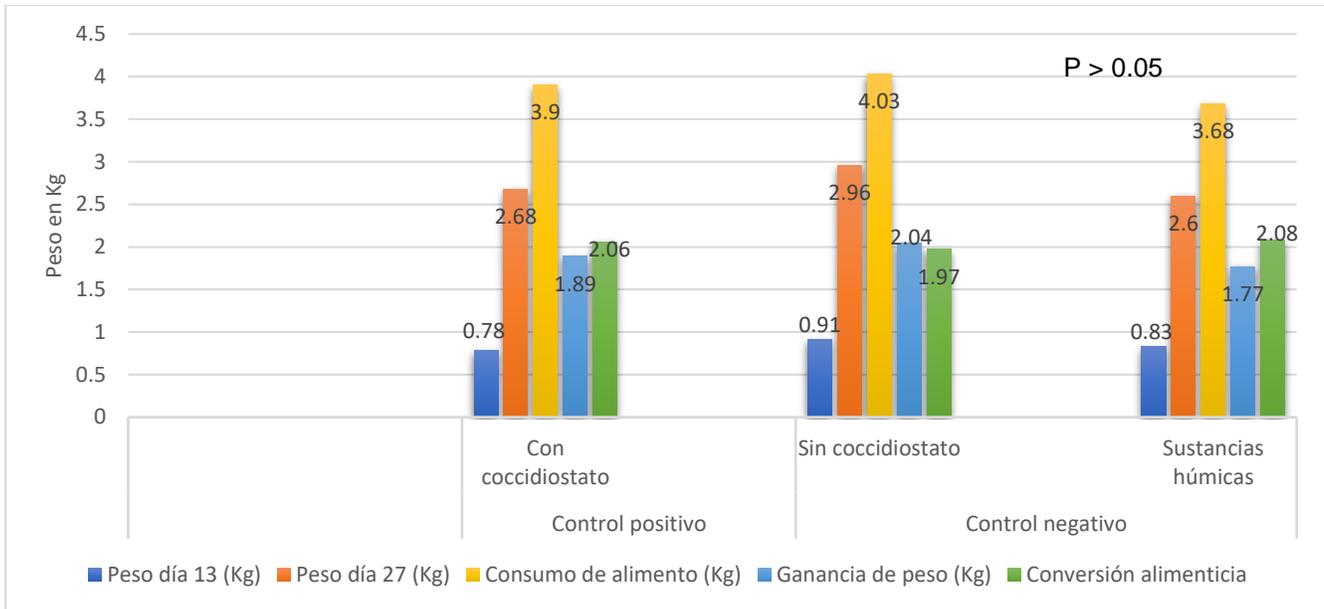


Figura 13. Representación gráfica de las medias del comportamiento productivo en el experimento 2 *in vivo*.

#### 7.2.4 Valores de excreción de oocistos / g de heces. Experimento 2

Para este experimento también se hicieron conteos de oocistos/g de excretas y se observó que la suplementación del extracto de SH en la dieta de los pollos infectados naturalmente no presentó un efecto significativo sobre la cantidad de oocistos / g de heces en comparación con el grupo control positivo y negativo (Figura 14 y Figura15,  $P > 0.05$ ). Los resultados obtenidos fueron muy similares a los del experimento 1.

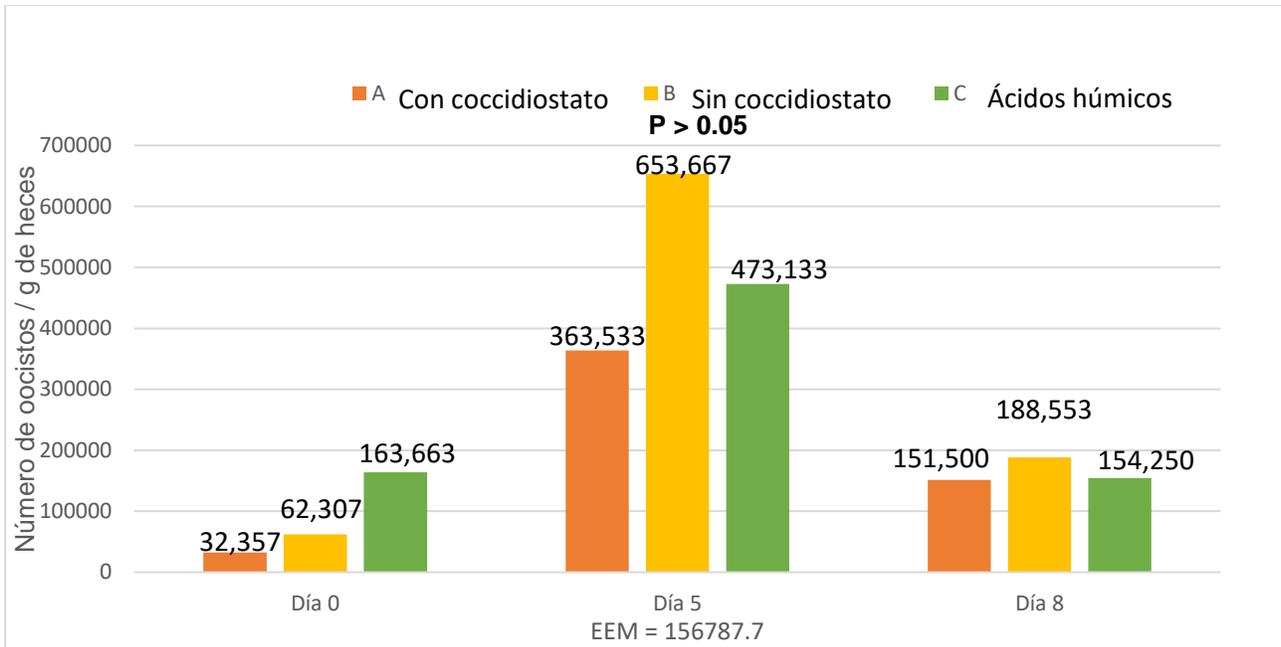


Figura 14. Número de oocistos excretados a los días 0, 5 y 8 post-inoculación.

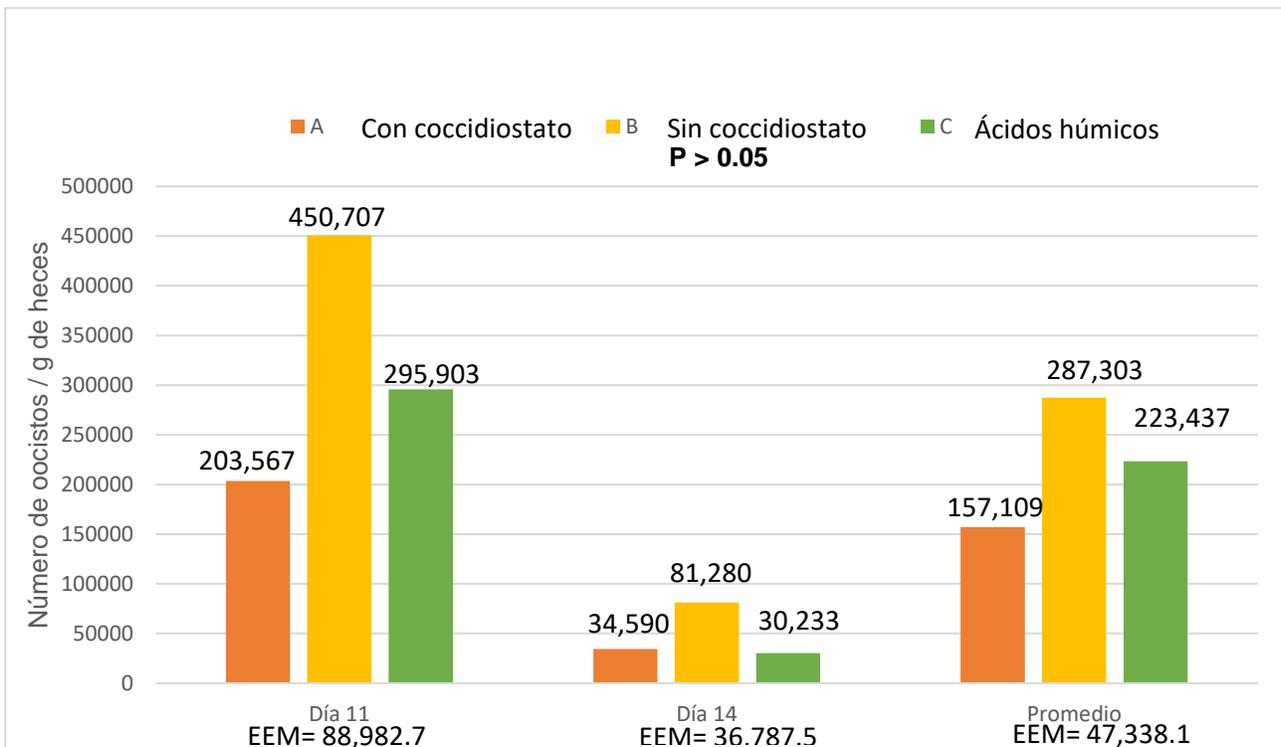


Figura 15. Número de oocistos excretados a los días 11 y 14 post-inoculación y su promedio.

## VIII. Discusión

Los tratamientos experimentales con dosis de 0.6 mg de AH/ml y 1.25 mg de AH/ml en el trabajo *in vitro* no inhibieron la esporulación de oocistos de *Eimeria acervulina*. Esto a pesar de que se implementaron las condiciones ideales para su esporulación, la cual se puede inducir durante las primeras 24-48hrs (Edgar, 1955). Estas condiciones adecuadas consisten en la humedad, temperatura y oxígeno (Kheysin, 1972). Pero esta viabilidad va a variar dependiendo si hay reducción de oxígeno o exposición a otros patógenos (Reyna *et al.*, 1983). Para predecir la eficacia de una molécula experimental como posible anticoccidial muchos autores se han enfocado en la fase exógena de *Eimeria* spp. tomando como indicadores la tasa de esporulación y su viabilidad de manera *in vitro*. Sin embargo, no se toma en cuenta que la mayor parte del ciclo de vida de *Eimeria* sucede dentro del anfitrión (Felici *et al.*, 2021). Estos tipos de trabajos que evalúan compuestos desconocidos suelen estar limitados, ya que la dosis y la actividad final pueden diferir de un caso *in vivo*, ya que algunos compuestos pueden necesitar ser metabolizados a su forma activa por el animal (Xie *et al.*, 1991).

Es bien sabido por los parasitólogos en este campo, que los cultivos de oocistos pierden su viabilidad después de un almacenamiento prolongado a 4°C durante más de 65 días (Long, 1970). Los oocistos contienen una fuente de energía de polisacárido "amilopectina" la cual es necesaria para que se lleve a cabo la esporulación y supervivencia de los esporozoítos (Ryley *et al.*, 1969). Por otro lado, la desaparición de carbohidratos que permiten la esporulación de *E. acervulina* también estará relacionada con la cantidad de oxígeno presente en el medio, pues Wilson & Fairbairn (1961), observaron que después del almacenamiento de *E. acervulina* durante 34 días a 4°C las frecuencias respiratorias disminuyeron considerablemente y solo esporuló el 56% de oocistos. Augustine (1980) y Nakai & Ogimoto (1983), observaron que la disminución del contenido de amilopectina y la producción de oocistos estuvo relacionada estrechamente con el tiempo y temperatura de almacenamiento. Por otra parte, Busing *et al.* (2013), observaron en puercos mini a los que se les suplementó AH en la dieta, que estos

aparecieron en distintos tejidos como el intestinal, urinario, vejiga y tráquea, lo que sugiere que estos AH fueron captados por células M, para ser presentados a las células inmunes y después transportados a linfonodos y distribuidos vía linfa y sangre a dichos tejidos. Con base en estas observaciones previas y los resultados obtenidos en el presente estudio, podemos proponer que el largo período de almacenamiento a 4°C al que estuvieron sujetos los oocistos de *E. acervulina* pudo intervenir con los requerimientos necesarios de energía para la formación de esporocistos, esto por la disminución de las reservas de amilopectina a causa del envejecimiento (Vetterling & Doran, 1969). Lo cual pudo intervenir en la viabilidad de estos, para que no esporularan. Otra alternativa, es que los AH no tengan una acción directa sobre este parásito en específico, si no que tengan un efecto sobre las células inmunitarias del cuerpo como el caso de las células M. las cuales son las principales activadoras de IgA- producidas por células B. según (Knoop *et al.*, 2013). Tal como en el caso de los cerdos mini.

Basado en la excreción de oocistos pudimos aseverar que la vacunación con *Eimeria* spp. fue exitosa, ya que el patrón de oocistos/g de excretas fue similar al reportado por Elmusharaf *et al.* (2007), quienes informaron que la dosis de infección inicial fue baja y similar a la de una vacuna no atenuada por el tipo de cepas. No obstante, en ambos experimentos *in vivo* no se observaron efectos en el rendimiento y esto puede adjudicarse a una levedad en la infección con *Eimeria* spp. ya que en casos reportados con infecciones más graves por *Eimeria* spp. se ha visto reducido el aumento de peso (Johnson & Reid, 1970; Conway *et al.*, 1993), debido a las lesiones generadas en el intestino que ocasionan una pérdida de proteína y lípidos plasmáticos y a su vez una deficiencia en la absorción de nutrientes exógenos, así como una pérdida de líquidos y electrolitos (Allen, 1988; Chapman *et al.*, 1982). Curiosamente en los pollos tratados en este experimento se observó una mejoría numérica en dichos parámetros productivos, lo cual podría contrastar con lo observado por (Taklimi *et al.*, 2012; Eren *et al.*, 2000); quienes reportaron una mejoría en el comportamiento productivo en aves suplementadas con SH en la dieta en un periodo de 42 días.

Ott *et al.* (2018), reportaron que con un inóculo de oocistos esporulados de *Eimeria* spp en pollos de engorda, no encontraron diferencias significativas sobre el rendimiento

del crecimiento entre los tratamientos y si un número similar de oocistos excretados al de este experimento. Shirley & Bedrník (1997), inocularon un grupo de pollos de engorda con 100 oocistos de una cepa parental de *E. maxima* e inocularon otro grupo con una cepa atenuada con la misma especie de *Eimeria*, dos semanas después inocularon a ambos grupos con 500 oocistos de la cepa parental obteniendo una reproducción de oocistos / g de heces mucho mayor en el primer grupo inoculado con la cepa salvaje, el segundo grupo inoculado con la cepa atenuada tuvo un número de oocistos/g de heces similar a los encontrados en este experimento.

William, 1973 y William, 2001 inocularon pollos de engorda con diferentes dosis de oocistos esporulados de *Eimeria* spp para medir la reproductividad de estos mediante conteo de oocistos en excretas y ciego. Con esto pudo observar hacinamientos de oocistos en el epitelio en aquellos pollos cuyo inoculo de oocistos habían sido mayores. Por lo tanto, se puede deducir que al haber inducido una baja tasa de infección, hubo una mayor tasa reproductiva de oocistos a causa de que no hubo un efecto de hacinamiento, lo cual se traduce como la disponibilidad de las células para parasitar (Brackett & Bliznick, 1952). En referencia a los picos de excreción de oocistos que alcanzaron los dos experimentos Chapman *et al.* (2005), reportaron que la vacunación en el primer día de vida de los pollitos, causaría infecciones por goteo, lo cual explicaría los dos picos de excreción de oocistos observados en el presente estudio y una disminución en el segundo de ellos, lo cual corresponde a una generación de inmunidad protectora (Price, 2012). Las aves infectadas tratadas con SH en la dieta, numéricamente mostraron una disminución en la excreción de oocistos en comparación con los grupos inoculados y tratados con coccidiostato y los infectados no tratados en ambos experimentos. Esta reducción de oocistos inducida por SH indica que podrían tener actividad anticoccidial, o bien, como lo informaron otros investigadores (Pelicano *et al.*, 2005; Rodríguez-Gonzales *et al.*, 2017), los SH también tienen un efecto en aumentar la profundidad de las criptas y el largo de las vellosidades. Para que esto ocurra se necesita una disminución del pH y reducción de sustancias tóxicas como metales pesados, amoníaco, etc.; por lo que los SH poseen propiedades que permiten mantener estas condiciones en el tracto gastrointestinal, tal como lo demostraron Yasar *et al.* (2002) y Taklimi *et al.* (2012). Sin embargo, hace falta

hacer más experimentos para poder reducir la variabilidad en la excreción de oocistos/g de heces obtenida en este trabajo.

Generalmente en las infecciones graves por *Eimeria* existe una reducción en el peso de los pollos tal como lo reportaron algunos investigadores (Chapman *et al.*, 2004; Leung *et al.*, 2019; Pop *et al.*, 2019); o al igual que lo reportado por Lavery *et al.* (2020), quienes inocularon una dosis mixta de 10,000 oocistos esporulados de *E. maxima* con un 4% de *E. acervulina* de tipo salvaje, lo que las hace más virulentas debido a que las infecciones pueden no ocurrir al mismo tiempo en la parvada (dependiendo el método de vacunación, como aplicarla en el agua de bebida) y esto conlleva a que aves susceptibles ingieran una gran cantidad de oocistos de la cama, lo que ocasiona enfermedad severa y pérdida de peso (Shirley & Bedrník, 1997). Esta disminución en el rendimiento en aves desafiadas con un alto número de oocistos se debe a una absorción reducida de los nutrientes de la dieta en el intestino debido a las lesiones, lo que conlleva a una reducción en la ganancia de peso y en la eficiencia de la conversión alimenticia de las aves (Williams, 1999; Johnson & Reid 1970). Curiosamente en este experimento en lo que refiere a peso final y ganancia de peso el grupo A. desafiado a *Eimeria* spp, tratado con coccidiostato y el grupo B. control negativo, desafiado no tratado, fueron numéricamente más bajos que el grupo C. desafiado, tratado con SH. Mientras que los valores de consumo de alimento y conversión alimenticia fueron numéricamente más bajos para este último grupo C. Sin embargo, los valores de estos tres grupos no tuvieron una diferencia estadísticamente significativa. Este ligero incremento de peso se puede relacionar con las propiedades ya reportadas en varios trabajos (Islam *et al.*, 2005; Ji *et al.*, 2006; Huck *et al.*, 1991; Schepetkin *et al.*, 2003); como la estimulación de la microbiota, inhibición de bacterias patógenas, adsorción a micotoxinas, la inhibición de la ureasa y reducción de los niveles de amoníaco. Adicionalmente esto se ha visto en estudios con cerdos, en donde niveles de amoníaco superiores a 50 ppm reducen el crecimiento (Drummond *et al.*, 1978). Por otro lado, Maguey-Gonzales *et al.* (2018), informaron que las SH estabilizan la microbiota intestinal, esto gracias a su capacidad para crear capas por encima de la membrana mucosa del epitelio del tracto digestivo, lo cual actuará en contra de la penetración de antígenos o patógenos lo que mejorará la digestibilidad de nutrientes en los animales (Islam *et al.*, 2005; Aksu & Bozkurt, 2009).

Los resultados obtenidos de este trabajo de investigación nos indican que tanto el desafío controlado como el desafío natural a *Eimeria* spp. no influenciaron los valores de rendimiento tanto como en otros estudios previos, así, como la suplementación de SH no afectó estadísticamente de manera positiva el rendimiento de los pollos de engorda. Muy contrario a lo reportado por Ozturk *et al.* (2010), quienes emplearon un líquido de SH en el agua de bebida para sus grupos experimentales mixtos (machos y hembras), cuya dosis al 1% fue la mejor evaluada en cuanto a ganancia de peso, consumo y conversión alimenticia. Similarmente Taklimi *et al.* (2012) compararon el efecto de tres dosis de SH y tres dosis de glucomanano esterificado adicionados en dietas de siete grupos mixtos de pollos de engorda con los valores de rendimiento, con lo que se obtuvo una mejora en dichos valores (ganancia de peso, ingesta de alimento y conversión alimenticia) con la dosis más alta (0.3%) de SH en comparación al resto de tratamientos. Estos resultados de mejoría con SH los observaron del día cero al día 42, observándose las mayores mejoras en el rendimiento a partir del día 21 en adelante. Muy similar a lo reportado por TeraVita (2004) y Eren *et al.* (2000). Por otra parte Kocabağlı *et al.* (2002), en un experimento con pollos de engorda de cero a 21 días de edad a los que se les administraron humatos, no encontraron diferencias estadísticamente distintas en valores de rendimiento, pero del día 22 a 42 hubo mejoras en la conversión en comparación al grupo control. Resultados similares en el desempeño fueron los obtenidos por Esenbuga *et al.* (2008), quienes no encontraron diferencias estadísticas. Similarmente Maguey – González *et al.* (2016), tampoco obtuvieron efectos sobre el comportamiento productivo en pollos de engorda al igual que Maysa & Sheikh (2008), sobre la ganancia de peso en gallina de postura.

Estas diferencias en el rendimiento causadas por la suplementación de SH a comparación de lo observado en la literatura, pueden deberse a una variedad de factores que alterarían la eficacia de las SH, como las cepas de los parásitos utilizadas, la dosis y composición de las SH, así como las distintas fuentes de SH, o el estado y la edad de los mismos pollos al no haberse tratado hasta los 42 días como estudios previos.

Por lo tanto, es importante realizar trabajos futuros con mayor rango de tiempo experimental que evalúen el efecto del extracto de SH sobre la excreción de oocistos e

indicadores productivos desde el día cero hasta el día 42. Además, se tiene que tener un mayor número de animales en los grupos experimentales para reducir la variabilidad y poder determinar si las SH pueden tener un impacto positivo en contra de los desafíos con *Eimeria* spp.

## IX. Conclusiones

En el presente experimento, se logró desarrollar un sistema *in vitro* para inducir la esporulación de oocistos de *Eimeria acervulina*, sin embargo, las dosis del extracto de SH utilizadas para inhibir la esporulación de los oocistos de *E. acervulina* no tuvieron el efecto esperado en ninguna de las repeticiones llevadas a cabo.

Los resultados de la parte *in vivo* nos muestran que al desafiar de manera controlada y de manera natural a pollos de engorda de la raza Ross con *Eimeria* spp. y administrarles una dieta con el extracto de SH, no presentaron diferencias estadísticas en cuanto a las variables productivas en comparación a las dietas con el tratamiento control positivo con coccidiostato y control negativo sin coccidiostato, por lo que no se pudo afirmar que al extracto de SH tengan potencial como coccidiostato.

Finalmente no hubo diferencia estadística en la excreción de oocistos/g de excretas entre los pollos con el tratamiento de SH y los demás tratamientos por una alta variabilidad.

Este fue uno de los primeros estudios enfocado en los efectos de las SH en un reto en la inhibición de la esporulación de *E. acervulina* de manera *in vitro* y en la disminución de oocistos/g de excreta de manera *in vivo*. Hace falta más investigación para determinar los mecanismos de acción y los efectos de las SH, pues a la fecha no se han caracterizado, por lo que se necesitará realizar más experimentos de mayor duración y mayor número de repeticiones para tener resultados más precisos.

## IX. Referencias

- Abbas, A., Iqbal, Z., Abbas, R. Z., Khan, M. K., & Khan, J. A. (2015). *In-vitro* anticoccidial potential of *Saccharum officinarum* extract against *Eimeria* oocysts. *Boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 14(6), 456-461.
- AGRARIO, B. (1987). Manual de instrucciones para lombricultura. *Dpto. de Divulgación Técnica. Lima-Perú* pág, 44.
- Ahmad, T. A., El-Sayed, B. A., & El-Sayed, L. H. (2016). Development of immunization trials against *Eimeria* spp. *Trials Vaccinol.* 5, 38-47.
- Akbari, M. K. R., Lu, Z., Thanabalan, A., Leung, H., Mohammadigheisar, M., & Kiarie, E. (2018). *Eimeria* challenge adversely affected long bone attributes linked to increased resorption in 14-day-old broiler chickens. *Poult. Sci.* 98(4), 1615-1621.
- Aksu, T., & Bozkurt, S. A. (2009). Effect of dietary essential oils and/or humic acids on broiler performance, microbial population of intestinal content and antibody titres in the summer season. *Vet. Fak. Derg.* 15(2), 185-190.
- Allen, P. C. (1988). The effect of *Eimeria acervulina* infection on plasma lipids and lipoproteins in young broiler chicks. *Vet. Parasitol.* 30(1), 17-30.
- Applegate, T. J., & Lilburn, M. S. (2002). Growth of the femur and tibia of a commercial broiler line. *Poult. Sci.* 81(9), 1289-1294.
- Apata, D. F. (2009). Antibiotic resistance in poultry. *Int. J. Poult. Sci.* 8(4), 404-408. <https://doi.org/10.3923/ijps.2009.404.408>
- Augustine, P. C. (1980). Effects of storage time and temperature on amylopectin levels and oocyst production of *Eimeria meleagridis* oocysts. *Parasitol.* 81(3), 519-524.
- Beck, B. E., & Harries, W. N. (1979). The diagnosis of monensin toxicosis: A report on outbreaks in horses, cattle and chickens. In *Proceedings of annual meeting- American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. J. Vet. Diagn. Invest. (USA)*.
- Belli, S. I., Smith, N. C., & Ferguson, D. J. (2006). The coccidian oocyst: a tough nut to crack! *Trends Parasitol.* 22(9), 416-423.
- Blake, D. P. (2015). *Eimeria* genomics: where are we now and where are we going?. *Vet. Parasitol.* 212(1-2), 68-74.
- Blake, D. P., & Tomley, F. M. (2014). Securing poultry production from the ever-present *Eimeria* challenge. *Trends Parasitol.* 30(1), 12-19.

- Brackett, S., & Bliznick, A. (1952). The reproductive potential of five species of coccidia of the chicken as demonstrated by oocyst production. *J. Parasitol.* 38(2), 133-139.
- Brzozowski, T., Dembiński, A., & Konturek, S. (1994). Influence of Tolpa Peat Preparation on gastroprotection and on gastric and duodenal ulcers. *Acta. Pol. Pharm.* 51(1), 103-107.
- Burrell, A., Tomley, F. M., Vaughan, S., & Marugan-Hernandez, V. (2020). Life cycle stages, specific organelles and invasion mechanisms of *Eimeria* species. *Parasitol.* 147(3), 263-278.
- Burt, S. A., Tersteeg-Zijderveld, M. H. G., Jongerius-Gortemaker, B. G. M., Vervelde, L., & Vernooij, J. C. M. (2013). *In vitro* inhibition of *Eimeria tenella* invasion of epithelial cells by phytochemicals. *Vet. Parasitol.* 191(3-4), 374-378.
- Cagno, V., Donalisio, M., Civra, A., Cagliero, C., Rubiolo, P., & Lembo, D. (2015). *In vitro* evaluation of the antiviral properties of Shilajit and investigation of its mechanisms of action. *J. Ethnopharmacol.* 166, 129-134.
- Canales-Serrano, J.N. (2019). Recomendaciones en el tratamiento de Coccidiosis en aves. Adaptado de <https://www.avicultura.mx/destacado/Recomendaciones-en-el-tratamiento-de-Coccidiosis-en-aves>)
- Chaudhari, A. A., Lee, Y., & Lillehoj, H. S. (2020). Beneficial effects of dietary supplementation of *Bacillus* strains on growth performance and gut health in chickens with mixed coccidiosis infection. *Vet. Parasitol.* 277, 109009.
- Chapman, H. D. (2003). Origins of coccidiosis research in the fowl—the first fifty years. *Avian. Dis.* 47(1), 1-20.
- Chapman, H. D., Fernandes, D. L., & Davison, T. F. (1982). A comparison of the effects of infection with *Eimeria maxima* and dietary restriction on weight gain, plasma metabolites and liver glycogen in the immature fowl, *Gallus domesticus*. *Parasitol.* 84(2), 205-213.
- Chapman, H. D., Jeffers, T. K., & Williams, R. B. (2010). Forty years of monensin for the control of coccidiosis in poultry. *Poult. Sci.* 89(9), 1788-1801.
- Chapman, H. D., Marsler, P., & LaVorgna, M. W. (2004). The effects of salinomycin and roxarsone on the performance of broilers when included in the feed for four, five, or six weeks and infected with *Eimeria* species during the starter or grower phase of production. *Poult. Sci.* 83(5), 761-764.
- Chapman, H. D., Matsler, P. L., Muthavarapu, V. K., & Chapman, M. E. (2005). Acquisition of immunity to *Eimeria maxima* in newly hatched chickens given 100 oocysts. *Avian. Dis.* 49(3), 426-429.

- Chonan, O., Matsumoto, K., & Watanuki, M. (1995). Effect of galactooligosaccharides on calcium absorption and preventing bone loss in ovariectomized rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59(2), 236-239.
- Conway, D. P., Sasai, K., Gaafar, S. M., & Smothers, C. D. (1993). Effects of different levels of oocyst inocula of *Eimeria acervulina*, *E. tenella*, and *E. maxima* on plasma constituents, packed cell volume, lesion scores, and performance in chickens. *Avian. Dis.* 118-123.
- Cozzi, R., Nicolai, M., Perticone, P., De Salvia, R., & Spuntarelli, F. (1993). Desmutagenic activity of natural humic acids: inhibition of mitomycin C and maleic hydrazide mutagenicity. *Mutat. Res. Genet. Toxicol.* 299(1), 37-44.
- Dalloul, R. A., & Lillehoj, H. S. (2006). Poultry coccidiosis: recent advancements in control measures and vaccine development. *Expert. Rev. vaccines.* 5(1), 143-163.
- de Groot, A. C., & Schmidt, E. (2016). Essential oils, part III: chemical composition. *Dermatitis*, 27(4), 161-169.
- del Cacho Malo, E., & Bosch, M. P. (2014). Coccidiosis: La enfermedad, consecuencias y tratamiento: Patología. *Selecciones avícolas*, 56(2), 13-17.
- Dibner, J. J., & Richards, J. D. (2005). Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poult. Sci.* 84(4), 634-643.
- Domínguez-Negrete, A., Gómez-Rosales, S., Angeles, M. D. L., López-Hernández, L. H., Reis-de Souza, T. C., López-García, Y., ... & Téllez-Isaias, G. (2019). Effect of the addition of humic substances as growth promoter in broiler chickens under two feeding regimens. *Anim.* 9(12), 1101.
- Donoghue, DJ (2003). Antibiotic residues in poultry tissues and eggs: Human health concerns? *Poult. Sci.* 82: 618–621
- Dowling, L. (1992). Ionophore toxicity in chickens: a review of pathology and diagnosis. *Avian. Pathol.* 21(3), 355-368.
- Drummond, J. G., Curtis, S. E., & Simon, J. (1978). Effects of atmospheric ammonia on pulmonary bacterial clearance in the young pig. *Ame. J. Vet. Res.* 39(2), 211-212.
- Edgar, S. A. (1955). Sporulation of oocysts at specific temperatures and notes on the prepatent period of several species of avian coccidia. *J. Parasitol* 41(2), 214-216.
- Edmonds, M. S., Johal, S., & Moreland, S. (2014). Effect of supplemental humic and butyric acid on performance and mortality in broilers raised under various environmental conditions. *J. Appl. Poult. Res.* 23(2), 260-267.

- Elmusharaf, M. A., Peek, H. W., Nollet, L., & Beynen, A. C. (2007). The effect of an in-feed mannanoligosaccharide preparation (MOS) on a coccidiosis infection in broilers. *Anim. Feed Sci. Technol.* 134(3-4), 347-354.
- EMEA. 1999. Committee for Veterinary Medical Products. Humic acids and their sodium salts, summary report. Committee for Veterinary Medicinal Products. [Accessed April 29, 2014]; Eur. Agency Eval. Med. Prod. 1999 [https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/humic-acids-their-sodium-salts-summary-report-committee-veterinary-medicinal-products\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/humic-acids-their-sodium-salts-summary-report-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf) consultado el [10/11/2019]
- Eren, M., G. Deniz, S.S. Gezen and I.İ. Türkmen, 2000. Broyler yemlerine katılan humatların besi performansı, serum mineral konsantrasyonu ve kemik külü üzerine etkileri. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 47: 255-263. Cited by: Islam, K. M. S., Schuhmacher, A., & Gropp, J. M. (2005). Humic acid substances in animal agriculture. *Pak. J. Nutr.* 4(3), 126-134.
- Esenbuğa, N., Macit, M., Karaoglu, M., Aksu, M. I., & Bilgin, O. C. (2008). Effects of dietary humate supplementation to broilers on performance, slaughter, carcass and meat colour. *J. Sci. Food Agric.* 88(7), 1201-1207.
- EUR-lex (2003). Reglamento (CE) N° 1831/2003 del parlamento europeo y del consejo de 22 de septiembre de 2003 sobre los aditivos destinados a la alimentación animal. Disponible en [EUR-Lex - 32003R1831 - ES - EUR-Lex \(europa.eu\)](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ.do?uri=CELEX:32003R1831-ES). Consultado el [19/09/2019].
- Falony, G., Lazidou, K., Verschaeren, A., Weckx, S., Maes, D., & De Vuyst, L. (2009). *In vitro* kinetic analysis of fermentation of prebiotic inulin-type fructans by *Bifidobacterium* species reveals four different phenotypes. *Appl. Env. Microbiol.* 75(2), 454-461.
- FAO (2018) Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Obtenido de <https://www.fao.org/3/i9540es/i9540ES.pdf>
- Felici, M., Tugnoli, B., Piva, A., & Grilli, E. (2021). *In Vitro* Assessment of Anticoccidials: Methods and Molecules. *Anim.* 11(7), 1962.
- Ferguson, D. J. P., Belli, S. I., Smith, N. C., & Wallach, M. G. (2003). The development of the macrogamete and oocyst wall in *Eimeria maxima*: immuno-light and electron microscopy. *Int. J. Parasitol.* 33(12), 1329-1340.
- Fleming, R. H. (2008). Nutritional factors affecting poultry bone health: Symposium on 'Diet and bone health'. *Proc. Nutr. Soc.* 67(2), 177-183.

- Fooks, L. J., & Gibson, G. R. (2002). *In vitro* investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiology Ecology*, 39(1), 67-75.
- Gadelhaq, S. M., Arafa, W. M., & Abolhadid, S. M. (2018). In vitro activity of natural and chemical products on sporulation of *Eimeria* species oocysts of chickens. *Vet. Parasitol.* 251, 12-16.
- Ganguly, N. K., Bhattacharya, S. K., Sesikeran, B., Nair, G. B., Ramakrishna, B. S., Sachdev, H. P. S., & Katoch, V. M. (2011). ICMR-DBT guidelines for evaluation of probiotics in food. *Indian. J. Med. Res.* 134(1), 22.
- Gauthier, R. (2002). La Salud intestinal: clave de la productividad (El caso de los ácidos orgánicos). *Precongreso Científico Avícola IASA, XXVII Convención ANECA-WPDC. Puerto Vallarta, Jal. México, Anais eletrônicos.* Disponible en: <http://www.engormix.com/MA-avicultura/nutricion/articulos/salud-intestinal-claveproductividad-t518/p0.htm>
- GHOLAMREZAIE, S. L., Mohammadi, M., Jalali, S. J., Abolghasemi, S. A., & Roostaei, A. M. (2013). Extract and leaf powder effect of *Artemisia annua* on performance, cellular and humoral immunity in broilers. *Iran. J. Vet. Res.* 1 (42),15 -20.
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14(8), 491-502.
- Godwin, R. M., & Morgan, J. A. (2015). A molecular survey of *Eimeria* in chickens across Australia. *Vet. Parasitol.* 214(1-2), 16-21.
- Guía de manejo de pollo Ross. (2002). Disponible en: <http://comunidad.uach.mx/fsalvado/ROSS-MANUAL%20DE%20MANEJO%20POLLO%20ENGORDA.pdf>
- Habibi, H., Firouzi, S., Nili, H., Razavi, M., Asadi, S. L., & Daneshi, S. (2014). Anticoccidial effects of herbal extracts on *Eimeria tenella* infection in broiler chickens: *in vitro* and *in vivo* study. *J. Parasit. Dis.* 40(2), 401-407.
- Hofmann, J., & Raether, W. (1990). Improved techniques for the *in vitro* cultivation of *Eimeria tenella* in primary chick kidney cells. *Parasitol. Res.* 76(6), 479-486.
- Horky, P., Skalickova, S., Smerkova, K., & Skladanka, J. (2019). Essential oils as a feed additives: pharmacokinetics and potential toxicity in monogastric animals. *Anim*, 9(6), 352.
- Huck, T. A., Porter, N., & Bushell, M. E. (1991). Effect of humates on microbial activity Gen. Citado por: Arif, M., Alagawany, M., Abd El-Hack, M. E., Saeed, M., Arain, M.

- A., & Elnesr, S. S. (2019). Humic acid as a feed additive in poultry diets: a review. *Iran. J. Vet. Res.* 20(3), 167.
- Islam, K. M. S., Schuhmacher, A., & Gropp, J. M. (2005). Humic acid substances in animal agriculture. *Pak. J. Nutr.* 4(3), 126-134.
- Islam, S. U. (2016). Clinical uses of probiotics. *Med.* 95(5).
- Jenkins, M., Allen, P., Wilkins, G., Klopp, S., & Miska, K. (2008). *Eimeria praecox* infection ameliorates effects of *Eimeria maxima* infection in chickens. *Vet. Parasitol.* 155(1-2), 10-14.
- Jeurissen, S. H. M., Janse, E. M., Vermeulen, A. N., & Vervelde, L. (1996). *Eimeria tenella* infections in chickens: aspects of host-parasite: interaction. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 54(1-4), 231-238.
- Ji, F., McGlone, J. J., & Kim, S. W. (2006). Effects of dietary humic substances on pig growth performance, carcass characteristics, and ammonia emission. *J. Anim. Sci.* 84(9), 2482-2490.
- Jitviriyanon, S., Phanthong, P., Lomarat, P., Bunyapraphatsara, N., Porntrakulpipat, S., & Paraksa, N. (2016). *In vitro* study of anti-coccidial activity of essential oils from indigenous plants against *Eimeria tenella*. *Vet. Parasitol.* 228, 96-102.
- Johnson, J., & Reid, W. M. (1970). Lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Exp. Parasitol.* 28, 30-36.
- Joyner, L. P. (1978). The identification and diagnosis of avian coccidiosis. *Avian Coccidiosis*, 29-49.
- Kasubuchi, M., Hasegawa, S., Hiramatsu, T., Ichimura, A., & Kimura, I. (2015). Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation. *Nutr.* 7(4), 2839-2849.
- Kheysin, Y. M. (1972). Chapter V. Sporulation of oocysts and their survival in the external environment. *Life cycles of coccidia of domestic animals*. KS Todd Jr., ed. University Park Press, London, UK, 149-177.
- Klöcking, R., & Helbig, B. (1991). Interaction of humic acids and humic-acid-like polymers with herpes simplex virus type 1. In *Humic Substances in the Aquatic and Terrestrial Environment* (pp. 407-412). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Klöcking, R., & Sprössig, M. (1972). Antiviral properties of humic acids. *Experientia*, 28(5), 607-608.
- Kocabağlı, N., Alp, M., Acar, N., & Kahraman, R. (2002). The effects of dietary humate supplementation on broiler growth and carcass yield. *Poult. Sci.* 81(2), 227-230.

- Kodama, H. (2007). Antitumor effect of humus extract on murine transplantable L1210 leukemia. *J. Vet. Med. Sci.* 69(10), 1069-1071.
- Kodama, H., Okazaki, F., & Ishida, S. (2008). Protective effect of humus extract against *Trypanosoma brucei* infection in mice. *J. Vet. Med. Sci.* 70(11), 1185-1190.
- Lal, K., Bromley, E., Oakes, R., Prieto, J. H., Sanderson, S. J., Kurian, D., & Tomley, F. M. (2009). Proteomic comparison of four *Eimeria tenella* life-cycle stages: Unsporulated oocyst, sporulated oocyst, sporozoite and second-generation merozoite. *Proteomics.* 9(19), 4566-4576.
- Laverty, L., Señas-Cuesta, R., Martínez-González, S., Selby, C., Tellez Jr, G., Hernandez-Velasco, X., & Graham, D. (2020). Evaluación del desprendimiento de oocistos de *Eimeria maxima* y *Eimeria acervulina* en pollos de engorde. *Abanico veterinario*, 10.
- Leung, H., Yitbarek, A., Snyder, R., Patterson, R., Barta, J. R., Karrow, N., & Kiarie, E. (2019). Responses of broiler chickens to *Eimeria* challenge when fed a nucleotide-rich yeast extract. *Poult. Sci.* 98(4), 1622-1633.
- Long, PL (1970). Estudios de viabilidad de esporozoitos de *Eimeria tenella*. *Zeitschrift für Parasitenkunde* , 35 (1), 1-6.
- Lotosh, T. D. (1991). Experimental bases and prospects for the use of humic acid preparations from peat in medicine and agricultural production. In *Nauchnye doklady vysshei shkoly. Biologicheskie nauki* (No. 10, pp. 99-103). citado por: Peña-Méndez, E. M., Havel, J., & Patočka, J. (2005). Humic substances—compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. *J. Appl. Biomed.* 3(1), 13-24.
- MacCarthy, P., Peterson, M. J., Malcolm, R. L., & Thurman, E. M. (1979). Separation of humic substances by pH gradient desorption from a hydrophobic resin. *Anal. Chem.* 51(12), 2041-2043.
- Maguey-González, J. A, Gómez, S. & M.L. Ángeles (2016). Inclusión de un lixiviado de lombriz pasteurizado en el agua de bebida de pollos de engorda. Disponible en <https://avem.mx/memorias2016.pdf>. Consultado el [20/11 2021].
- Maguey-González, J. A., Michel, M. A., Baxter, M. F., Tellez Jr, G., Moore Jr, P. A., Solis-Cruz, B., & Tellez-Isaias, G. (2018). Effect of humic acids on intestinal viscosity, leaky gut and ammonia excretion in a 24 hr feed restriction model to induce intestinal permeability in broiler chickens. *Anim. Sci. J.* 89(7), 1002-1010.
- Mai, K., Sharman, P. A., Walker, R. A., Katrib, M., Souza, D. D., McConville, M. J., & Smith, N. C. (2009). Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(2), 281-289.
- Mathis, G., Schaeffer, J., Cookson, K., Dickson, J., LaVorgna, M., & Waldrip, D. (2014). Effect of lasalocid or salinomycin administration on performance and immunity

- following coccidia vaccination of commercial broilers. *J. Appl. Poult. Res.* 23(4), 577-585.
- Maysa, H., & Sheikh, A. (2008). The effect of dietary Humic Acid supplementation on some productive and physiological traits of laying hens. *Egypt. Poult. Sci.* 28(4), 1043-1058.
- Mc Dougald, L. R., & Mc Quiston, T. E. (1980). Compensatory growth in broilers after withdrawal of ionophorous anticoccidial drugs. *Poult. Sci.* 59(5), 1001-1005.
- Meinelt, T., Schreckenbach, K., Pietrock, M., Heidrich, S., & Steinberg, C. E. (2007). Humic substances. Part 1: Dissolved humic substances (HS) in aquaculture and ornamental fish breeding. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 15(1), 17-22.
- Mirza, M. A. (2018). Future of humic substances as pharmaceutical excipient. *Pharma Sci. Anal. Res. J.* 1, 180004.
- Molan, A. L., Liu, Z., & De, S. (2009). Effect of pine bark (*Pinus radiata*) extracts on sporulation of coccidian oocysts. *Folia Parasitol. (Praha)*, 56(1), 1.
- Moore, P. R., A. Evenson, T. D. Luckey, E. McCoy, E. A. Elvehjem, and E. B. Hart. (1946). Use of sulfasuxidine, streptothricin, and streptomycin in nutritional studies with the chick. *J. Biol. Chem.* 165(2), 437-441.
- Morris, G. M., Woods, W. G., Richards, D. G., & Gasser, R. B. (2007). Investigating a persistent coccidiosis problem on a commercial broiler-breeder farm utilising PCR-coupled capillary electrophoresis. *Parasitol. Res.* 101(3), 583-589.
- Mottet, A. y Tempio, G. (2017). Producción avícola mundial: estado actual y perspectivas y desafíos futuros. *Revista mundial de ciencias avícolas* , 73 (2), 245-256.
- Nakai, Y. and Ogimoto, K. (1983~). Amylopectin synthesis of the sporozoite of *Eimeria tenella*. *Jpn. J. Vet. Sci.* 45, 673-677.
- Nakayama, T., Sonoda, S., Urano, T., Yamada, T., & Okada, M. (1993). Monitoring both serum amyloid protein A and C-reactive protein as inflammatory markers in infectious diseases. *Clin. Chem.* 39(2), 293-297.
- Najafian, S. (2014). Storage conditions affect the essential oil composition of cultivated Balm Mint Herb (Lamiaceae) in Iran. *Ind. Crops. Prod.* 52, 575-581.
- OMS. (1997). Organización Mundial de la Salud. The medical impact of the use of antimicrobial in food animals. Berlín, Germany, 13-17 October. Obtenido de: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/64439/WHO EMC\\_ZOO\\_97.4.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/64439/WHO EMC_ZOO_97.4.pdf?sequence=1) Consultado el [10/09/2019]

- Ott, C. P., Omara, I. I., Persia, M. E., & Dalloul, R. A. (2018). The impact of  $\beta$ -glucans on performance and response of broiler chickens during a coccidiosis challenge. *Poult. Sci.* 97(8), 2713-2721.
- Ozturk, E., Ocak, N., Coskun, I., Turhan, S., & Erener, G. (2010). Effects of humic substances supplementation provided through drinking water on performance, carcass traits and meat quality of broilers. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 94(1), 78-85.
- Palacios, M. (2009). Uso de anticoccidiales y promotores de crecimiento en el desarrollo de la salud intestinal del broiler. *Recuperado a partir de [http://ameveaecuador.org/web\\_antigua/datos/USO% 20DE% 20ANTICOCIDIALES% 20Y% 20PROMOTORES% 20DE% 20CRECIMIENTO% 20EN% 20EL. pdf](http://ameveaecuador.org/web_antigua/datos/USO%20DE%20ANTICOCIDIALES%20Y%20PROMOTORES%20DE%20CRECIMIENTO%20EN%20EL.pdf)*.
- Peek, H. W., & Landman, W. J. M. (2003). Resistance to anticoccidial drugs of Dutch avian *Eimeria* spp. field isolates originating from 1996, 1999 and 2001. *Avian Pathol.* 32(4), 391-401.
- Peek, H. W., & Landman, W. J. M. (2011). Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. *Vet. Q.* 31(3), 143-161.
- Pelicano, E. R. L., Souza, P. A., Souza, H. B. A., Figueiredo, D. F., Boiago, M. M., Carvalho, S. R., & Bordon, V. F. (2005). Intestinal mucosa development in broiler chickens fed natural growth promoters. *Braz. J. Poult. Sci.* 7, 221-229.
- Peña-Méndez, E. M., Havel, J., & Patočka, J. (2005). Humic substances—compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. *J. Appl. Biomed.* 3(1), 13-24.
- Pflug, W., & Ziechmann, W. (1982). Humic acids and the disruption of bacterial cell walls by lysozyme. *Soil. Biol. Biochem.*
- Pop, L. M., Varga, E., Coroian, M., Nedişan, M. E., Mircean, V., Dumitrache, M. O., & Györke, A. (2019). Efficacy of a commercial herbal formula in chicken experimental coccidiosis. *Parasites vectors.* 12(1), 1-9.
- Price, K. R. (2012). Use of live vaccines for coccidiosis control in replacement layer pullets. *J. Appl. Poult. Res.* 21(3), 679-692.
- Quiroz-Castañeda, R. E., & Dantán-González, E. (2015). Control of avian coccidiosis: future and present natural alternatives. *Biomed. Res. Int.* 2015.
- Rath, N. C., Huff, W. E., & Huff, G. R. (2006). Effects of humic acid on broiler chickens. *Poult. Sci.* 85(3), 410-414.
- Rath, N., Huff, W. Huff., & J. Balog. 2000. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. *Poult. Sci.* 79:1024–1032.

- Rege, A. A., Ambaye, R. Y., & Deshmukh, R. A. (2012). Evaluation of *in vitro* inhibitory effect of selected plants and Shilajit on HIV-reverse transcriptase. *Indian. J. Nat. Prod. Resour.* (3), 145-151
- Reid, W. M., & Long, P. L. (1979). Diagnostic chart for nine species of fowl coccidia. Citado por (Graat *et al.*, 1993).
- Remmal, A., Achahbar, S., Bouddine, L., Chami, N., & Chami, F. (2011). *In vitro* destruction of *Eimeria* oocysts by essential oils. *Vet. Parasitol.* 182(2-4), 121-126.
- Reyna, P. S., McDougald, L. R., & Mathis, G. F. (1983). Survival of coccidia in poultry litter and reservoirs of infection. *Avian Diseases*, 464-473.
- Ríos, O., & Calle, C. (1991). Humus de lombricultura y su efecto en el rendimiento de *Cucumis sativus*, *Capsicum annum* y *Vigna sinensis* en un ultisol degradado de Pucallpa. *Folia Amazónica*, 6(1-2), 47-59.
- Rivière, A., Selak, M., Geirnaert, A., Van den Abbeele, P., & De Vuyst, L. (2018). Complementary mechanisms for degradation of inulin-type fructans and arabinoxylan oligosaccharides among bifidobacterial strains suggest bacterial cooperation. *Applied and environmental microbiology*, 84(9), e02893-17.
- Rodríguez-González, S., Torres-Vidales, G., Hortúa-López, L., & Madrigal, K. (2017). Evaluación del desarrollo morfométrico duodenal y los parámetros zootécnicos al suministrar diferentes porcentajes de *Saccharomyces cerevisiae* en la dieta de pollos de engorde. *Revista Científica*, 27(4), 249-254.
- Roth, F. X., & Kirchgessner, M. (1998). Organic acids as feed additives for young pigs: Nutritional and gastrointestinal effects. *J. Anim. Feed Sci*, 7(Suppl 1), 25-33.
- Ruiz Morales, M. (2011). Taller de elaboración de lombricomposta: porque tener lombrices nos beneficia a todos. ISBN: 978-607-417-141-9
- Ryley, J. F., Bentley, M., Manners, D. J., & Stark, J. R. (1969). Amylopectin, the storage polysaccharide of the coccidia *Eimeria brunetti* and *E. tenella*. *J. Parasitol.* 839-845
- Samanidou, V., Papadoyannis, I., & Vasilikiotis, G. (1991). Mobilization of heavy metals from river sediments of Northern Greece, by humic substances. *J. Environ. Sci. Health A.* 26(7), 1055-1068.
- San Martín, B., Bravo, V., & Borie, C. (2005). Evaluación de la resistencia antimicrobiana en ganado bovino en Chile, utilizando *E. coli* como bacteria indicadora. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 37(2), 117-123. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2005000200005>.
- Sato, T., Ose, Y., Nagase, H., & Hayase, K. (1987). Adsorption of mutagens by humic acid. *Sci. Total Environ.* 62, 305-310.

- Scarpellini, E., Cazzato, A., Lauritano, C., Gabrielli, M., Lupascu, A., Gerardino, L., & Gasbarrini, A. (2008). Probiotics: which and when?. *Dig. Dis.* 26(2), 175-182.
- Schepetkin, I. A., Khlebnikov, A. I., Ah, S. Y., Woo, S. B., Jeong, C. S., Klubachuk, O. N., & Kwon, B. S. (2003). Characterization and biological activities of humic substances from mumie. *J. Agric. Food. Chem.* 51(18), 5245-5254.
- Seow, Y. X., Yeo, C. R., Chung, H. L., & Yuk, H. G. (2014). Plant essential oils as active antimicrobial agents. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 54(5), 625-644.
- Shivaramaiah, C., Barta, J. R., Hernandez-Velasco, X., Téllez, G., & Hargis, B. (2014). Coccidiosis: recent advancements in the immunobiology of *Eimeria* species, preventive measures, and the importance of vaccination as a control tool against these Apicomplexan parasites. *Vet. Med.* 5(5), 23-34.
- Smith, C. K., Galloway, R. B., & White, S. L. (1981). Effect of ionophores on survival, penetration, and development of *Eimeria tenella* sporozoites in vitro. *J. Parasitol.* 511-516.
- Shirley, M. W., & Bedrnik, P. (1997). Live attenuated vaccines against avian coccidiosis: success with precocious and egg-adapted lines of *Eimeria*. *Parasitol. Today.* 13(12), 481-484.
- Starr, M. P., & Reynolds, D. M. (1951). Streptomycin resistance of coliform bacteria from turkeys fed streptomycin. *Am. J. Public Health. Nations Health.* 41(11\_Pt\_1), 1375-1380. [https://doi.org/10.2105/AJPH.41.11\\_Pt\\_1.1375](https://doi.org/10.2105/AJPH.41.11_Pt_1.1375)
- Strout, R. G., Solis, J., Smith, S. C., & Dunlop, W. R. (1965). *In vitro* cultivation of *Eimeria acervulina* (Coccidia). *Exp. Parasitol.* 17(3), 241-246.
- Suiryanrayna, M. V., & Ramana, J. V. (2015). A review of the effects of dietary organic acids fed to swine. *J. Anim. Sci. Bio.* 6(1), 1-11.
- Taklimi, S. M. S., Ghahri, H., & Isakan, M. A. (2012). Influence of different levels of humic acid and esterified glucomannan on growth performance and intestinal morphology of broiler chickens. *Agric Sci.* 3(05), 663.
- TeraVita, T. M. (2004). Humates in poultry and stock farming. *Erişim: www.teravita.com/humates. Erişim tarihi,* 10, 2005.
- Thenmozhi, V., Veerakumari, L., & Raman, M. (2014). Preliminary genetic diversity study on different isolates of *Eimeria tenella* from South India. *Int. J. Adv. Vet. Sci. Technol.* 3(1), 114-118.
- Tovar Hernández, M. (1996). Control de coccidiosis ¿quimioprofilaxis, planes vacunales? Ventajas e inconvenientes. *Selecciones avícolas,* 38(11), 0668-681.

- UNA. (2020). *Union Nacional de Avicultores*. Obtenido de union nacional de avicultores: <http://www.una.org.mx/> consultado el [2/11/2021]
- UN DESA. (2017) Departamento de Asuntos Económicos y Sociales de Naciones Unidas. Obtenido de <https://www.un.org/development/desa/publications/world-population-prospects-the-2017-revision.html> consultado el [08/11/2021]
- USDA. (2019). Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Obtenido de: <https://www.fas.usda.gov/data/mexico-poultry-and-products-semi-annual-2> consultado el [3/09/2019]
- Van der Klis, J. D., Verstegen, M. W. A., & De Wit, W. (1990). Absorption of minerals and retention time of dry matter in the gastrointestinal tract of broilers. *Poult. Sci.* 69(12), 2185-2194.
- Van Rensburg, C. E., Malfeld, S. C., & Dekker, J. (2001). Topical application of oxifulvic acid suppresses the cutaneous immune response in mice. *Drug. Dev. Res.* 53(1), 29-32.
- Van Rensburg, C. J., Van Rensburg, C. E. J., Van Ryssen, J. B. J., Casey, N. H., & Rottinghaus, G. E. (2006). *In vitro* and *in vivo* assessment of humic acid as an aflatoxin binder in broiler chickens. *Poult. Sci.* 85(9), 1576-1583.
- Van Vleet, J. F., Amstutz, H., Weirich, W. E., Rebar, A. H., & Ferrans, V. J. (1983). Acute monensin toxicosis in swine: effect of graded doses of monensin and protection of swine by pretreatment with selenium-vitamin E. *American journal of veterinary research*, 44(8), 1460. Citado por: Dowling, L. (1992). Ionophore toxicity in chickens: a review of pathology and diagnosis. *Avian. Pathol.* 21(3), 355-368.
- Verbeke, K. A., Boobis, A. R., Chiodini, A., Edwards, C. A., Franck, A., Kleerebezem, M., ... & Tuohy, K. M. (2015). Towards microbial fermentation metabolites as markers for health benefits of prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* 28(1), 42-66.
- Verstraete, W., & Devliegher, W. (1996). Formation of non-bioavailable organic residues in soil: perspectives for site remediation. *Biodegradation.* 7(6), 471-485.
- Vetterling, J. M., & Doran, D. J. (1969). Storage polysaccharide in coccidial sporozites after excystation and penetration of cells. *J. Protozool.* 16(4), 772-775.
- Williams, R. B. (1973). Effects of different infection rates on the oocyst production of *Eimeria acervulina* or *Eimeria tenella* in the chicken. *Parasitol.* 67(3), 279-288.
- Williams, R. B. (1999). A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. *Int. J. Parasitol.* 29(8), 1209–1229. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00086-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00086-7)

- Williams, R. B. (2001). Quantification of the crowding effect during infections with the seven *Eimeria* species of the domesticated fowl: its importance for experimental designs and the production of oocyst stocks. *Int. J. Parasitol.* 31(10), 1056-1069.
- Wilson, P. A. G., & Fairbairnz, D. (1961). Biochemistry of sporulation in oocysts of *Eimeria acervulina*. *J. Protozool.* 8(4), 410-416.
- Windisch, W., Schedle, K., Plitzner, C., & Kroismayr, A. (2008). Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *J. Anim. Sci.* 86(suppl\_14), E140-E148.
- Wu, M., Song, M., Liu, M., Jiang, C., & Li, Z. (2016). Fungicidal activities of soil humic/fulvic acids as related to their chemical structures in greenhouse vegetable fields with cultivation chronosequence. *Sci. Rep.* 6(1), 1-10.
- Xie, M. Q., Fukata, T., Gilbert, J. M., & McDougald, L. R. (1991). Evaluation of anticoccidial drugs in chicken embryos. *Parasitol. Res.* 77(7), 595-599.
- Yasar, S., Gokcimen, A., Altuntas, I., Yonden, Z., & Petekkaya, E. (2002). Performance and ileal histomorphology of rats treated with humic acid preparations. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 86(7-8), 257-264.
- Yang, W. C., Yang, C. Y., Liang, Y. C., Yang, C. W., Li, W. Q., Chung, C. Y., & Chang, C. L. T. (2019). Anti-coccidial properties and mechanisms of an edible herb, *Bidens pilosa*, and its active compounds for coccidiosis. *Sci. Rep.* 9(1), 1-11.
- You, M. J. (2014). Suppression of *Eimeria tenella* sporulation by disinfectants. *Korean. J. Parasitol.* 52(4), 435.
- Yuño, M. M., & Gogorza, L. M. (2008). Coccidiosis aviar: respuesta inmune y mecanismos de control en la industria avícola. *Rev. Vet.* 19(1), 61-66.