



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Medicina Veterinaria**

**Escuela Profesional de Medicina Veterinaria**

**Vacunas contra coccidias en aves: tipos de vacuna y  
procedimientos de vacunación**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinaria

**AUTOR**

Brenda Milagros MORA GONZALES

**ASESOR**

Mg. Maria Eliana ICOCHEA D'ARRIGO

Lima, Perú

2022



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Mora B. Vacunas contra coccidias en aves: tipos de vacuna y procedimientos de vacunación [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2022.

---

## Metadatos complementarios

<b>Datos de autor</b>	
Nombres y apellidos	Brenda Milagros Mora Gonzales
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	44804738
URL de ORCID	No aplica
<b>Datos de asesor</b>	
Nombres y apellidos	María Eliana Icochea D' Arrigo
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	09161133
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0001-7102-0584">https://orcid.org/0000-0001-7102-0584</a>
<b>Datos del jurado</b>	
<b>Presidente del jurado</b>	
Nombres y apellidos	Alberto Gustavo Manchego Sayán
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	15619652
<b>Miembro del jurado 1</b>	
Nombres y apellidos	Miguel Ángel Rojas Montes
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	42290575
<b>Miembro del jurado 2</b>	
Nombres y apellidos	Rosa Isabel Gonzalez Veliz
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10300467
<b>Datos de investigación</b>	
Línea de investigación	B.4.1.6 Patología aviar
Grupo de investigación	No aplica

Agencia de financiamiento	No aplica
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Universidad Nacional Mayor de San Marcos País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Latitud-12.05597 Longitud: -77.08456
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2021 - 2022
URL de disciplinas OCDE	Ciencia veterinaria <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01</a>



**PROGRAMA DE TUTORÍA EN INVESTIGACIÓN PARA OPTAR EL  
TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIA POR LA MODALIDAD DE  
EXAMEN DE APTITUD PROFESIONAL  
Autorizado por R.D N° 304-D-FMV-2020**

**1. FECHA DE LA SUSTENTACIÓN 25/03/2022**

HORA INICIO: 11:00 horas

HORA TÉRMINO: 12:30 horas

**2. MIEMBROS DEL JURADO**

PRESIDENTE: **MV. Mg. Manchego Sayán, Alberto Gustavo**

MIEMBRO: **MV. Dr. Rojas Montes, Miguel Angel**

MIEMBRO: **Blga. Mg. González Véliz, Rosa Isabel**

ASESORA: **MV. Mg. Icochea D´Arrigo, Maria Eliana**

**3. DATOS DEL TESISISTA**

APELLIDOS Y NOMBRES: **MORA GONZALES, BRENDA MILAGROS**

CÓDIGO:

R.R. DE GRADO DE TESISISTA NÚMERO: **N° 02635-R-16**

TÍTULO: **“VACUNAS CONTRA COCCIDIAS EN AVES: TIPOS DE VACUNA Y PROCEDIMIENTOS DE VACUNACIÓN”**

**4. RECOMENDACIONES**

Ninguna

---

**Datos de la plataforma virtual institucional del acto de sustentación:**

[https://drive.google.com/file/d/1Op\\_onSX8YIcAcl\\_En1ALoizHOHI9i2Zw/view?usp=sharing](https://drive.google.com/file/d/1Op_onSX8YIcAcl_En1ALoizHOHI9i2Zw/view?usp=sharing)

ID:

Grabación archivada en:

[https://drive.google.com/file/d/1Op\\_onSX8YIcAcl\\_En1ALoizHOHI9i2Zw/view?usp=sharing](https://drive.google.com/file/d/1Op_onSX8YIcAcl_En1ALoizHOHI9i2Zw/view?usp=sharing)

**5. NOTA OBTENIDA: 18 ( Dieciocho)**



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
**Facultad de Medicina Veterinaria**  
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 007-PROGR-TUTORIA /FMV-2021.

**PRESIDENTE:**



Firmado digitalmente por  
MANCHEGO SAYAN Alberto Gustavo  
FAU 20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 19.04.2022 18:00:06 -05:00

.....  
**MANCHEGO SAYÁN, ALBERTO GUSTAVO**

**MIEMBROS :**



Firmado digitalmente por ICOCHEA  
D'ARRIGO Maria Eliana FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 19.04.2022 11:30:54 -05:00

.....  
**ICOCHEA D'ARRIGO, MARIA ELIANA**  
**ASESOR DE LA TESIS**



Firmado digitalmente por ROJAS  
MONTES Miguel Angel FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 18.04.2022 10:57:34 -05:00

.....  
**ROJAS MONTES, MIGUEL ANGEL**



Firmado digitalmente por GONZALEZ  
VELIZ Rosa Isabel FAU 20148092282  
soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 19.04.2022 08:50:51 -05:00

.....  
**GONZÁLEZ VÉLIZ, ROSA ISABEL**

San Borja, 18 de abril de 2022

**V° B°**



Firmado digitalmente por SANTIANI  
ACOSTA Alexei Vicent FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 20.04.2022 08:20:30 -05:00

.....  
**Dr. Alexei Vicent Santiani Acosta**  
**Director EPMV**  
**Escuela Profesional de Medicina Veterinaria**

**6. PÚBLICO ASISTENTE:** (Nombre, apellido y DNI)

Apellidos y Nombres	DNI	Correo electrónico
Juan Siuce Moreno		jsiucem@unmsm.edu.pe
Eva Casas Astos		ecasasa@unmsm.edu.pe
Juan Olazabal Loaiza		jolazaball@unmsm.edu.pe
Luis Gómez Puerta		lgomezp@unmsm.edu.pe
Danilo Pezo Carreón		spezoc@unmsm.edu.pe
José Manuel Angulo Tisoc		jangulot@unmsm.edu.pe
Francisco Suárez Aranda		fsuareza@unmsm.edu.pe
Joel Cuenca Chacca	48667693	joel.cuenca@unmsm.edu.pe
Fiorella Ebelyn Montero Rojas	72564493	fiorella.montero@unmsm.edu.pe
Katty Sarahí Zanabria Pampas	71258323	katty.zanabria@unmsm.edu.pe
Lourdes Aida Yupanqui	72284495	lourdes.yupanqui@unmsm.edu.pe
Ángela Patricia Vilchez Yasuda	72885442	angela.vilchez@unmsm.edu.pe
Sharon Cabanillas Ruidíaz		
Alfredo Condemarín		

**7. FIRMAS DE LOS MIEMBROS DEL JURADO**

 <p>Firmado digitalmente por MANCHEGO SAYAN Alberto Gustavo FAU 20148092282 soft Motivo: Soy el autor del documento Fecha: 14.04.2022 01:15:58 -05:00</p>
<b>Firma</b>
<b>MV. Mg. Manchego Sayán, Alberto Gustavo</b>
<b>Apellidos y Nombres</b>
<b>PRESIDENTE</b>

 <p>Firmado digitalmente por ICOCHEA D'ARRIGO Maria Eliana FAU 20148092282 soft Motivo: Soy el autor del documento Fecha: 13.04.2022 12:57:55 -05:00</p>	 <p>Firmado digitalmente por ROJAS MONTES Miguel Angel FAU 20148092282 soft Motivo: Soy el autor del documento Fecha: 11.04.2022 22:35:36 -05:00</p>	 <p>Firmado digitalmente por GONZALEZ VELIZ Rosa Isabel FAU 20148092282 soft Motivo: Soy el autor del documento Fecha: 12.04.2022 21:04:02 -05:00</p>
<b>Firma</b>	<b>Firma</b>	<b>Firma</b>
<b>MV. Mg. Icochea D'Arrigo, Maria Eliana</b>	<b>MV. Dr. Rojas Montes, Miguel Angel</b>	<b>Blga. Mg. González Véliz, Rosa Isabel</b>
<b>Apellidos y Nombres</b>	<b>Apellidos y Nombres</b>	<b>Apellidos y Nombres</b>
<b>ASESORA DE LA TESIS</b>	<b>MIEMBRO JURADO</b>	<b>MIEMBRO JURADO</b>

## **DEDICATORIA**

*A mis padres Carlos y Leonor. Gracias por sus sacrificios, amor, comprensión y apoyo.*

## ÍNDICE

<b>DEDICATORIA</b> .....	ii
<b>ÍNDICE</b> .....	iii
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	iv
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	v
<b>RESUMEN</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	3
<b>2.1 AGENTE ETIOLÓGICO</b> .....	3
<b>2.2 CICLO BIOLÓGICO</b> .....	6
<b>2.3 RESPUESTA INMUNE DE LA COCCIDIOSIS EN AVES</b> .....	8
<b>2.4 CRONOLOGÍA DEL DESARROLLO DE LAS VACUNAS DE COCCIDIA</b> ...	12
<b>2.5 TIPOS DE VACUNAS COMERCIALES</b> .....	14
2.5.1 Vacunas vivas.....	14
<b>2.6 ADMINISTRACIÓN DE VACUNAS COMERCIALES DE COCCIDIA</b> .....	19
2.6.1 Administración individual .....	20
2.6.2 Administración vía agua de bebida.....	21
2.6.3 Administración por aspersion.....	21
2.6.4 Administración en gel .....	22
2.6.5 Administración vía <i>in ovo</i> .....	23
<b>2.7 INVESTIGACIONES PARA FUTURAS VACUNAS DE COCCIDIA</b> .....	25
2.7.1 Vacunas de ácido desoxirribonucleico (ADN) .....	25
2.7.2 Vacunas anticoccidiales de subunidades recombinantes.....	26
<b>2.8 ESTRATEGIAS ALTERNATIVAS PARA EL CONTROL DE LA COCCIDIOSIS</b> .....	33
2.8.1 Suplementación con probióticos.....	33
2.8.2 Suplementación con aceites esenciales y ácidos orgánicos.....	34
<b>III. CONCLUSIONES</b> .....	36
<b>IV. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	38

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Características de las Eimerias en pollos y gallinas .....	4
<b>Cuadro 2.</b> Principales vacunas comerciales en el mundo.....	15
<b>Cuadro 3</b> Vacunas comerciales en el Perú .....	16
<b>Cuadro 4</b> Antígenos inmunogénicos contra la coccidiosis en aves de corral.....	26

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> La distribución geográfica de las unidades taxonómicas operativas de <i>Eimeria</i> notificadas, OTUx OYUy y OTUz en todo el mundo.....	5
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida de <i>Eimeria tenella</i> .....	6
<b>Figura 3.</b> Ciclo de vida de <i>E. tenella</i> y respuesta inmune del hospedador intestinal a los parásitos.....	10
<b>Figura 4.</b> Ciclo de vida de la cepa virulenta de <i>E. maxima</i> ; y una cepa atenuada por precocidad derivada de ella.....	17
<b>Figura 5.</b> Células T asociadas al intestino, macrófagos y el proceso de la respuesta inmunitaria de los pollos a los compuestos anticoccidianos a base de hierbas.....	34

## RESUMEN

La coccidiosis es una enteritis potencialmente grave causada por parásitos intracelulares del género *Eimeria*. Esta enfermedad genera grandes pérdidas económicas en la industria avícola, principalmente asociadas a la eficiencia productiva, mortalidad, pigmentación y costos en el tratamiento preventivo y curativo, los cuales se estima que superan los 19 000 millones de dólares por año alrededor del mundo. En la actualidad se reconocen siete especies que infectan a pollos y gallinas; sin embargo, la presencia de tres unidades taxonómicas operativas indica que éstas podrían representar una amenaza notable para la salud, el bienestar y la productividad de los pollos ya que las vacunas anticoccidiales actualmente disponibles en el mercado no poseen dichas cepas en su contenido. El control de la coccidiosis, en la actualidad se basa principalmente en el tratamiento preventivo con fármacos anticoccidiales aplicados en el alimento; sin embargo, el aumento de la resistencia a estos fármacos y la demanda pública de carne sin residuos de antibióticos ha estimulado el desarrollo y uso de vacunas vivas atenuadas o no atenuadas, así como el aumento en las investigaciones de vacunas recombinantes en base a subunidades. Se han considerado adicionalmente medidas de control alternativas con la finalidad de promover la salud intestinal, como por ejemplo el uso de probióticos y una gama de suplementos alimenticios vegetales. Este trabajo tiene como objetivo recopilar información científica actualizada sobre los tipos de vacunas, mecanismos de respuesta inmune y sus diferentes métodos de administración, así como las investigaciones sobre las vacunas de subunidades.

**Palabras clave:** Coccidia, vacuna, vacunación, atenuada, no atenuada, subunidades.

## ABSTRACT

Coccidiosis is a potentially serious enteritis caused by intracellular parasites of the genus *Eimeria*. This disease generates large economic losses in the poultry industry, mainly associated with production efficiency, mortality, pigmentation, and costs of preventive and curative treatment, which are estimated to exceed 19 000 million dollars per year around the world. Seven species are currently recognized to infect chickens and hens; however, the presence of three operative taxonomic units indicates that these could represent a significant threat to the health, welfare and productivity of chickens since the anticoccidial vaccines currently available on the market do not contain these strains in their content. The control of coccidiosis is currently based mainly on preventive treatment with anticoccidial drugs applied in the food; however, the increase in resistance to these drugs and the public demand for meat without antibiotic residues has stimulated the development and use of live attenuated or non-attenuated vaccines, as well as the increase in subunit-based recombinant vaccine research. Alternative control measures aimed at promoting gut health have also been considered, such as the use of probiotics and a range of plant-based food supplements. This work aims to collect updated scientific information on the types of vaccines, immune response mechanisms and their different administration methods, as well as research on subunit vaccines.

**Keywords:** Coccidia, vaccine, vaccination, attenuated, non-attenuated, subunit

## I. INTRODUCCIÓN

La coccidiosis es una enfermedad parasitaria de importancia mundial en la industria avícola; ya que genera grandes pérdidas económicas, se estima que los costos asociados con la coccidiosis incluyendo pérdidas en rendimiento, pigmentación, mortalidad, profilaxis y tratamientos superan los 19 000 millones de dólares por año alrededor del mundo (Blake *et al.*, 2020). El impacto de las infecciones de coccidia depende de dos principales factores, patogenicidad de la especie de *Eimeria* y cantidad de ooquistes; que da lugar a una infección clínica (coccidiosis) o subclínica (coccidiasis) (Cervantes, 2013). Las lesiones intestinales varían con la especie de *Eimeria*, estas pueden incluir enteritis hemorrágica, más comúnmente causada por *Eimeria tenella* pero también por *Eimeria necatrix* y *Eimeria brunetti*, mala absorción frecuentemente asociada con *Eimeria acervulina* o *Eimeria maxima*, o en menor grado con *Eimeria mitis* y *Eimeria praecox* (Reid *et al.*, 2014). Informes de “especies” adicionales en pollos como *Eimeria hagani* o *Eimeria mivati* han aparecido esporádicamente pero luego se determinó que eran *nomina dubia* o de origen dudoso (Blake *et al.*, 2021). Los pollos y gallinas albergan siete especies de *Eimeria* que se desarrollan dentro de las células epiteliales intestinales y producen diversos grados de morbilidad y mortalidad. Adicionalmente se ha reconocido tres unidades taxonómicas operativas (OTU) *Eimeria lata* sp., *Eimeria nagambie* sp. y *Eimeria zaria* sp. para OTU x, y, z, respectivamente que se encuentran en duodeno y yeyuno (Blake *et al.*, 2021).

La infección de aves por ooquistes de *Eimeria* conlleva una fuerte inmunidad específica de especie que puede prevenir la reinfección. Se han realizado investigaciones en todo el mundo

para intentar dilucidar el mecanismo de inmunidad protectora contra la coccidiosis. Se llegó a la conclusión de los primeros estudios, que la inmunidad celular es la clave para la protección contra *Eimeria*, mientras que la inmunidad humoral juega un papel secundario en la resistencia contra la infección (Wallach, 2010). La adquisición de inmunidad protectora contra las especies de *Eimeria* se ve reforzada por la reexposición después de la vacunación (Chapman *et al.*, 2002). Las herramientas de prevención para coccidia incluyen el uso de drogas anticoccidiales y vacunas, la administración de anticoccidiales es la forma más común de prevención en pollos de engorde, con ese fin son usados diversos tipos de anticoccidiales ionóforos y/o químicos administrados en el alimento; pero además de los residuos en la carcasa, uno de los inconvenientes es la adquisición de resistencia anticoccidial. La vacunación se realiza mediante la inoculación oral directa o indirecta de formulaciones variadas de *Eimeria spp.* atenuadas o no atenuadas (Cervantes *et al.*, 2020) y la inmunidad adquirida después de la infección es altamente específica de especie (McDonald *et al.*, 2009).

La resistencia a los medicamentos anticoccidiales se desarrolla rápidamente y se ha generalizado, lo que requiere un control regular de la eficacia y/o ciclos entre diferentes productos con la finalidad de rotarlos y evitar la resistencia (Cervantes *et al.*, 2020). Además, la presión pública y legislativa para reducir el uso de medicamentos antimicrobianos en la producción pecuaria está promoviendo una mayor aceptación de las vacunas anticoccidiales, sobre todo en los Estados Unidos, donde más del 30 % de los pollos de engorde comerciales vendidos desde 2016 recibieron una vacuna anticoccidial (Blake *et al.*, 2020). Las diferencias entre las vacunas incluyen el número de ooquistes por dosis (que varía hasta diez veces entre las vacunas), el estado de atenuación de los ooquistes y las especies presentes dentro de la vacuna (Tensa *et al.*, 2019). Además, las vacunas contra la coccidiosis pueden originarse a partir de cepas no atenuadas o de cepas atenuadas seleccionadas. Las cepas atenuadas por precocidad tienen un ciclo más rápido y son menos patógenas, pero también menos prolíficas, que las cepas no atenuadas (Bruzual *et al.*, 2021).

Se han empleado diferentes métodos para la aplicación de vacunas vivas contra la coccidiosis. En la planta de incubación; se han administrado vacunas vía aspersión líquida, aspersión en gel e *in ovo*. En la granja; la vacuna se administra en la primera semana de vida en el alimento, en el agua de bebida, gota al pico o gota al ojo. (Bruzual *et al.*, 2021). Esta revisión tiene como finalidad brindar información actualizada sobre los tipos de vacunas y los métodos de vacunación utilizados actualmente para la prevención de la coccidiosis.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

La coccidiosis es una enfermedad causada por parásitos intracelulares del género *Eimeria*; pertenece al reino *Animalia*, forma parte del Phylum *Apicomplexa*, clase *Sporozoa*, subclase *Coccidea*, suborden *Eimeriina* y familia *Eimeriidae* (Attree *et al.*, 2021).

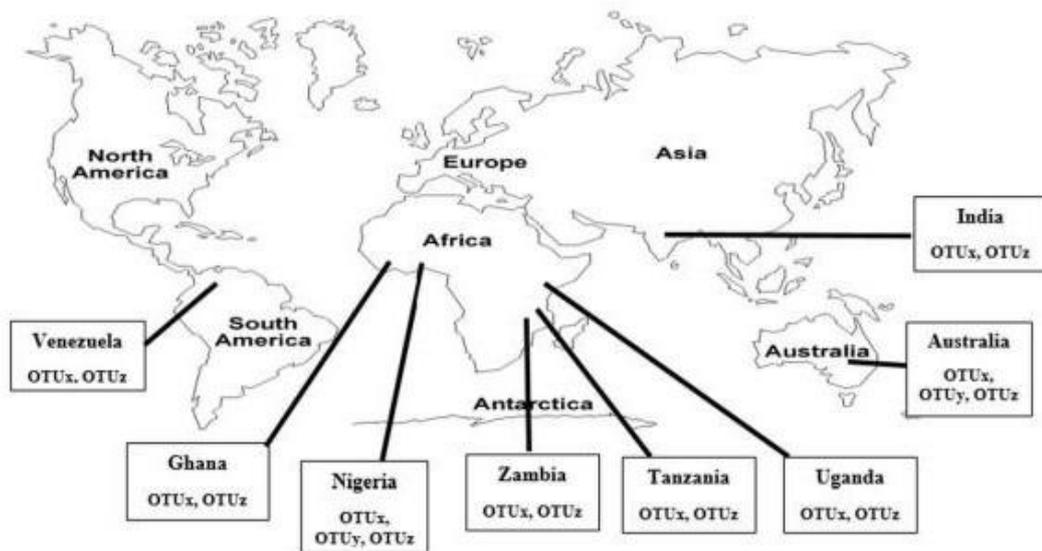
En la actualidad, se considera que a la gallina y al pollo los parasitan siete especies de *Eimeria*: *E. acervulina*, *E. tenella*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. mitis* y *E. praecox* (Cuadro 1). De éstas, las cinco primeras se consideran patógenas, ya que desarrollan formas clínicas, y las dos últimas apatógenas, pues no desarrollan manifestaciones clínicas, aunque su presencia implica disminución significativa de la ganancia de peso y del índice de conversión (Burrell *et al.*, 2019).

**Cuadro 1.** Características de las Eimerias en pollos y gallinas.

Especie de Eimeria	Lesiones macroscópicas	Presencia de hemorragia	Malabsorción intestinal	Región de desarrollo	Periodo prepatente (h)
<i>E. brunetti</i> *	✓	✓	X		120
<i>E. necatrix</i> *	✓	✓	X		138
<i>E. tenella</i> *	✓	✓	X		115
<i>E. acervulina</i> *	✓	X	✓		97
<i>E. máxima</i> *	✓	X	✓		121
<i>E. mitis</i> *	X	X	✓		93
<i>E. praecox</i> *	X	X	✓		83
OTU x** ( <i>E. lata</i> )	No disponible	✓	✓		125-130
OTU y** ( <i>E. nagambie</i> )	No disponible	No disponible	✓		132
OTU z** ( <i>E. zaria</i> )	No disponible	X	✓		130

Adaptado de Attree *et al.* 2021\*; Blake *et al.* 2021\*\*

Estudios más recientes identificaron tres genotipos crípticos de *Eimeria* que empezaron circulando en las poblaciones de pollos australianos que parecían distintos de las especies reconocidas (Figura 1) y que hasta la fecha se han considerado como nuevas unidades taxonómicas operativas (OTU). Identificado por primera vez por resolución electroforética capilar de los amplicones de la PCR del espaciador transcrito interno -2 ( Morris *et al.*, 2007 ). La capacidad de estas OTU para comprometer el aumento de peso corporal de los pollos y escapar de la inmunidad inducida por las vacunas anticoccidiales actualmente disponibles en el mercado indica que podrían representar una amenaza notable para la salud, el bienestar y la productividad de los pollos. Estas OTU reciben los nombres de *Eimeria lata sp.*, *Eimeria nagambie sp.* y *Eimeria zaria sp.* para OTU x, y, z, respectivamente (Blake *et al.*, 2021). Además, tenemos *E. mivati* y *E. hagani*, la existencia de estas dos es incierta (Cervantes, 2020).



**Figura 1.** Distribución geográfica de las unidades taxonómicas operativas de *Eimeria* notificadas, OTUx OYUy y OTUz en todo el mundo (Ventakas *et al.*, 2019)



Una vez libres los esporozoitos, ingresan a la célula epitelial, se forma la vacuola parasitófora y comienzan a redondearse transformándose en trofozoito, que por división nuclear reiterada (esquizogonia) origina un esquizonte polinuclear de primera generación. Con la rotura del esquizonte se liberan los merozoitos (Del Cacho *et al.*, 1999), estos tienen un complejo apical que les permite desplazarse e infectar a las células epiteliales vecinas del intestino, dando lugar a esquizontes de segunda generación (reproducción asexual). La segunda generación de esquizontes es la responsable de la aparición de las lesiones microscópicas que se conocen e identifican para cada especie (Cervantes *et al.*, 2020).

Gametogonia (Reproducción sexual): La última generación de merozoítos penetra en nuevas células epiteliales de las criptas para desarrollar la gametogonia. De esta manera, a partir de los merozoitos se forman gamontes de dos tipos: 1. Macrogamontes o gametos femeninos: maduran para formar el macrogameto. 2. Microgamontes o gametos masculinos: dan múltiples microgametos flagelados que invaden las células parasitadas por los macrogametos y lo fecundan, dando lugar al cigoto. La fusión de los cuerpos de envoltura I y II del macrogameto da lugar a las capas externas del ooquiste no esporulado. Es en esta fase en que se permite la recombinación genética, la cual puede resultar en la transferencia de propiedades específicas, como la tolerancia a la quimioterapia y la patogenicidad (Burrell *et al.*, 2019).

Esporogonia (Maduración de las esporas): Los oocistos son expulsados de los tejidos, al romperse la célula que los alberga, el ooquiste alcanza la luz cecal y posteriormente el medio ambiente a través de las heces y es en el medio exterior donde se produce la esporulación bajo condiciones ideales de temperatura, oxígeno y humedad (Kawazowe, 1994). A las pocas horas de abandonar al hospedador, el protoplasma se contrae para formar el esporonte, quedando un espacio bien definido entre este y la pared. El esporonte da cuatro masas ovaladas (esporoblastos) que se recubren de una doble membrana, se forman cuatro esporocistos, cada uno de los cuales contiene dos esporozoítos (células infectantes). La esporulación de los ooquistes da como resultado ocho esporozoítos haploides a partir de un único ooquiste inicial diploide, por meiosis (Campos, 2011).

### 2.3 RESPUESTA INMUNE DE LA COCCIDIOSIS EN AVES

La respuesta inmune juega un papel importante en la protección y resistencia de los pollos contra la coccidiosis, e involucra inmunidad específica y no específica (Yun *et al.* 2000). La inmunidad específica involucra la respuesta de los linfocitos, secreciones de anticuerpos y citoquinas; mientras que la inmunidad no específica está mediada por barreras físicas (piel), el sistema del complemento y los fagocitos, que forman la primera línea de defensa (Zhang *et al.* 2016). Los informes han documentado varias respuestas inmunes involucradas en la lucha contra la coccidiosis, especialmente a través de la inmunidad adaptativa, es decir, respuestas inmunitarias mediadas por células y la respuesta humoral (Lee *et al.* 2016; Tang *et al.* 2018).

La inmunidad adaptativa (denominada inmunidad adquirida) reconoce características específicas de la entidad infecciosa y recluta células inmunitarias (linfocitos B y T) para combatir el patógeno (Mtshali *et al.*, 2020). Estas células inmunitarias pueden “recordar” infecciones previas, por lo que pueden actuar rápidamente en reinfecciones y proporcionar una respuesta inmune eficaz. La inmunidad mediada por células (IMC) es crucial porque los coccidios son un organismo intracelular, mientras que la inmunidad humoral juega un papel menor (Mtshali *et al.*, 2020). Sin embargo, un estudio de Tian *et al.* (2017), demostraron que la inmunidad humoral juega un papel importante en la infección por coccidiosis. Dalloul *et al.* (2002), indicaron que las respuestas de IMC desempeñan un papel clave en la resistencia contra *Eimeria spp.* Las respuestas inmunitarias humorales y la respuesta inmune celular se estimulan poco después de la invasión de *Eimeria spp.* y forman la segunda línea de defensa contra la infección (Lee *et al.* 2016; Liu *et al.* 2018).

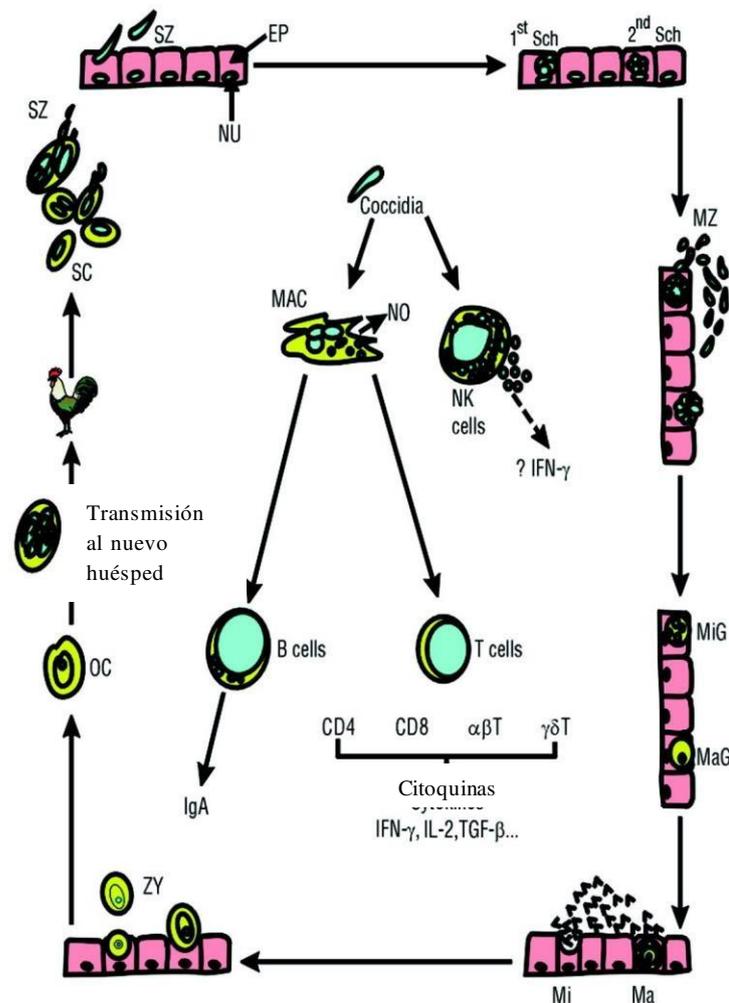
La inmunidad humoral constituye la defensa primaria para eliminar patógenos o toxinas invasoras. El torrente sanguíneo es el principal transportador de sustancias efectoras de la respuesta inmune humoral, como los anticuerpos o inmunoglobulinas circulantes que se producen en las células B (Lillehoj *et al.*, 2000). Las inmunoglobulinas (Ig) que se han reconocido en las aves incluyen IgY, IgM e IgA. La IgY en las gallinas se concentra en la yema del huevo y pasa a la descendencia durante el desarrollo embrionario. Por lo tanto, la inmunidad materna IgY tiene un papel fundamental en la respuesta a las infecciones, lo que implica la presencia de inmunidad pasiva contra la infección por coccidia. La respuesta inmune humoral se evalúa midiendo los niveles de anticuerpos séricos en todas las etapas de crecimiento de las aves (Mtshali *et al.*, 2020).

En un estudio de Qi *et al.* (2013), se observó un aumento significativo del nivel de IgY (inmunidad materna) en dos grupos de pollos que fueron inmunizados inicialmente con antígenos recombinantes de orgánulos micronema (MIC) de *E. tenella* EtMIC-1 y EtMIC-1-VD (con dominio adhesivo), en comparación con los grupos control. Estos resultados sugirieron indirectamente que EtMIC-1-VD tiene un papel importante en la activación de la inmunidad humoral y celular (Qi *et al.*, 2013). Como resultado, esta es una vacuna candidata contra las infecciones por coccidia (Wang *et al.*, 2017). Otros hallazgos de Pastor-Fernández *et al.* (2018) mostraron poca o ninguna reacción cuando se utilizó proteínas de antígeno de membrana apical (AMA-1); EtAMA-1 como vector, lo que significa que esto puede no ser adecuado para estudiar las respuestas humorales. A pesar de que esta proteína tiene un papel en la invasión del hospedador, su papel específico en la respuesta inmune aún no está claro (Li *et al.* 2018).

En un estudio de Wiedmer *et al.* (2017), los pollos fueron inmunizados con el epítipo recombinante *E. tenella* EtGam56, después se los infectó con ooquistes y los pollos respondieron positivamente, ya que la eliminación de ooquistes fue significativamente menor que el grupo no inmunizado. Con esta información, las proteínas de gametocitos (Gam) podrían usarse potencialmente en la formulación de vacunas para el control de la coccidiosis. Carecen de la capacidad de inducir una protección total, pero son suficientes para prevenir la manifestación de signos clínicos (Kundu *et al.*, 2017). Sin embargo, otros estudios han demostrado que el título de anticuerpos no se correlaciona con el nivel de inmunidad (Del Cacho *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018). La falta de correlación entre los anticuerpos y los ooquistes podría haber provocado que no se reconocieran las respuestas humorales en la coccidiosis. Sin embargo, los anticuerpos específicos contra el parásito producidos por las aves pueden desempeñar un papel indirecto en la respuesta a las infecciones primarias por coccidia (Jenkins *et al.* 2018).

La respuesta inmune mediada por células está más estudiada, en comparación con la respuesta inmune humoral en vacunas de coccidia (Figura 3). Un componente vital de la respuesta IMC son los linfocitos T, que juegan un papel importante frente al desafío inicial (Liu *et al.*, 2018). Los linfocitos T son conocidos por su papel en la inmunidad adquirida contra la infección por coccidia (Dalloul *et al.*, 2006). Los pollos, al igual que los mamíferos, tienen dos formas de células T; CD4+ y CD8+, que son células T auxiliares y citotóxicas, respectivamente (Wattrang *et al.*, 2016). La inducción de estas células T depende de la disponibilidad del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Los linfocitos T-ayudadores (Th) identifican un segundo grupo de moléculas CMH (CMH-2), mientras las células T citotóxicas (Tc) reconocen CMH de clase 1

(CMH-1), ambos están asociadas con antígenos procesados (Mtshali *et al.*, 2020). Diversos estudios han reportado la asociación de CMH aviar con el nivel de producción de anticuerpos contra diferentes antígenos (Lee *et al.* 2016). Generalmente, las células Th activan la producción de anticuerpos por parte de las células B plasmáticas y estimulan la actividad de las células Tc. Se sabe que las células T citotóxicas CD8+ reconocen y eliminan selectivamente las células del hospedador infectadas por patógenos (Dalloul *et al.* 2002).



**Figura 3.** Ciclo de vida de *E. tenella* y respuesta inmune del hospedador intestinal a los parásitos. EP: células epiteliales; NU, núcleo; OC: oocisto; SC, esporocisto; SZ, esporozoíto; MZ, merozoíto; Sch, esquizonte; MiG, microgametocito; MaG, macrogametocito; Mi, microgameto; Ma, macrogameto; ZY, cigoto; MAC: macrófago; NK, célula asesina natural; T, linfocito derivado del timo; B, linfocito derivado de la bursa; NO, óxido nítrico. (Yun *et al.*, 2000)

La localización intracelular de estos parásitos explica por qué los linfocitos T citotóxicos juegan un papel importante en la regulación de la coccidiosis. La conformación del receptor  $\alpha\beta$  se ha observado en muchas de las células T, mientras que la conformación del receptor  $\gamma\delta$  se ha observado en porciones más pequeñas (Krshnan *et al.*, 2016; Shivaramaiah *et al.*, 2014; Wattrang *et al.*, 2016). La conformación  $\gamma\delta$  de los receptores T es rara en el sistema circulatorio; y se encuentran principalmente los linfocitos intraepiteliales intestinales (LII) (Mtshali *et al.*, 2020). Se ha planteado la hipótesis de que la conformación  $\gamma\delta$  está implicada en la primera línea de defensa durante la invasión de *Eimeria spp.*, ya que la infección por coccidiosis ocurre naturalmente en las células epiteliales (Smith *et al.*, 2000). Las células T ayudadoras están activas durante la infección inicial con *Eimeria spp.*, lo que sugiere la actividad de las células Th y la citoquina proinflamatoria interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) en diversas actividades celulares (Mtshali *et al.*, 2020). Por lo tanto, las células Th CD4+ inducen respuestas inmunitarias, mientras que Tc CD8+ desempeñan un papel en la inducción de respuestas efectoras contra infecciones (Liu *et al.* 2018).

Los linfocitos intraepiteliales intestinales son más eficaces en las infecciones por coccidia, como lo indica el descubrimiento de que aproximadamente el 78% de los LII expresan marcadores Tc CD8+ (Yun *et al.*, 2000). La eliminación selectiva de las células Tc CD8+ mediante el empleo de anticuerpos monoclonales (mAb) específicos puede conducir a una enfermedad exacerbada, evidente por producción elevada de ooquistes, lo que resulta en una infección cuando se inocula con *E. tenella* (Lillehoj *et al.*, 2004). Estos resultados indicaron la importancia de la respuesta inmune mediada por células durante la infección, especialmente células T citotóxicas CD8+. En la mayoría de los casos, los CD8+ se observan en la lámina propia (LP) en un período de 24 horas después de la infección.

Las citoquinas desempeñan un papel complementario en la inmunidad humoral y mediada por células contra las infecciones. Se utilizan para complementar la mejora de posibles vacunas candidatas que pueden inducir inmunidad duradera (Hoan *et al.*, 2014). Estas proteínas se producen de forma natural, se sabe que tienen un papel crítico en la regulación del sistema inmunitario y se secretan durante la infección. Desempeñan un papel importante como mediadores de la inflamación, proliferación clonal, quimiotaxis, angiogénesis y otros mecanismos celulares (Song *et al.*, 2015). El interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) es una citoquina que tiene la función inmunorreguladora más significativa en la coccidiosis aviar. El interferón gamma es importante en la activación de macrófagos y células NK, la proliferación de células T y la inducción de otras

citoquinas. En un estudio de Qi *et al.* (2013) utilizando dos grupos de pollos de engorde (inmunizados y no inmunizados), la interleucina 12 (IL-12), así como IFN- $\gamma$  en el grupo inmunizado fueron mayores en comparación con el grupo no inmunizado, mostrando su importancia en la inducción de inmunidad protectora. La IL-12 es una citoquina inflamatoria que se vincula con la regulación de las células T y la activación de la citotoxicidad en las células NK (Issaranggun *et al.*, 2018). Sin embargo, Pastor-Fernández *et al.* (2018) reportaron poca o ninguna inducción sérica de IFN- $\gamma$  después del desafío con *E. maxima* en pollos inmunizados con dos antígenos inmunoprotectores (*EtAMA-1* y *EtAMA-2*). Por lo tanto, estas proteínas requieren más investigación para confirmar su papel en el desencadenamiento de la inmunidad contra la coccidiosis.

Actualmente se está prestando atención al uso de citoquinas como adyuvantes de vacunas, ya que ofrecen una alternativa a los compuestos existentes. Los resultados reportados por Song *et al.* (2015) indicaron que el IFN- $\gamma$  inhibió el progreso de la coccidiosis, y podría usarse en el desarrollo de vacunas como un suplemento. Las investigaciones han demostrado la importancia de las citoquinas en la inducción de inmunidad contra el parásito invasor. Sin embargo, no pueden valer por sí mismos, sino que brindan apoyo a las respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas.

## **2.4 CRONOLOGÍA DEL DESARROLLO DE LAS VACUNAS DE COCCIDIA**

La primera vacuna de coccidia fue desarrollada por el prof. Edgar, la cual contenía ooquistes vivos no atenuados de *Eimeria tenella* y fue comercializado en 1952, bajo el nombre de Coccivac, esta vacuna contenía adicionalmente varias especies de *Eimeria* que parasitan pollos, y también se desarrolló una vacuna adicional para pavos (Williams, 2002).

Las investigaciones siguieron y en 1972 el Dr. Long reportó una vacuna bajo el método de atenuación en embrión de pollo en el Reino Unido (Williams, 2002). Sin embargo, no fue hasta 1992 que una línea adaptada a embrión de pollo de *E. tenella* se incluyera con líneas precoces de otras especies en una serie de tres vacunas atenuadas para pollos bajo el nombre comercial de Livacox.

En 1974, el Dr. Jeffers publicó su descubrimiento del proceso de atenuación por precocidad, lo que facilitó el desarrollo de la primera vacuna anticoccidial atenuada a base de

cepas precoces. Esta vacuna atenuada fue diseñada por el Dr. Shirley y en 1989 se comercializó bajo el nombre de Paracox (Williams, 2002). Las formulaciones de las vacunas anticoccidiales vivas disponibles comercialmente para aves de corral se basan en los principios científicos establecidos para las vacunas Coccivac, Paracox y Livacox (Williams, 2002).

Simultáneamente a estos lanzamientos en 1985 el Dr. Lee desarrolló la vacuna Inmucox con las cepas de *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*, *E. brunetti*, *E. necatrix*; esta vacuna es similar al concepto de Coccivac (Akanbi, 2020). En 1996 se registró Supercox, la cual contenía ooquistes de una línea precoz de *E. tenella* y una línea no atenuada de *E. maxima* y *E. acervulina* (Attree *et al.*, 2021). En el 2001 salió al mercado Nobilis-Cox ATM; con tres especies diferentes de *Eimeria* (*E. acervulina*, *E. tenella* y *E. maxima*) relativamente tolerantes a los ionóforos (Vermeulen, 2001). En el año 2002 se registra Advent, que consiste en una mezcla de ooquistes vivos no atenuados de *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* y *Eimeria tenella* (Arendt *et al.*, 2019).

En el año 2003 se registra Eimeriavax 4M, esta vacuna se convirtió en la primera vacuna viva atenuada contra la coccidiosis registrada para su uso en aves de corral en Australia. En Argentina en el año 2005 se registra la vacuna viva atenuada Inmuner Prevencoc E4 formulada con las cepas precoces de *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. máxima* y *E. tenella*; esta vacuna se presentó con la modalidad de aplicación en “Asper-gel” (Sharman, 2010).

En 1995 se realizaron las primeras pruebas para la vacunación *in ovo* contra *Eimeria maxima* (Weber *et al.*, 2003); sin embargo, no fue hasta principios del año 2009 que la vacuna Inovocox fue lanzada al mercado como la primera vacuna contra la coccidiosis específicamente autorizada y diseñada para la administración *in ovo*. Esta vacuna contiene cepas de *E. maxima*, *E. acervulina* y *E. tenella*

En el año 2002 se desarrolló la vacuna CoxAbic, esta es la primera vacuna de subunidades comercialmente disponible contra la coccidiosis. La vacuna consiste en antígenos de la etapa sexual (gametocitos) purificados por afinidad (APGA) de aislados de *Eimeria maxima*, esta vacuna se administra a las reproductoras y se espera tener una transferencia pasiva de anticuerpos a su progenie (Peek *et al.*, 2011).

Las recientes innovaciones en la vacunación anticoccidial incluyen el desarrollo de series de vacunas como HuveGuard MMAT, presentada al mercado en el año 2016; que incluye cepas de *E. maxima*, *E. mitis*, *E. acervulina* y *E. tenella*, específicas para pollos de engorde.

Posteriormente, la vacunación con HuveGuard NB a partir de los 14 días de edad puede utilizarse para vacunar contra *E. necatrix* y *E. brunetti* en aves de ciclo largo (Attree *et al.*, 2021)

Las vacunas a base de cepas atenuadas por precocidad, Evalon para gallinas y Evant para pollos; registradas en el 2016 y 2017 respectivamente; incluyen un adyuvante a base de Montanide incluido en el Hipramune-T para mejorar la eficacia de la vacuna (Attree E. *et al.*, 2021). En estudios de vacunas antigénicas de subunidades de profilina de *E. acervulina* y *E. tenella*, se ha demostrado que los adyuvantes de Montanide mejoran la inmunidad protectora contra la coccidiosis aviar mediante la estimulación observada de la transcripción de IL-2, IL-10, IL-17 e IFN -  $\gamma$ ; y aumento de la infiltración de linfocitos CD8+ en el sitio de inmunización (Jang *et al.*, 2010).

Recientemente en el año 2022 se ha lanzado al mercado la segunda vacuna *in ovo* para coccidia bajo el nombre de Evanovo, esta vacuna contiene las cepas de *E. maxima*, *E. acervulina* y *E. tenella* y *E. praecox* (SENASA, 2022).

## **2.5 TIPOS DE VACUNAS COMERCIALES**

### **2.5.1 Vacunas vivas**

En muchos países aún se administran fármacos anticoccidiales para el control de la coccidiosis; es decir, compuestos terapéuticos que interrumpen las etapas sexuales y asexuales del parásito (Odden *et al.*, 2018). Sin embargo, la diversidad genética de las especies de *Eimeria* permite que el parásito desarrolle rápidamente resistencia anticoccidial. A su vez, limita la capacidad para prevenir eficazmente la enfermedad a largo plazo (Tan *et al.*, 2017).

Esto llevó a la búsqueda y descubrimiento de vacunas anticoccidiales vivas que han logrado prevenir la coccidiosis de manera eficiente durante más de cinco décadas (Marugan *et al.*, 2016). Las vacunas vivas de *Eimeria* consisten en ooquistes esporulados, y pueden ser atenuadas o no atenuadas (Cuadro 2). Las diferencias adicionales se basan en las especies incluidas en cada vacuna, la sensibilidad a los fármacos anticoccidiales y su aplicación.

**Cuadro 2.** Principales vacunas comerciales en el mundo.

<b>Nombre comercial</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Tipo</b>	<b>Especies presentes</b>
Coccivac D2	MSD	No atenuada	<i>Ea, Emax, Et, Emiv, En, Eb</i>
Fortegra	MSD	No atenuada	<i>Ea, Emax, Emax MFP, Et, Emiv</i>
Paracox 5	MSD	Atenuada	<i>Ea, Emax, Emax MFP, Et, Emit</i>
Paracox 8	MSD	Atenuada	<i>Ea, Emax, Emax MFP, Et, Emit, Eb, En, Ep</i>
Immucox 3	Ceva	No atenuada	<i>Ea, Emax, Et</i>
Immucox 5	Ceva	No atenuada	<i>Ea, Emax, Et, En, Eb</i>
Livacox Q	Boehringer Ingelheim	Atenuada	<i>Ea, Emax, Et, En</i>
Livacox T	Boehringer Ingelheim	Atenuada	<i>Ea, Emax, Et</i>
Advent	Huvepharma	No atenuada	<i>Ea, Emax, Et</i>
Evalon	Hipra	Atenuada	<i>Ea, Emax, Et, En, Eb</i>
Evant	Hipra	Atenuada	<i>Ea, Emax, Et, Ep, Emit</i>
Evanovo	Hipra	Atenuada	<i>Ea, Emax, Et, Ep,</i>

Especies: *Ea, E. acervulina; Emax, E. maxima; Emax MFP, E. maxima cepa MFP; Et, E. tenella; Emiv, E. mivati; Eb, E. brunetti; En, E. necatrix; Ep, E. praecox.* (Attree *et al.*, 2021; Witcombe *et al.*, 2014).

La inmunidad inducida por la vacunación con vacunas vivas (al igual que un desafío natural) es específica de especie, por lo que las vacunas deben incluir varias especies diferentes de *Eimeria*, las cuales requieren una replicación independiente en los pollos (Blake *et al.*, 2015). Las diferencias entre los sistemas de producción hacen necesario adaptar las formulaciones de vacunas dependiendo del animal objetivo. Es probable que las vacunas destinadas al uso en pollos de engorde contengan entre tres y cinco especies de *Eimeria*, mientras que las vacunas destinadas para aves de ciclo largo (ponedoras y reproductoras) tengan las siete cepas (Attree *et al.*, 2021). En Perú, están disponibles comercialmente dos vacunas destinadas para la vacunación en pollos (Evant y Fortegra) y cuatro vacunas destinadas para la vacunación de ponedoras y reproductoras (Coccivac D2, Vaxxon Coccivet R, Livacox Q y Evalon) (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Vacunas comercializadas en el Perú.

<b>Nombre comercial</b>	<b>Aves de destino</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Tipo</b>	<b>Especies presentes</b>
Evant	Pollos	Hipra	Atenuada	<i>Ea, Emax, Et, Ep, Emit</i>
Fortegra	Pollos	MSD	No atenuada	<i>Ea, Emax, Emax MFP, Et, Emiv</i>
Coccivac D2	Gallinas	MSD	No atenuada	<i>Ea, Emax, Et, Emiv, En, Eb</i>
Vaxxon Coccivet R	Gallinas	Vaxxinova	No atenuada	<i>Ea, Emax (BV47), Emax (BV52), Et, Eb, En, Em, Ep</i>
Livacox Q	Gallinas	Boehringer Ingelheim	Atenuada	<i>Ea, Emax, Et, En</i>
Evalon	Gallinas	Hipra	Atenuada	<i>Ea, Emax, Et, En, Eb</i>

Especies: *Ea, E. acervulina; Emax, E. maxima; EmaxMFP, E. maxima cepaMFP; Et, E. tenella; Emiv, E. mivati; Eb, E. brunetti; En, E. necatrix; Ep, E. praecox* (Veritrade; 2022)

Una desventaja importante de las vacunas vivas contra la coccidiosis es que con el tiempo pierden su infectividad, por tanto, son vacunas de rápido vencimiento (Peek *et al.*, 2011), según estudios realizados se observa una reducción de la patogenicidad *in vivo* cuando se utilizan ooquistes de más de seis meses de edad (Soutter *et al.*, 2020). Otra preocupación es que la producción de estas vacunas depende del crecimiento *in vivo* de las cepas vacunales en pollos, ya que los ooquistes no se pueden producir de manera eficiente *in vitro*, (Marugan-Hernandez *et al.*, 2020). Estas vacunas tienen que estar acompañadas de un constante monitoreo; ya que, una deficiencia en el manejo durante su aplicación o manejo post vacunación puede resultar en una respuesta inmune insuficiente o coccidiosis clínica en caso de que se usen vacunas no atenuadas. Es fundamental que los fármacos anticoccidiales se retiren del alimento en caso de que la vacuna utilizada sea sensible a estos fármacos (Peek *et al.*, 2011).

#### 2.5.1.1 Vacunas vivas atenuadas

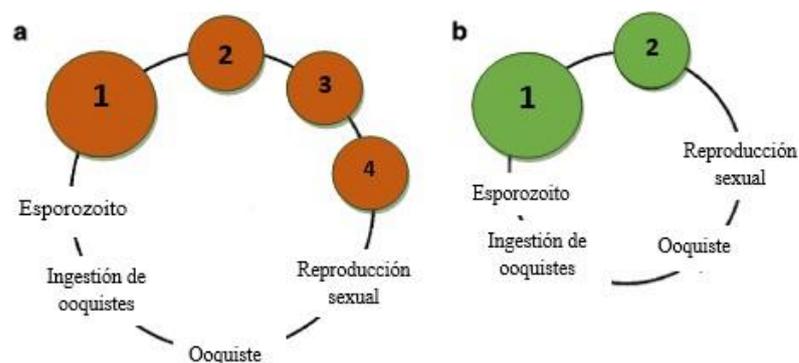
Los primeros intentos para atenuar los parásitos de coccidia fueron por tratamiento térmico o por rayos X, pero ninguno tuvo éxito completo como para inducir preparaciones sólidas y reproducibles (Attree *et al.*, 2021).

Las vacunas anticoccidiales vivas atenuadas consisten en diferentes tipos de cepas de *Eimeria spp.*, las cuales han sido manipuladas en el laboratorio con el fin de disminuir su virulencia (Peek *et al.*, 2011) tienen un margen de seguridad muy alto, incluso si se administran a una dosis diez veces mayor. Actualmente, en Europa sólo están autorizadas las vacunas anticoccidiales vivas atenuadas, a diferencia de gran parte del resto del mundo, donde las vacunas vivas no atenuadas son más comunes (Reid *et al.*, 2014). Hasta la fecha hay poca evidencia de evolución del parásito hacia la resistencia contra estas vacunas, probablemente esto se deba a la compleja variedad de antígenos expresados por el parásito (Ventakas *et al.*, 2019).

Una desventaja de este tipo de vacunas es que tienen una capacidad reproductiva más baja que las vacunas no atenuadas, por lo que se necesita una gran cantidad de pollos para la producción de vacunas. Las vacunas atenuadas cuestan entre dos y seis veces más que las vacunas no atenuadas (Blake *et al.*, 2020)

#### 2.5.1.1.1 Vacunas atenuadas por precocidad

La atenuación por precocidad se caracteriza por un ciclo de vida endógeno más corto, esto se debe a que el número de generaciones de esquizogonia disminuye debido a que las últimas de estas desaparecen al seleccionar los primeros ooquistes liberados como se observa en la Figura 4. Como consecuencia, se reduce el número de ooquistes producidos durante la infección. Sin embargo, el potencial inmunizante se mantiene (Peek *et al.*, 2011).



**Figura 4.** (a) Ciclo de vida de la cepa virulenta de *E. maxima*; y (b) una cepa atenuada por precocidad derivada de ella. Los círculos numerados del uno al cuatro (1-4) representan generaciones de esquizogonia (reproducción asexual) que ocurre en las células epiteliales del intestino. (Shirley, 1997)

Este método fue descubierto por Jeffers (1975), él trabajó con la cepa Wisconsin de *E. tenella*, seleccionando sólo la progenie más temprana de ooquistes. Después de 25 generaciones de selección, el periodo pre-patente del parásito se redujo en aproximadamente 24 h y se identificó una aceleración del desarrollo endógeno del parásito. La llamada "línea precoz" (WisF-125), se caracterizó por una marcada reducción en la reproducción y patogenicidad de los ooquistes. La infección de pollitos con esta línea precoz indujo un alto nivel de inmunidad contra el desafío de la cepa original. Luego de varios intentos se logró atenuar cada una de las siete especies aviares de *Eimeria*. (McDonald *et al.*, 1986).

Posteriormente se desarrollaron líneas precoces para todas las cepas que infectan a los pollos y forman la base de las vacunas comercialmente disponibles en el mercado como Paracox, Livacox, Eimerivax, Eimerivac Plus, Inmuner Prevencoc, Huveguard, Evalon, Evant y recientemente Evanovo (Attree *et al.*, 2021).

#### 2.5.1.1.2 *Vacunas atenuadas en embrión de pollo*

Las cepas atenuadas en embrión de pollo se desarrollaron mediante la inoculación de esporozoitos en la cavidad alantoidea de huevos embrionados. El desarrollo subsiguiente del parásito ocurre dentro de la membrana corioalantoidea y después de pases seriados a largo plazo (más de 100 para la cepa de *E. tenella* de Livacox) resulta una línea menos patógena que la cepa original. Este tipo de vacunas se caracteriza por tener un número reducido de esporozoitos y/o merozoitos (Bedrnik *et al.*, 1995)

La desventaja de este tipo de atenuación es que se ha observado una reversión a la virulencia o una pérdida significativa de la inmunogenicidad. Posteriormente, diferentes investigadores demostraron que no era posible derivar líneas adaptadas al embrión en la mayoría de las otras especies de *Eimeria*; ya que, los esporozoítos no se desarrollaron después de la invasión a la membrana corioalantoidea o dieron lugar a un ciclo endógeno completo (Witcombe *et al.*, 2014).

### 2.5.1.2 Vacunas vivas no atenuadas

Las vacunas vivas no atenuadas utilizan parásitos derivados de cepas de laboratorio o de campo, sin modificación alguna de su virulencia natural. Actualmente, continúan en uso y están registradas en más de 40 países (Sharman *et al.*, 2010). Estas vacunas ofrecen una buena protección vacunal; lo que es más importante, sus rendimientos de fabricación son mucho más altos que los de las vacunas vivas atenuadas, por lo que son considerablemente más económicas (Chapman *et al.*, 2014). Debido a que se replican con alta eficiencia, los parásitos vacunales vivos no atenuados también contribuyen a restaurar la sensibilidad a los anticoccidiales en las granjas avícolas comerciales, extendiendo así la “vida útil” de varios medicamentos. Sin embargo, existen importantes inconvenientes en el uso de vacunas no atenuadas; debido a que los parásitos son totalmente virulentos, conllevan riesgos asociados de enfermedades inducidas por vacunas, lo que ha limitado su aceptación, sobre todo en Europa, donde actualmente no están autorizados (Blake, 2017)

Esta categoría de vacunas es también llamada vacunas de primera de generación, Coccivac fue la primera vacuna no atenuada lanzada al mercado en el año 1952, ha pasado por muchas reformulaciones durante las últimas seis décadas con variantes del producto original, Coccivac D2 para gallinas y Fortegra para pollos son la versión más reciente. En 1985 se desarrolló Inmucox, comercializada por primera vez en Canadá, pero ahora se utilizan formulaciones actualizadas en más de 40 países (Attree *et al.*, 2021)

## 2.6 ADMINISTRACIÓN DE VACUNAS COMERCIALES DE COCCIDIA

Existe la necesidad de encontrar nuevas alternativas prácticas y duraderas para el control de la coccidiosis. Se han utilizado diferentes métodos de aplicación para las vacunas de coccidia, incluida la administración en la granja a través del agua de bebida, rociando en el alimento, y administración en la planta de incubación mediante vacunación de gel y aspersion (Tensa, 2019).

Las primeras formulaciones de vacunas vivas más antiguas, generalmente utilizadas para reproductoras, se administraron en el agua de bebida o en el alimento de pollitos de aproximadamente una semana de edad. Se realizaron estudios indicando que la vacunación en la primera y/o segunda semana de edad mostró una inmunidad más fuerte que las aves inmunizadas al primer día de edad luego de ser retadas a las seis semanas, esto lo atribuían a una menor

musculatura y una superficie de molienda poco desarrollada además de la tardía excreción de los esporozoitos en el intestino delgado debido a bajas concentraciones de tripsina y otras enzimas pancreáticas que afectan la enquistación. Además, se creía que el sistema inmune de los pollitos de un día de edad; al ser inmaduro, no evocaba una fuerte inmunidad contra coccidia como cuando el pollito se acerca a la semana de edad (Long *et al.*, 1977, 1979; Doran *et al.*, 1965).

Sin embargo, algunos trabajos posteriores como Stiff *et al.*, (1993) demostraron que, independientemente de la edad, las aves de corral fueron capaces de establecer una inmunidad protectora completa contra diferentes cepas de *Eimeria* bajo exposición continua de éstas; Lillehoj *et al.* (1988) demostraron que los pollos infectados al primer día de edad eran tan inmunizados como los pollos infectados a tres semanas de edad, luego de ser inoculados con la misma dosis. De igual manera se realizaron diferentes trabajos que demostraron que los pollitos vacunados al primer día de edad son capaces de generar una respuesta inmunitaria eficaz y este principio ahora está bien establecido. (McDonald y Ballingall, 1983; Long *et al.*, 1986; Nakai *et al.*, 1992; Danforth *et al.*, 1997). De hecho, ahora se sabe que incluso los embriones tardíos tienen un sistema inmunológico funcional (Watkins *et al.*, 1995)

La aplicación precisa y uniforme de la vacuna es importante. Una incorrecta vacunación puede resultar en una variación significativa en el número de ooquistes ingeridos, causando una variación incontrolada en el estado inmunológico y la posibilidad de un brote de coccidiosis en pollos con exposición previa y respuestas inmunológicas bajas (Albanese *et al.*, 2018).

#### 2.6.1 Administración individual

Una forma de lograr una exposición uniforme a una vacuna contra la coccidiosis sería inocular oralmente aves individuales con ooquistes. También es factible la inoculación con gota al ojo, donde los ooquistes pasan a través del conducto lagrimal hacia la cavidad nasal y luego llegan al tracto intestinal a través de la orofaringe (Chapman *et al.*, 2002). Estudios como los de Chapman (1996) demostraron que la administración de ooquistes a través del ojo es un método eficaz para introducir la infección con especies de *Eimeria* en aves. La administración individual; ya sea gota al ojo o gota al pico, puede lograr una dosificación muy uniforme. Sin embargo; es poco práctico debido a la mano obra sobre todo en la crianza intensiva de pollos de engorde, donde se deben vacunar miles de aves.

### 2.6.2 Administración vía agua de bebida

Los primeros ensayos en pollos de engorde mostraron que la vacunación a través del agua de bebida utilizando un espesante fue eficaz. Esta es una técnica que ha estado en uso durante mucho tiempo para criadores de pollos de engorde (Williams, 2002); es muy importante considerar que la profundidad promedio de inmersión del pico de un pollito cuando bebe en los bebederos es de 1 cm. Por este motivo las vacunas anticoccidiales administradas en recipientes de agua abiertos, como bebederos tipo campana, pueden tener un agente espesante en la formulación para mantener los ooquistes en suspensión, y no desciendan al fondo del bebedero ocasionando que los pollitos no ingieran los ooquistes (Williams, 2002).

### 2.6.3 Administración por aspersion

El método tradicional de aplicación de la vacuna contra la coccidia es un rociado a base de agua usando una cabina de rociado con gota gruesa. La cobertura de vacunación es esencial, ya que los pollitos que no ingieren ooquistes el día de la eclosión estarán más tarde expuestos a los ooquistes en campo, y esta dosis más alta de ooquistes puede provocar infecciones clínicas y lesiones intestinales (Albanese *et al.*, 2018). Sin embargo; Price (2016) y Velkers (2012) realizaron pruebas en aves criadas en jaula y en piso respectivamente, demostrando que las aves no vacunadas se encuentran igualmente inmunizadas debido a la vacunación por contacto de la progenie vacunada. El número total de ooquistes en una vacuna por aspersion varía de acuerdo con el tamaño de la gota, la cantidad de ooquistes varía entre 200 a 3.000 ooquistes por dosis (Price *et al.*, 2016).

Posteriormente, Albanese *et al.*, (2018) compararon la eficacia de una vacuna comercial contra coccidia aplicada con un diluyente a base de agua, un diluyente de gel más viscoso y un diluyente de gel menos viscoso en múltiples puntos de tiempo después de la vacunación para cuantificar la diseminación de ooquistes de la vacuna. Los pollos fueron desafiados a los 16 días de edad con ooquistes de *Eimeria maxima* y siete días después del desafío se evaluaron las ganancias de peso corporal, lesiones macroscópicas y microscópicas. Todos los grupos vacunados parecieron estar protegidos en función del aumento de peso corporal y puntuación de lesiones. Los resultados de este proyecto indican que todas las aplicaciones de la vacuna son efectivas para proteger contra el desafío de *Eimeria maxima* cuando se utiliza una dosis adecuada de vacuna que permite repetir el ciclo de ooquistes en la camada después de la vacunación.

Hay varios equipos de vacunación en aspersión comercialmente disponibles para la administración de todo tipo de vacunas de coccidia utilizando gota gruesa. Existen dos tipos de equipos de vacunación en aspersión, las manuales y las inteligentes (Williams, 2002). De estos últimos los más importantes son: Desvac Duo Spray and gel, Hipraspray y Spraycox III.

#### 2.6.4 Administración en gel

Los diluyentes de gel pueden tener viscosidades variables y se "dejan caer" sobre los pollitos con un aplicador barra. Las gotas de gel permanecen intactas en la superficie de las aves durante más tiempo que las gotas a base de agua, lo que permite a los pollitos más tiempo para acicalarse e ingerir ooquistes. (Albanese *et al*, 2018).

Jenkins *et al.*, (2013) evaluaron la eficacia de las gotas de gel en comparación con una vacunación en aspersión que contienen una mezcla de ooquistes de *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* y *Eimeria tenella*. Los pollitos recién nacidos fueron vacunados paralelamente en dos grupos; uno con una suspensión acuosa en aspersión y otro con alimentos que contenían perlas de gel, recibiendo un número equivalente de ooquistes de *Eimeria*. A las cuatro semanas de edad fueron desafiados con *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella*. Los pollos inmunizados con ooquistes de *Eimeria* en perlas de gel o por vacunación en aerosol mostraron significativamente un mayor aumento de peso en comparación con los controles no inmunizados. La conversión alimenticia también mostró una mejora significativa en ambos grupos vacunados en relación con los controles no inmunizados. La excreción de ooquistes después del desafío de *Eimeria* por todos los grupos inmunizados fue aproximadamente 10 veces menor que en los controles no inmunizados. Estos hallazgos indican que la eficacia de inmunización de las perlas de gel y la vacunación en aerosol son eficaces contra la coccidiosis.

Posteriormente Tensa *et al.*, (2019) realizaron un estudio similar comparando la vacunación en gel y aspersión. Las vacunas se mezclaron en diluyentes de gel y aspersión siguiendo las instrucciones del proveedor; y se tomaron muestras para evaluar los ooquistes en suspensión midiendo el tamaño y el número de gotas aplicadas sobre una caja de acrílico en una canasta de pollitos. Los resultados mostraron que no hubo sedimentación después de mezclar cualquiera de los diluyentes. Como se esperaba, el número de ooquistes por gota aumentó a medida que aumentaba el tamaño de la gota en aspersión, pero se mantuvo constante en el tamaño uniforme de las gotas de gel. Se demostró que independientemente de la vacuna o el diluyente los

ooquistes en ambos casos se distribuyeron uniformemente y se mantuvieron en la proporción adecuada. Lo que indica que cada sistema de administración puede administrar la vacuna de manera eficaz sin afectar de manera diferente a ninguna especie de coccidios en las vacunas.

#### 2.6.5 Administración vía *in ovo*

La vacunación *in ovo* de embriones implica la administración controlada de una dosis precisa de ooquistes de *Eimeria* por embrión. Esta vacunación se realiza entre los 18 y 19 días de incubación (Williams, 2002).

En los años 90 se realizaron los primeros estudios de la vacunación *in ovo* contra la coccidiosis. En 1995 se intentó vacunar pollos de engorde contra *Eimeria* a los 17 y 18 días de incubación. Aunque encontraron evidencia de infección en los pollitos recién nacidos, estas aves no indujeron inmunidad al ser desafiadas a los 10 días de edad (Watkins, 1995).

Provaznikova (1997) realizó una vacunación *in ovo* inoculando esporozoitos de *E. tenella*; por otro lado, Weber (2003) inoculó diferentes estadios del parásito (esporozoítos, esporocistos u oocistos de *E. tenella*). En ambas pruebas se logró la inmunidad frente al desafío de coccidiosis.

Los estudios siguieron y Weber (2004) investigó la inmunización de pollos mediante inyección *in ovo* de estadios infecciosos de cinco especies de *Eimeria*. Se inocularon huevos fértiles en el día 18 de incubación con ooquistes de *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. praecox* o *E. brunetti*. Luego del desafío, los resultados demostraron que es factible la inmunización de pollos de engorde contra varias especies de coccidias mediante inyección *in ovo* de ooquistes.

Sokale *et al.* (2016) administraron vía *in ovo* una vacuna comercial contra la coccidiosis que contenía ooquistes de *Eimeria acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella* (Inovocox EM1). Se utilizaron huevos embrionados de pollos de engorde Ross 708 en 18.5 días de incubación. Se observó que la incubabilidad de los huevos inoculados y el peso corporal de los pollitos en el día 21.5 de incubación no se vieron afectados significativamente. Sin embargo, el porcentaje de inoculaciones en el cuerpo del embrión y en el amnios fue de 15.3% y 84.8% respectivamente. La eliminación de ooquistes comenzó 4 días después de la eclosión y continuó hasta el día 13,

con una eliminación máxima observada en el día siete después del nacimiento. Aunque la inyección *in ovo* de la vacuna evidentemente indujo una infección inducida por la vacuna en el embrión, no tuvo ningún efecto perjudicial sobre la embriogénesis de los pollos de engorde o la calidad de los pollitos en incubación. Los resultados de este estudio sugieren que la inyección de la vacuna entre los días 18.0 y 18.8 de incubación puede proporcionar de forma segura y eficaz una estimulación temprana al sistema inmunitario de las aves, requisito para la protección contra posteriores desafíos coccidiales.

En el mismo año Sokale *et al.* (2017) investigaron los efectos de la misma vacuna en el rendimiento de los pollos de engorde Ross 708 durante 14 días después de la eclosión. Se empleó el mismo diseño experimental, con la diferencia que ahora se evaluó la mortalidad, el consumo de alimento, la ganancia de peso corporal y la conversión alimenticia. Ninguna de las variables de rendimiento difirió significativamente entre los grupos de tratamiento inyectados con diluyente e inyectados con vacuna. Sin embargo; el peso corporal en el día 14, el consumo de alimento entre los días 7 y 14, y la ganancia de peso corporal y el consumo de alimento entre los días 0 y 14 fueron significativamente mayores en los grupos de tratamiento con inyección de diluyente y de vacuna en comparación con el grupo de control sin inyección. Por lo tanto, estos resultados posteriores confirman que la inyección de la vacuna entre los días 18.0 y 18.8 de incubación es segura.

Siguiendo con las investigaciones, Sokale *et al.* (2018) determinaron además los efectos de la vacuna EM1 *in ovo* en diferentes variables de pollitos recién nacidos y en el rendimiento de los pollos de engorde Ross 708 a los 35 días posteriores a la eclosión. La incubabilidad y el peso corporal absoluto al nacer no se vieron afectados por las dosis de 1x o 10x de la vacuna, pero la dosis 10x disminuyó el peso corporal al nacer comparado con el estándar y en ambas dosis disminuyó la ganancia de peso corporal a los 21 a 28 días y 0 a 35 días. Aunque se observaron algunos efectos negativos en el rendimiento después del día 14 en comparación con los de Sokale *et al.* (2017b), los resultados de Sokale *et al.* (2018) reafirmaron las conclusiones de Sokale *et al.* (2017a), y sugirió además que la dosis 1x de la vacuna puede usarse de manera más segura al tiempo que garantiza un ciclo de ooquistes adecuado.

En recientes investigaciones Sokale *et al.*, (2021) realizaron un estudio donde se evaluó los efectos de dos edades de vacunación *in ovo* (18.5 y 19.0) para determinar si la diferencia en la edad del embrión puede influir en un efecto de la vacuna sobre los parámetros productivos del pollo de engorde; los resultados indicaron que no hubo diferencia significativa en el ciclo de la coccidiosis entre ambos grupos. Demostrando así, que el uso de una vacuna viva contra la coccidiosis aplicada *in ovo* se ha convertido en un método eficaz para controlar la coccidiosis, especialmente en la producción de pollos de engorde sin antibióticos.

## **2.7 INVESTIGACIONES PARA FUTURAS VACUNAS DE COCCIDIA**

### **2.7.1 Vacunas de ácido desoxirribonucleico (ADN)**

Las vacunas de ADN se basan en la inmunización con un plásmido que contiene la información genética de uno o varios genes que codifican para proteínas inmunogénicas de determinado patógeno. Estas vacunas estimulan la inmunidad celular al introducir un segmento de ADN del parásito al hospedador. (Ventakas *et al.*, 2019)

Los vectores del plásmido introducen secuencias de nucleótidos desnudos que codifican la porción antigénica del parásito en la célula del hospedador, donde se capta, traslada y expresa la proteína deseada. Se realizaron investigaciones donde se observó una reducción del 53.7% en la tasa de eliminación de ooquistes junto con una inmunogenicidad satisfactoria y efectos de protección inmunitaria en pollos de engorde tratados con el vector de ADN pcDNA3.1, el cual codifica la proteína Gam56 de *E. maxima* (Xu *et al.*, 2013).

Panebra y Lillehoj (2019) presentaron un estudio similar mostrando una respuesta efectiva de anticuerpos, aumento de peso, y protección inmune en pollos desafiados con *E. acervulina* cuando se vacuna con EF-1 $\alpha$  (vacunas de ADN de *E. tenella*) y/o chIL-7 (vacuna de ADN de citocina del hospedador) junto con Montanide Gel 01.

Entre las ventajas que pueden atribuirse al empleo de las vacunas de ADN, pueden mencionarse: su capacidad para estimular una respuesta inmune de tipo celular citotóxica mediada por linfocitos T CD8+, la cual no se logra con las vacunas de subunidades recombinantes, además de que se obvia el empleo de vacunas vivas y los manejos asociados a este tipo de vacunación; así también como su bajo costo de producción y el hecho que no requieren de cadena de frío para su distribución, dada su mayor estabilidad (Diaz *et al.*, 2006).

Aunque las vacunas de ADN inducen fuertes respuestas inmunitarias celulares a largo plazo, se limita a la proteína inmunógena y se corre el riesgo de afectar a los genes que controlan el crecimiento celular (Patra *et al.*, 2017).

### 2.7.2 Vacunas anticoccidiales de subunidades recombinantes

Las vacunas de subunidades utilizan antígenos seguros como proteínas de superficie o antígenos internos asociados con orgánulos como micronema, roptría y proteínas refractivas de esporozoítos o merozoítos (Clark *et al.*, 2016) (Cuadro 4). Estas vacunas se producen a través de la inserción de un gen que codifica un antígeno que estimula una respuesta inmune en un vector. Las vacunas recombinantes o los antígenos vectorizados funcionan induciendo una protección inmunológica (Blake *et al.*, 2014). Esto, a su vez, reduce las mutaciones genéticas selectivas, que podrían conducir a la resistencia a las vacunas. Esto mejora significativamente la eficacia de la vacuna a largo plazo (Lin *et al.*, 2017).

**Cuadro 4.** Antígenos inmunogénicos contra la coccidiosis en aves de corral.

<b>Potenciales antígenos inmunogénicos contra coccidiosis en pollos</b>				
<b>Antígeno</b>	<b>Función atribuida</b>	<b><i>Eimeria</i> spp.</b>	<b>Efecto sobre los pollos</b>	<b>Referencia</b>
Profilina	Involucrada en los estadios invasivo, esporozoítico y merozoítico del ciclo de vida de la <i>Eimeria</i>	<i>Et., Ea., Emax</i>	Inmunidad inducida, score de lesiones y eliminación de ooquistes reducida	Ding <i>et al.</i> (2004); Lillehoj <i>et al.</i> (2017); Tang <i>et al.</i> (2018)
AMA1	Invasión del hospedador	<i>Emax, Et</i>	Eliminación de ooquistes reducida	Blake <i>et al.</i> (2011); Arnott <i>et al.</i> (2014); Blake <i>et al.</i> (2015)
MIC-2	Invasión a la célula hospedadora	<i>Et</i>	Mayor ganancia de peso, eliminación de ooquistes reducida	Barta <i>et al.</i> (2018); Huang (2018)
MIC3/5/7	Invasión a la célula hospedadora	<i>Emax, Emit, Et</i>	Inmunidad inducida, mayor ganancia de peso, eliminación de ooquistes reducida	Barta <i>et al.</i> (2018); Huang (2018)
IMP-1	Proteínas de asociación de membrana	<i>Emax</i>	Inmunidad inducida, eliminación de ooquistes reducida	Kundu <i>et al.</i> (2017); Jenkins <i>et al.</i> (2018)
LDH	Facilita la co-expresión de <i>IL-2</i> e <i>IFN-γ</i> séricas	<i>Ea</i>	Lesiones duodenales reducidas, mayor ganancia de peso, eliminación de ooquistes reducida	Song <i>et al.</i> (2010)
TA4	Invasión del hospedador	<i>Et</i>	Inmunidad inducida	Reid <i>et al.</i> (2014)

SO7	Proteína refráctil	<i>Et</i>	Score de lesiones incrementado, mayor ganancia de peso, eliminación de ooquistes reducida	Klotz <i>et al.</i> (2007); Rafiqi <i>et al.</i> (2018)
GAPDH	Enzima glicolítica	<i>E<sub>max</sub>, E<sub>a</sub>, E<sub>t</sub></i>	CD4+ y CD8+ incrementada, inmunidad inducida, score de lesiones reducido, mayor ganancia de peso, eliminación de ooquistes reducida	Tian <i>et al.</i> (2017)
Em 14-3-3	Controla el ciclo de la célula, localización de proteína, señal mitogénica de transducción y muerte apoptótica de la célula	<i>E<sub>max</sub></i>	Inmunidad inducida, score de lesiones reducido, eliminación de ooquistes reducida	Liu <i>et al.</i> (2017); Liu <i>et al.</i> (2018)
Gam22/230	Formación de la pared del ooquiste	<i>E<sub>n</sub>, E<sub>t</sub>, E<sub>max</sub></i>	Inmunidad inducida	Jang <i>et al.</i> (2010); Xu <i>et al.</i> (2013); Liu <i>et al.</i> (2014)
Gam56	Formación de la pared del ooquiste	<i>E<sub>max</sub></i>	Inmunidad inducida, mayor ganancia de peso, eliminación de ooquistes reducida	Jang <i>et al.</i> (2010); Xu <i>et al.</i> (2013); Liu <i>et al.</i> (2014)
Gam82	Formación de la pared del ooquiste	<i>E<sub>max</sub></i>	Mayor ganancia de peso, eliminación de ooquistes reducida	Jang <i>et al.</i> (2010); Xu <i>et al.</i> (2013); Liu <i>et al.</i> (2014)

---

Especies *Et, E. tenella; E<sub>a</sub>, E. acervulina; E<sub>max</sub>, E. maxima; E<sub>mit</sub>, E. mitis*) (Adaptado de Ventakas *et al.* 2019)

### 2.7.2.1 Identificación de antígenos

Muchos estudios se han dirigido hacia la identificación de nuevos antígenos protectores de *Eimeria*, los cuales se identifican como posibles candidatos a vacunas en función de su invasión, interacción y replicación entre el hospedador y el parásito (Suprihati *et al.*, 2018). La mayoría de estas proteínas se secretan dentro de los orgánulos de micronemas situados en la punta apical del parásito para permitir la unión de la motilidad deslizante y la entrada y salida de su respectivo hospedador (Liu *et al.* 2018).

Posiblemente el antígeno más usado para la elaboración de una vacuna candidata a subunidad anticoccidial es la profilina, nombrada también como 3-1E (Ding *et al.*, 2004). La profilina es un antígeno de superficie conservado tanto de merozoítos como de esporozoítos de *E. acervulina*, *E. tenella* y *E. maxima*. La Profilina codifica un marco de lectura abierto de 170 aa que se expresan en las etapas invasivas de esporozoítos y merozoítos de *Eimeria* (Lillehoj *et al.*, 2017). La proteína recombinante ha inducido con éxito la inmunidad mediada por células contra especies vivas de *Eimeria*, como lo ilustran Tang *et al.* (2018) que informaron sobre una

inmunidad protectora mejorada contra *E. tenella* en aves inmunizadas con *Et-EmPro* expresando la profilina clonada de *E. maxima* en comparación con el tipo salvaje. Lillehoj *et al.* (2017) informaron resultados similares con un aumento significativo en las relaciones de aumento de peso y una disminución en las puntuaciones de lesión en pollos infectados con coccidias tratados con antígenos de profilina expresados por *E. coli* en comparación con el control.

Las proteínas de antígeno de membrana apical (AMA-1), inducen una fuerte protección contra el desafío homólogo cuando se administra como ADN o vacunas de proteínas recombinantes expresadas por bacterias; también es un antígeno bien estudiado en otros parásitos apicomplexos estrechamente relacionados (Arnott *et al.*, 2014; Blake *et al.*, 2011). En un estudio realizado por Blake (2015) esta proteína que fue extraída de *E. maxima* y *E. tenella*, redujo la producción de oocistos en un 66% y 48%, respectivamente. El uso de AMA1 para vacunar pollos bajo condiciones experimentales reduce consistentemente la replicación del parásito en un 40-80% dependiendo de la plataforma de vacunación utilizada (Blake *et al.*, 2011).

Las proteínas de orgánulos micronema (MIC) son cruciales para la invasión y motilidad del parásito (Barta *et al.*, 2018). Los MIC se secretan en las primeras etapas de la invasión y ayudan en la unión del parásito a las células hospedador y la posterior formación del sistema de actinomicosina del parásito creando una plataforma para la invasión (Huang *et al.*, 2018). Hasta la fecha se han notificado nueve MIC (Barta *et al.*, 2018). Huang *et al.* (2018) demostraron un rápido aumento en la secreción de micronemas al contacto hospedador-parásito, bloqueando posteriormente la invasión del hospedador. Estudios demostraron que la vacunación con *rEmiMIC3* (micronema 3 de *Eimeria mitis*) aumentó notablemente el aumento de peso y disminuyó la producción de oocistos de los pollos vacunados después de la infección de desafío.

La proteína inmunomapeada 1 (IMP-1) está localizada en la membrana celular del esporozoito, contiene sitios de palmitoilación y miristoilación que confieren proteínas de asociación de membrana (Jenkins *et al.*, 2018). Kundu *et al.* (2017) reportaron un aumento en los sueros de Ig-Y e IL-4 y una reducción del 79% en la replicación del parásito en pollos vacunados con una proteína inmunomapeada recombinante de *E. tenella* (*EtIMP-1*). Jenkis *et al.* (2018), demostraron que la incorporación del antígeno IMP-1 de *E. maxima* (*EmaxIMP1*), en nanopartículas de poliestireno provocó una inmunidad completa contra la infección de *E. maxima*. En investigaciones recientes Tang *et al.* (2018) observaron una protección parcial de los pollos inmunizados con una vacuna de antígeno *EmIMP1* contra infecciones posteriores de *E. maxima*.

Song *et al.*, (2010) confirmaron la eficacia de las vacunas de antígenos recombinantes utilizando un antígeno de lactato deshidrogenasa (LDH) que disminuyó la producción de ooquistes, lesiones duodenales y la pérdida de peso corporal.

EL antígeno TA4, más tarde identificado como el antígeno de superficie anclado 1 (SAG-1) glicosilfosfatidilinositol (GPI) específico de esporozoíto, es una proteína de superficie de *Eimeria* codificada por múltiples familias de genes. SAG-1 es capaz de unir células epiteliales cultivadas y juega un papel muy importante en la unión del parásito al hospedador (Reid *et al.*, 2014).

La proteína refractaria SO7 es altamente inmunogénica, está involucrada en las etapas infecciosas iniciales de la *Eimeria*. Se comprobó una disminución de 40 – 55% en la excreción de ooquistes en tres grupos de aves inmunizadas con SO7 después del desafío (Klotz *et al.*, 2007). Posteriormente nuevos estudios demostraron un aumento significativo en la proliferación de linfocitos y los niveles de sueros de IFN- $\gamma$  e IgY en pollos inmunizados con una proteína rEtSO7 de *E. tenella* (Rafiqi *et al.*, 2018).

El antígeno gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es uno de los antígenos inmunogénicos comunes entre *Eimeria tenella*, *E. acervulina* y *E. maxima*. Tian *et al.* (2017) demostraron un aumento significativo en la proporción de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, la producción de citocinas de IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 y los niveles de anticuerpos IgG en comparación con los controles. La vacunación aumentó las ganancias de peso, disminuyó la producción de ooquistes, alivió las lesiones entéricas en comparación con los controles e indujo un índice anticoccidial moderado. Demostrando así que el antígeno común coccidial de GAPDH indujo una respuesta inmune humoral y celular significativa y una protección eficaz contra *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. maxima* y la infección mixta de las tres especies de *Eimeria*.

Las proteínas 14-3-3 son una familia de moléculas reguladoras conservadas que se expresan en todas las células eucariotas. Y juegan papeles importantes en procesos ampliamente reguladores, como la transducción de señales mitogénicas, la muerte celular apoptótica, el control del ciclo celular y la localización de proteínas (Liu *et al.*, 2017). Liu *et al.* (2018) informaron el uso potencial de Em 14-3-3 como una vacuna efectiva contra *E. máxima* ya que aumentó el peso corporal, el conteo de CD4<sup>+</sup> e indujo un eficiente efecto anticoccidial.

Las proteínas de gametocitos (Gam) de *Eimeria* spp. son componentes importantes de la pared de los ooquistes y algunos se han utilizado para desarrollar vacunas que bloquean la transmisión contra la coccidiosis aviar. Se ha clonado y secuenciado un pequeño número de genes

que codifican proteínas de gametocitos a partir de especies aviares de *Eimeria*, como *Em gam56*, *Em gam82* y *Em gam230* (una secuencia parcial) en *E. maxima*; *Et gam56*, *Et gam59* y *Et gam22* en *E. tenella* y *Ea gam56* en *E. acervulina* (una secuencia parcial) (Liu *et al.*, 2014). Jang *et al.* (2010), demostraron que la vacunación con Gam82 estimuló la producción de anticuerpos séricos específicos de antígeno e indujo mayores niveles de ARNm de IL-2 e IL-15 en comparación con los controles no vacunados, demostrando así que la proteína recombinante Gam82 protege contra *E. maxima* y aumenta la inmunidad humoral y celular. Xu *et al.* (2013), realizaron investigaciones con la vacuna Gam56, obtuvieron como resultado una mayor proliferación de linfocitos y niveles de anticuerpos, mayor ganancia de peso corporal (89.7 %) y la mayor reducción de la eliminación de ooquistes (53.7 %).

#### 2.7.2.2 Combinaciones antígenos recombinantes

Una infección por coccidia es el resultado de una combinación de varias especies de *Eimeria*, cada una de las cuales puede diferir significativamente en términos de morfología y fisiología (Brown-Jordan *et al.*, 2018). Por lo tanto, se ha visto la necesidad de combinar múltiples antígenos de *Eimeria* en una sola formulación (Blake *et al.*, 2017). Esto llevó a la construcción de vacunas multivalentes de *Eimeria* que son capaces de inducir inmunidad celular contra una serie de especies de *Eimeria* (Meunier *et al.*, 2016). Song *et al.* (2015) demostró disminución en la producción de ooquistes y lesiones entéricas, junto con un aumento de peso corporal en aves vacunadas con antígenos multivalentes pVAX1-NA4-1-TA4-1-LDH-2-EMCDPK-1-IL2 y pVAX1-NA4-1-TA4-1-LDH-2-EMCDPK-1 y luego desafiadas con *E. acervulina*, *E. tenella*, *E. maxima* y *E. necatrix*. Tian *et al.* (2017) informaron resultados similares sobre la eficiencia de una vacuna anticoccidial vectorizada pET-32a multivalente que contiene genes *EaGAPDH* y *EmGAPDH* en aves desafiadas por *Eimeria*.

Las especies transgénicas de *Eimeria* sirven como una poderosa herramienta en el desarrollo de la vacuna anticoccidial multivalente al generar líneas de parásitos que expresan antígenos que se dirigen a múltiples especies de *Eimeria*; sin embargo, la identificación óptima de la combinación de antígenos depende de la evaluación de la diversidad antigénica preexistente dentro de cada antígeno identificado (Pastor-Fernández *et al.*, 2018).

### 2.7.2.3 Adyuvantes

Los adyuvantes son sustancias que mejoran la inmunidad inducida (Li *et al.* 2018). Los adyuvantes Montanide IMS 106 e IMS 101 son una dispersión de nanopartículas líquidas que mejoran las respuestas inmunes y son compatibles con varios antígenos tamponados (Jang *et al.*, 2012). Lillehoj *et al.* (2017) demostraron el potencial de la profilina purificada recombinante y las proteínas NetB mezcladas con adyuvantes IMS en la lucha contra la coccidiosis. Los pollos tratados con los adyuvantes mostraron un aumento significativo de las ganancias de peso corporal en el grupo infectado con coccidia comparado con el grupo tratado solo con profilina. Rafiqi *et al.* (2018) informaron resultados similares en pollos de engorde inmunizados con el antígeno rEtSO7 utilizando como adyuvante Montanide ISA 71 VG. Además del aumento del peso corporal, las vacunas adyuvantes mostraron una reducción en las puntuaciones de las lesiones y los resultados de oquistes en comparación con los controles.

Zhang *et al.* (2012) demostraron una mayor eficiencia de las vacunas recombinantes utilizando los ginsenósidos como adyuvante. Los ginsenósidos se extraen de la raíz de una planta de ginseng y son capaces de estimular las respuestas inmunes humorales y celulares contra una variedad de infecciones (Dkhil *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018). Por lo que el nivel de anticuerpos específicos de la profilina y el aumento de peso corporal fueron significativamente más altos en los grupos vacunados con profilina y ginsoma en comparación con los grupos tratados únicamente con profilina y los controles (Zhang *et al.*, 2012).

### 2.7.2.4 Vectores

El desarrollo de vacunas recombinantes requiere un vector que distribuya el antígeno al sitio respectivo en cantidades adecuadas para iniciar una respuesta inmune (Bottje *et al.*, 2018). La entrega de los epítomos a sus respectivos objetivos es uno de los eventos más importantes en el desarrollo recombinante, ya que el epítomo permite la locomoción y la invasión del vector (Sundar *et al.*, 2017). Se han reportado varios vectores, incluidos vectores de expresión eucariota como cepas de *Salmonella*, *E. coli*, vectores pVAX1, levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, pMV361 e incluso *Eimeria* transgénica (Sun *et al.*, 2014; Bottje *et al.*, 2018).

Las cepas de *Salmonella* son vectores adecuados, ya que los genes bacterianos pueden mutar o atenuarse para crear bacterias con baja o nula patogenicidad. La *salmonella* puede sobrevivir al tracto gastrointestinal del hospedador y desarrollar una respuesta inmune de la mucosa. Bottje *et al.* (2018) utilizaron *Salmonella* como vector para entregar un antígeno de *E.*

*maxima*, *EmTFP250*, a las gallinas. Sun *et al.* (2014) utilizaron un vector *S. cerevisiae* que contiene una proteína micronema *EtMIC-2* para estimular una respuesta inmune en pollos. Esto, a su vez, redujo la producción de ooquistes y la patología cecal al tiempo que aumentaba el aumento de peso corporal. Li *et al.* (2018) informaron resultados similares generados por una vacuna recombinante *EtAMA1-Lactococcus lactis*.

El parásito *Eimeria* transgénico como vector se construye a través de una transfección estable o transitoria, que implica la integración de ADN extraño en el genoma del parásito *Eimeria* o la expresión del ADN como un plásmido (Suarez *et al.*, 2017). Algunas de las ventajas del parásito *Eimeria* como vector de vacunas vivas incluyen la especificidad del hospedador y gran tamaño del genoma que puede tolerar la inserción y expresión de varios antígenos extraños (Marugan-Hernandez *et al.*, 2016). En un informe reciente de Tang *et al.* (2018), los pollos vacunados con *E. tenella* transgénica que expresa la proteína inmunomapeada (IMP-1) de *E. maxima* (*Et-EmIMP1*) mostraron protección parcial contra *E. maxima* y la infección del parásito parental (*E. tenella*) en comparación con el control. Esto se evaluó por la producción reducida de ooquistes y el IFN- $\gamma$  específico del antígeno. También se informó la protección contra la cepa de *E. maxima* en pollos vacunados con *E. tenella* transgénica (*Et-EmIMP1*) (Pastor-Fernández *et al.*, 2019). Tang *et al.* (2019) informaron recientemente la eficacia protectora de dos parásitos transgénicos de *E. tenella* que expresan antígenos vacunales de *E. maxima*, el estudio informó que las respuestas celulares específicas del antígeno mejoraron significativamente en pollos vacunados con línea de *Eimeria* transgénica doble que expresa tanto AMA-1 como IMP-1 de *E. maxima* en comparación con aquellos vacunados con una línea de *Eimeria* transgénica única que expresa cualquiera de los antígenos. Además de los antígenos inmunodominantes de *Eimeria*, también se ha demostrado la versatilidad del parásito transgénico de *Eimeria* como vehículo de administración de vacunas para expresar otros antígenos parásitos y virales (Marugan-Hernández *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2016).

Shivaramaiah *et al.* (2014) propusieron el uso de plantas como una fuente de vacuna comestible y menos intrusiva contra la coccidiosis. Las plantas pueden ser modificadas genéticamente para expresar antígenos parásitos con el fin de iniciar respuestas inmunes (Ventakas *et al.*, 2019). *Nicotiana tabacum* modificada para expresar *EtMIC1* y *EtMIC2* de *E. tenella* como proteínas de fusión marcadas con polihistidina indicaron una reducción en la producción de ooquistes junto con una alta producción de anticuerpos en aves alimentadas con la planta (Jacob *et al.*, 2013). Sathish *et al.* (2017) informaron un aumento del 39% en el aumento de peso junto con una reducción del 69% en la producción de ooquistes en aves inmunizadas con

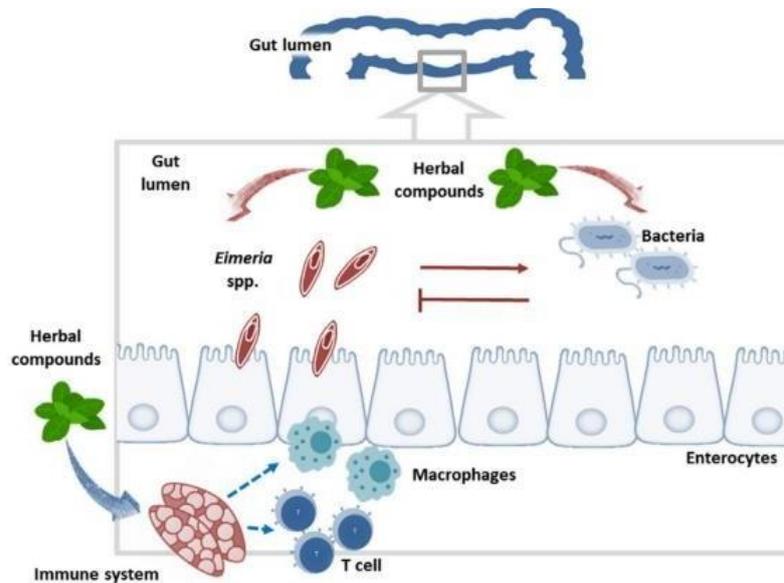
una planta transgénica de Tabaco que expresaba la proteína Gam82. La tecnología de vacunas basada en plantas es relativamente rentable, ya que la vacuna permite a los avicultores dosificar vacunas estables con piensos que permiten la protección mucosa y sistémica (Aswathi *et al.*, 2014).

## 2.8 ESTRATEGIAS ALTERNATIVAS PARA EL CONTROL DE LA COCCIDIOSIS

Los desafíos para el control efectivo de la coccidiosis planteados por la resistencia a la quimioprofilaxis o la disponibilidad limitada de vacunas de costo efectivo han impulsado la exploración de estrategias alternativas (Ritzi *et al.*, 2014; El Shall *et al.*, 2021), identificando una gama de probióticos y suplementos dietéticos como aceites esenciales u otros productos herbales (Quiroz-Castañeda *et al.*, 2015).

### 2.8.1 Suplementación con probióticos

Los aditivos probióticos son microorganismos vivos no patógenos, se considera que tienen un beneficio para la salud cuando se administran a los pollos, comúnmente a través de su dieta, generalmente con el objetivo de mejorar y mantener un microbioma intestinal saludable (Ritzi *et al.*, 2014). Se considera que los probióticos desempeñan una mejora del sistema inmunológico del hospedador y la protección contra algunos patógenos intestinales, incluida la coccidiosis (Dalloul *et al.*, 2005) (Figura 5). Los probióticos más utilizados son: *Bacillus*, *Bifidobacteria*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Saccharomyces* (Gaggìa *et al.*, 2010). La eficacia de los probióticos en la protección contra las lesiones patológicas causadas por especies de *Eimeria* no ha sido demostrada de manera definitiva (Giannenas *et al.*, 2012). Sin embargo, algunos estudios han demostrado que el tratamiento con probióticos, como *Lactobacillus salivarius* y *L. acidophilus*, se asocia con una reducción de la diseminación de ooquistes, mientras que la suplementación con un *Bacillus* se ha asociado a puntuaciones de lesiones intestinales más bajas en comparación con los controles no tratados (Lee *et al.*, 2010; Giannenas *et al.*, 2012). Por lo general, los estudios sobre la eficacia de los probióticos concluyen que pueden aliviar los efectos de la coccidiosis cuando los medicamentos anticoccidiales no están en uso; sin embargo, cuando se compara directamente el rendimiento, los medicamentos anticoccidiales tienden a superar el tratamiento probiótico, particularmente en el pico de infección y en medidas como el desprendimiento de ooquistes o la relación de conversión alimenticia (Giannenas *et al.*, 2012; Bozkurt *et al.*, 2014; Ritzi *et al.*, 2014).



**Figura 5.** Células T asociadas al intestino, macrófagos y el proceso de la respuesta inmunitaria de los pollos a los compuestos anticoccidianos a base de hierbas (El Shall *et al.*, 2021)

### 2.8.2 Suplementación con aceites esenciales y ácidos orgánicos

Varios aceites esenciales también se han sugerido como alternativas para el control de la coccidiosis, comúnmente debido a su acción antiparasitaria reportada. Algunos, como el orégano, el tomillo y el ajo se han asociado con una menor carga de enfermedad en términos de un mejor aumento de peso corporal, una reducción de la diseminación de ooquistes después del desafío y menos lesiones patológicas (Giannenas *et al.*, 2003; Küçükyilmaz *et al.*, 2012; Abou-Elkhair *et al.*, 2014). Sin embargo, la eficacia de los aceites esenciales no está bien caracterizada.

En general, el uso de medicamentos anticoccidiales supera el tratamiento con aceites esenciales y, en algunos casos, la toxicidad de los aceites esenciales utilizados puede resultar en un rendimiento deficiente, lo que indica la importancia de establecer una concentración efectiva (Küçükyilmaz *et al.*, 2012; Attree *et al.*, 2021). Por lo tanto, los aceites esenciales pueden ser un suplemento útil para las dietas de pollo para proporcionar algunos efectos anticoccidiales y mejorar la salud intestinal del hospedador, aunque es poco probable que reemplacen a los medicamentos anticoccidiales. La suplementación dietética con ácidos orgánicos como el ácido acético y el butirato también se ha sugerido para el control de la coccidiosis debido a la mejora observada en el aumento de peso, la relación de conversión alimenticia y la reducción de la

diseminación de ooquistes y las puntuaciones de lesiones, además de sus propiedades promotoras del crecimiento, antimicrobianas e inmunoestimulantes (Abbas *et al.*, 2011; Ali *et al.*, 2014).

Recientemente existe un interés internacional en el uso de productos herbales como alternativas seguras para controlar diversas enfermedades con un menor riesgo de desarrollo de resistencias (Abd El-Hack *et al.*, 2020; Abdelnour *et al.*, 2020; Ashour *et al.*, 2020). Se ha informado que más de 1200 plantas tienen actividad antiprotozoaria (Willcox *et al.*, 2004; Muthamilselvan *et al.*, 2016). Algunos de estos remedios a base de hierbas se utilizan en las dietas de las aves debido a sus efectos inmunoestimuladores naturales y promotores del crecimiento (El Shall *et al.*, 2021)

### **III. CONCLUSIONES**

La vacunación es la alternativa actual más conveniente para el control de la coccidiosis porque evita la generación de resistencia a anticoccidiales y contribuye con la inocuidad alimentaria de los productos avícolas.

La inmunidad celular es la clave para la protección contra *Eimeria*, mientras que la inmunidad humoral juega un papel secundario en la resistencia contra la infección.

Las vacunas con cepas atenuadas por precocidad tienen un ciclo más rápido y son menos patógenas, pero también menos prolíficas que las vacunas con cepas no atenuadas.

La vacunación por aspersión en la planta de incubación es el método más práctico para realizar la vacunación contra la coccidiosis.

En el futuro, la vacunación con vacunas recombinantes en base a subunidades del parásito puede ser una alternativa más eficaz y económica para el control de la coccidiosis.

#### IV. BIBLIOGRAFÍA

1. **Abbas R, Iqbal Z, Blake D, Khan M, Saleemi M. 2011.** Anticoccidial drug resistance in fowl coccidia: the state of play revisited. *Worlds Poultry science*: 50 - 337.
2. **Abdelnour S, Swelum A, Salama A, Al-Ghadi M, Qattan S, Abd El-Hack M, Khafaga A, Alhimaidi A, Almutairi B, Ammari A, El-Saadony M. 2020.** The beneficial impacts of dietary phycocyanin supplementation on growing rabbits under high ambient temperature. *Ital. J. Anim. Sci*:1046–1056
3. **Abou-Elkhair R, Gaafar K, Elbahy N, Helal M, Mahboub H, Sameh G. 2014.** Bioactive effect of dietary supplementation with essential oils blend of oregano, thyme and garlic oils on performance of broilers infected with *Eimeria* species. *Glob Vet*: 85 - 5977.
4. **Akanbi O, Taiwo V. 2020.** The effect of a Local isolate and Houghton strain of *Eimeria tenella* on clinical and growth parameters following challenge in chickens vaccinated with IMMUCOX and LIVACOX vaccines. *Journal of Parasitic Diseases*. doi:10.1007/s12639-020-01202-y
5. **Albanese G, Tensa L, Aston E, Hilt D, Jordan B. 2018.** Evaluation of a coccidia vaccine using aspersion and gel applications. *Poultry science*: 1544 - 1553. doi: <https://doi.org/10.3382/ps/pey011>
6. **Ali A, Seddiek S, Khater H. 2014.** Effect of butyrate, clopidol and their combination on the performance of broilers infected with *Eimeria maxima*. *Br Poult Sci.*: 474–82.

7. **Arendt M, Elissa J, Schmidt N, Michael E, Potter N, Cook M, Knoll L. 2019.** Investigating the role of interleukin 10 on *Eimeria* intestinal pathogenesis in broiler chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. doi: 10.1016/j.vetimm.2019.109934
8. **Arnott A, Wapling J, Mueller I, Ramsland P, Siba P, Reeder J, Barry A. 2014.** Distinct patterns of diversity, population structure and evolution in the AMA1 genes of sympatric *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* populations of Papua New Guinea from an area of similarly high transmission. *Malar*: 233.
9. **Ashour E, Abd El-Hack M, Shafi M, Alghamdi W, Taha A, Swelum A, Tufarelli V, Mulla Z, El-Ghareeb W, El-Saadony M. 2020.** Impacts of green coffee powder supplementation on growth performance, carcass characteristics, blood indices, meat quality and gut microbial load in broilers. *Agriculture*: 457.
10. **Aswathi P, Bhanja S, Yadav A, Rekha V, John J, Gopinath D, Sadanandan G, Shinde A, Jacob A. 2014.** Plant based edible vaccines against poultry diseases: a review. *Adv Anim Vet Sci*: 305–311
11. **Attree E, Sanchez-Arsuaga G, Jones M, Xia D, Marugan-Hernandez V, Blake D, Tomley F. 2021.** Controlling the causative agents of coccidiosis in domestic chickens; an eye on the past and considerations for the future. *CABI agriculture and bioscience*: 37. doi: <https://doi.org/10.1186/s43170-021-00056-5>
12. **Barta J, Berghman L, Shivaramaiah S, Faulkner O, Bielke L, Hargis B. 2018.** Compositions and methods of enhancing immune responses to *Eimeria* or limiting *Eimeria* infection. United States patent US: 884
13. **Bedrnik P, Hiepe T, Mielke D, Drossigk U. 1995.** Antigens and immunisation procedures in the development of vaccines against poultry coccidiosis. In *Biotechnology Guidelines on Techniques in Coccidiosis Research*. ed. Eckert J, Braun R, Coudert M. European Commission, Luxembourg: 176–189.
14. **Bertsch, 2019.** Veterinaria digital del 2018. Disponible en: <https://www.veterinariadigital.com/articulos/coccidiosis-aviar-situacion-sudeste-asiatico-y-metodos-control-naturales/>
15. **Blake D, Billington K, Copestake S, Oakes R, Quail M, Wan K, Shirley M, Smith A. 2011.** Genetic mapping identifies novel highly protective antigens for an apicomplexan parasite. *PLoS Pathog*: 7
16. **Blake D, Clark E, Macdonald S, Thenmozhi V, Kundu K, Garg R, Jatau I, Ayoade S, Kawahara F, Moftah A, Reid A, Adebambo A, Alvarez Zapata R,**

- Srinivasa R, Thangaraj K, Banerjee P, Dhinakar-Raj G, Raman M, Tomley F. 2015.** Population, genetic, and antigenic diversity of the apicomplexan *Eimeria tenella* and their relevance to vaccine development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*: 5343–5350.
17. **Blake D, Knox J, Dehaeck B, Huntington B, Rathinam T, Ravipati V, Ayoade S, Gilbert W, Adebambo A, Jatau D, Raman M, Parker D, Rushton J, Tomley M. 2020.** Re-calculating the cost of coccidiosis in chickens. *Veterinary research*: 1-3. doi: <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00837-2>.
  18. **Blake D, Pastor-Fernández I, Nolan M, Tomley F. 2017.** Recombinant anticoccidial vaccines a cup half full? *Infect Genet Evol*: 358–365
  19. **Blake D, Tomley F. 2014.** Securing poultry production from the ever-present *Eimeria* challenge. *Trends Parasitol*: 12–19.
  20. **Blake D, Vrba V, Xia D, Danladi I, Spiro S, Nolan M, Underwood G, Tomley F. 2021.** Genetic and biological characterisation of three cryptic *Eimeria* operational taxonomic units that infect chickens (*Gallus gallus domesticus*). *International Journal for Parasitology*. p 621-634.
  21. **Bottje W, Hargis B, Berghman L, Kwon YM, Cole K, Cox M, Layton S, El-Ashram S, Barta J, Tellez G. 2018.** Compositions and methods of enhancing immune responses to *Eimeria*. U.S. Patent Application. Disponible en: <https://patents.google.com/patent/US10016493B2/>
  22. **Bozkurt M, Aysul N, Küçükyılmaz K, Aypak S, Ege G, Catli A, Akşit H, Çöven F, Seyrek K, Çınar M. 2014.** Efficacy of in-feed preparations of an anticoccidial, multienzyme, prebiotic, probiotic, and herbal essential oil mixture in healthy and *Eimeria spp.* infected broilers. *Poult sci*: 99 - 389.
  23. **Brown Jordan A, Blake D, Beard J, Beharry A, Serrette L, Soleyn A, Oura C. 2018.** Molecular identification of *Eimeria* species in broiler chickens in Trinidad, West Indies. *Vet Sci*: 12–21
  24. **Bruzual J, Marton Z. 2021.** Control de la coccidiosis con vacunas en pollos de engorde. *Aviagen*: 3 - 8.
  25. **Burrell A, Tomley F, Vaughan S, Marugan-Hernandez V. 2019.** Life cycle stages, specific organelles and invasion mechanisms of *Eimeria* species. *Parasitology*, 1–16. doi:10.1017/s0031182019001562
  26. **Campos R. 2011.** La coccidiosis en el pollo de carne, métodos actuales de control. *Selecciones avícolas*: 19-23

27. **Cervantes H, McDougald L, Jenkins M. 2020.** Coccidiosis. En: Swayne D, ed. Diseases of poultry. 14<sup>a</sup> ed. USA: Wiley Blackwell. p 1193-1217.
28. **Cervantes H. 2013.** ¿Coccidiosis o coccidiasis? Retrieved December 27, 2018, disponible en: <http://www.elsitioavicola.com/poultrynews/25994/ncoccidiosis-ococcidiasis/>
29. **Chapman H, Cherry T, Danforth H, Richards G, Shirley M, Williams B. 2002.** Sustainable coccidiosis control in poultry production: the role of live vaccines. International journal for parasitology: 617–629. doi: [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00362-9](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00362-9)
30. **Chapman H. 1996.** Administration of a coccidiosis vaccine to day-old turkeys via the eye and development of immunity to *Eimeria* species. Poultry science: 1496 - 1497. doi: <https://doi.org/10.3382/ps.0751496>
31. **Chapman H. 2014.** Milestones in avian coccidiosis research: A review. Poultry Science, 93(3), 501–511. doi:10.3382/ps.2013-03634
32. **Clark E, Macdonald S, Thenmozhi V, Kundu K, Garg R, Kumar S, Nolan M. 2016.** Cryptic *Eimeria* genotypes are common across the southern but not northern hemisphere. International journal for parasitology: 537-544. doi: 10.1016/j.ijpara.2016.05.006
33. **Dalloul R, Lillehoj H, Shellem T, Doerr J. 2002.** Effect of vitamin A deficiency on host intestinal immune response to *Eimeria acervulina* in broiler chickens. Poultry science: 1509–1515. doi: <https://doi.org/10.1093/ps/81.10.1509>
34. **Dalloul R, Lillehoj H, Tamim N, Shellem T, Doerr J. 2005.** Induction of local protective immunity to *Eimeria acervulina* by a *Lactobacillus*-based probiotic. Comp Immunol Microbiol Infect Dis:351–61
35. **Dalloul R, Lillehoj H. 2006.** Poultry coccidiosis: recent advancements in control measures and vaccine development. Expert Review of Vaccines: 143 - 163. doi:10.1586/14760584.5.1.143
36. **Danforth H, Watkins K, Martin A, Dekich M. 1997.** Evaluation of the efficacy of *Eimeria maxima* oocyst immunization with different strains of day-old broiler and roaster chickens. Avian diseases: p 792–801.
37. **Del Cacho E, Gallego M, Lillehoj H, Quilez J, Lillehoj E, Sánchez-Acedo C. 2016.** Induction of protective immunity against experimental *Eimeria tenella* infection using serum exosomes. Veterinary Parasitology: 1 - 6. doi:

10.1016/j.vetpar.2016.04.043

38. **Del Cacho E, Sierra M, Sánchez C. 1999.** Coccidiosis Aviar. En: Cordero del Campillo M, Rojo M, eds. Parasitología Veterinaria. 1ª ed. España: Mc Graw Hill
39. **Díaz D, Juan B. 2006.** Las vacunas de ADN: una promisoriosa medicina para el paciente veterinario REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria. pp. 1-15 Veterinaria Organización Málaga, España.
40. **Ding X, Lillehoj H, Quiroz M, Bevenssee E, Lillehoj E. 2004.** Protective immunity against *Eimeria acervulina* following *in ovo* immunization with a recombinant subunit vaccine and cytokine genes. Infect Immun: 44 - 6939.
41. **Dkhil M, Al-Quraishy S. 2016.** Nanoparticles against Eimeriosis. In Nanoparticles in the fight against parasites. Springer, Cham: 207–210
42. **Doran D, Farr M. 1965.** Susceptibility of 1- and 3-Day-Old Chicks to Infection with the Coccidium, *Eimeria acervulina*. The Journal of Protozoology: p 160 - 166. doi: 10.1111/j.1550-7408.1965.tb01831.x
43. **El-Hack A, El-Saadony M, Shafi M, Zabermawi N, Arif M, Batiha G, Khafaga A, El-Hakim Y, Al-Sagheer A. 2020.** Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: a review. Biol. Macromol: 2726–2744.
44. **El-Shall N, Abd El-Hack M, Albaqami N, Khafaga A, Taha A, Swelum A, El-Saadony M, Salem H, El-Tahan A, AbuQamar S, El-Tarabily K, Elbestawy A. 2022.** Phytochemical control of poultry coccidiosis: a review. Poultry science: 101 doi: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101542>
45. **Gaggìa F, Mattarelli P, Biavati B. 2010.** Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. Int J Food Microbiol: 15–28.
46. **Giannenas I, Florou-Paneri P, Papazahariadou M, Christaki E, Botsoglou N, Spais A. 2003.** Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. Arch Anim Nutr: 99–106.
47. **Giannenas I, Papadopoulos E, Tsalie E, Triantaflou E, Henikl S, Teichmann K, Tontis D. 2012.** Assessment of dietary supplementation with probiotics on performance, intestinal morphology and microflora of chickens infected with *Eimeria tenella*. Vet Parasitol: 31–40.
48. **Hoan, T, Thao D, Gadahi J, Song X, Xu L, Yan R., Li X. 2014.** Analysis of humoral immune response and cytokines in chickens vaccinated with *Eimeria brunetti* apical

- membrane antigen-1 (EbAMA1) DNA vaccine. *Experimental Parasitology*, 144, 65–72. doi: 10.1016/j.exppara.2014.04.015
49. **Huang J, Liu T, Li K, Song X, Yan R, Xu L, Li X. 2018.** Proteomic analysis of protein interactions between *Eimeria maxima* sporozoites and chicken jejunal epithelial cells by shotgun LC-MS/MS. *Parasit Vectors*:226–230
  50. **Issaranggun N, Ayuthaya B, Everts V, Pavasant, P. 2018.** The immunopathogenic and immunomodulatory effects of interleukin-12 in periodontal disease. *European Journal of Oral Sciences*: 75 - 83. doi:10.1111/eos.12405
  51. **Jacob S, Cherian S, Sumithra T, Raina O, Sankar M. 2013.** Edible vaccines against veterinary parasitic diseases current status and future prospects. *Vaccine* 31:1879–1885
  52. **Jang S, Lillehoj H, Lee S, Lee K, Lillehoj E, Hong Y, An D, Jeong W, Chun J, Bertrand F, Dupuis L, Deville S, Arous JB. 2012.** Vaccination with *Clostridium perfringens* recombinant proteins in combination with Montanide ISA 71 VG adjuvant increases protection against experimental necrotic enteritis in commercial broiler chickens. *Vaccine*: 401–540
  53. **Jang S, Lillehoj H, Lee S, Lee K, Park M, Cha S, Srinivasan V. 2010.** *Eimeria maxima* recombinant Gam82 gametocyte antigen vaccine protects against coccidiosis and augments humoral and cell-mediated immunity: 2980–2985. doi:10.1016/j.vaccine.2010.02.011
  54. **Jeffers T. 1975.** Attenuation of *Eimeria tenella* through selection for precociousness. *The Journal of Parasitology*: 1083–1090. doi: <https://doi.org/10.2307/3279381>
  55. **Jenkins M, Parker C, O'Brien C, Persyn J, Barlow D, Miska K, Fetterer R. 2013.** Protecting Chickens Against Coccidiosis in Floor Pens by Administering *Eimeria* Oocysts Using Gel Beads or Aspersión Vaccination. *Avian Diseases*: 622–626. doi:10.1637/10516-022213-reg.1
  56. **Jenkins M, Stevens L, O'Brien C, Parker C, Miska K, Konjufca V. 2018.** Incorporation of a recombinant *Eimeria maxima* IMP1 antigen into nanoparticles confers protective immunity against *E. Maxima* challenge infection: 1126 - 1131. doi:10.1016/j.vaccine.2017.11.014
  57. **Kawazoe U. 1994.** *Biologia*. Simposio Internacional coccidiose. Brazil. P. 1-6.
  58. **Klotz C, Gehre F, Lucius R, Pogonka T. 2007.** Identification of *Eimeria tenella* genes encoding for secretory proteins and evaluation of candidates by DNA immunisation studies in chickens: 6625 - 6634. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.06.04

59. **Krshnan L, Park S, Im W, Call M, Call M. 2016.** A conserved  $\alpha\beta$  transmembrane interface forms the core of a compact T-cell receptor - CD3 structure within the membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 6649 - 6658. doi: 10.1073/pnas.1611445113
60. **Küçükyılmaz K, Bozkurt M, Selek N, Güven E, Eren H, Atasever A, Bintaş E, Çath AU, Çınar M. 2012.** Effects of vaccination against coccidiosis, with and without a specific herbal essential oil blend, on performance, oocyst excretion and serum IBD titers of broilers reared on litter. *Ital J Anim Sci*: 11
61. **Kundu K, Garg R, Kumar S, Mandal M, Tomley F, Blake D, Banerjee S. 2017.** Humoral and cytokine response elicited during immunisation with recombinant Immune Mapped protein-1 (EtIMP-1) and oocysts of *Eimeria tenella*. *Veterinary Parasitology*: 44–53. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.07.025
62. **Kundu K, Garg R, Kumar S, Mandal M, Tomley FM, Blake DP, Banerjee PS. 2017.** Humoral and cytokine response elicited during immunisation with recombinant immune mapped protein-1 (EtIMP-1) and oocysts of *Eimeria tenella*. *Vet Parasitol*:44–53.
63. **Lee K, Lillehoj H, Jang S, Li G, Lee S, Lillehoj E, Siragusa G. 2010.** Effect of Bacillus-based direct-fed microbials on *Eimeria maxima* infection in broiler chickens. *Comp Immunol Microbiol Infect*: 5–10.
64. **Lee S, Dong X, Lillehoj H, Lamont S, Suo X, Kim D, Hong. 2016.** Comparing the immune responses of two genetically B-complex disparate Fayoumi chicken lines to *Eimeria tenella*. *British Poultry Science*: 165 - 171. doi:10.1080/00071668.2016.1141172
65. **Li J, Wang F, Ma C, Huang Y, Wang D, Ma D. 2018.** Recombinant *Lactococcus lactis* expressing *Eimeria tenella* AMA1 protein and its immunological effects against homologous challenge. *Experimental Parasitology*: 1–8. doi: 10.1016/j.exppara.2018.05.003
66. **Lillehoj H, Jang S, Panebra A, Lillehoj E, Dupuis L, Arous J, Lee S, Oh S. 2017.** In ovo vaccination using *Eimeria* profilin and *Clostridium perfringens* NetB proteins in Montanide IMS adjuvant increases protective immunity against experimentally-induced necrotic enteritis. *Asian Australas J Anim Sci* 30:1478–1489
67. **Lillehoj H, Lillehoj E. 2000.** Avian coccidiosis. A review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. *Avian diseases*: 408–425.
68. **Lillehoj H, Min W, Dalloul R. 2004.** Recent progress on the cytokine regulation of

intestinal immune responses to *Eimeria*. Poultry Science: 611 - 623. doi:10.1093/ps/83.4.611

69. **Lillehoj H. 1988.** Influence of inoculation dose, inoculation schedule, chicken age, and host genetics on disease susceptibility and development of resistance to *Eimeria tenella* infection. Avian diseases: p 437–444.
70. **Lin R, Lillehoj H, Lee S, Oh S, Panebra A, Lillehoj E. 2017.** Vaccination with *Eimeria tenella* elongation factor-1 $\alpha$  recombinant protein induces protective immunity against *E. tenella* and *E. maxima* infections. Vet. Parasitol: 79–84
71. **Liu D, Cao L, Zhu Y, Deng C, Su S, Xu J, Tao J. 2014.** Cloning and characterization of an *Eimeria necatrix* gene encoding a gametocyte protein and associated with oocyst wall formation. Parasites & Vectors: 27. doi:10.1186/1756-3305-7-27
72. **Liu L, Huang X, Liu J, Li W, Ji Y, Tian D, Tian L, Yang X, Xu L, Yan R, Li X, Song X. 2017.** Identification of common immunodominant antigens of *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina* and *Eimeria maxima* by immunoproteomic analysis. Oncotarget: 34935–34945. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16824>
73. **Liu T, Huang J, Ehsan M, Wang S, Fei H, Zhou Z, Li X. 2018.** Protective immunity against *Eimeria maxima* induced by vaccines of Em14-3-3 antigen. Veterinary Parasitology, 253, 79–86. doi: 10.1016/j.vetpar.2018.02.027
74. **Long P, Johnson J, McKenzie M, Perry E, Crane M, Murray P. 1986.** Immunisation of young broiler chickens with low level infections of *Eimeria tenella*, *E. acervulina* or *E. maxima*. Avian pathology. Journal of the W.V.P.A: p 271–278. <https://doi.org/10.1080/03079458608436287>
75. **Long P, Millard B. 1977.** *Eimeria*: immunisation of young chickens kept in litter pens. Avian pathology. Journal of the W.V.P.A: p 77–92. <https://doi.org/10.1080/03079457708418214>
76. **Long P, Millard B. 1979.** *Eimeria*: further studies on the immunisation of young chickens kept in litter pens. Avian pathology. Journal of the W.V.P.A: p 213–228. <https://doi.org/10.1080/03079457908418347>
77. **Marugan-Hernandez V, Cockle C, Macdonald S, Pegg E, Crouch C, Blake D, Tomley F. 2016.** Viral proteins expressed in the protozoan parasite *Eimeria tenella* are detected by the chicken immune system. Parasit. Vectors: 463.
78. **Marugan-Hernandez V, Jeremiah G, Aguiar K, Burrell A, Vaughan S, Xia D, Randle N, Tomley F. 2020.** The growth of *Eimeria tenella*: characterization and application of quantitative methods to assess sporozoite invasion and endogenous

development in cell culture. *Front Cell Infect Microbiol.*;10:579833.

79. **McDonald V, Ballingall S. Further. 1983.** Investigation of the pathogenicity, immunogenicity and stability of precocious *Eimeria acervulina*. *Parasitology*:9 - 361. doi: 10.1017/S0031182000050551
80. **McDonald V, Rose M, Jeffers T. 1986.** *Eimeria tenella*: immunogenicity of first generation of schyzogony. *Parasitology*: 1-7
81. **McDonald V, Shirley M. 2009.** Past and future: vaccination against *Eimeria*. *Parasitology*: 1477–1489. <https://doi.org/10.1017/S0031182009006349>
82. **Meunier M, Chemaly M, Dory D. 2016.** DNA vaccination of poultry: the current status in 2015. *Vaccine*: 202–211
83. **Morris G, Woods W, Richards D, Gasser R. 2007.** Investigación de un problema de coccidiosis persistente en una granja comercial de reproductoras de pollos de engorde utilizando electroforesis capilar acoplada a PCR *Parasitol.* p 583 – 589.
84. **Mtshali S, Adeleke M. 2020.** A review of adaptive immune responses to *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* challenge in chickens. *World's Poultry Science Journal*, 1–15. doi:10.1080/00439339.2020.1833693
85. **Muthamilselvan T, Kuo T, Wu Y, Yang W. 2016.** Herbal remedies for coccidiosis control: a review of plants, compounds, and anticoccidial actions. *Evid. Based Complement. Alternat. Med*:1–19
86. **Nakai Y, Uchida T, Kanazawa K. 1992.** Immunization of young chickens by trickle infection with *Eimeria tenella*. *Avian diseases*: p 1034–1036.
87. **Odden A, Denwood M, Stuen S, Robertson L, Ruiz A, Hammes I, Enemark, H. 2018.** Field evaluation of anticoccidial efficacy: A novel approach demonstrates reduced efficacy of toltrazuril against ovine *Eimeria* spp. in Norway. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*: 304 - 311. doi: 10.1016/j.ijpddr.2018.05.002
88. **Panebra A, Lillehoj H. 2019.** *Eimeria tenella* Elongation Factor-1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) Coadministered with Chicken IL-7 (chIL-7) DNA Vaccine Emulsified in Montanide Gel 01 Adjuvant Enhanced the Immune Response to *E. acervulina* Infection in Broiler Chickens. *Avian diseases*: 342–350. <https://doi.org/10.1637/11976-092418>
89. **Pastor-Fernández I, Kim S, Billington K, Bumstead J, Marugán-Hernández V, Küster T, Tomley F. 2018.** Development of cross-protective *Eimeria* -vectored vaccines based on apical membrane antigens. *International Journal for Parasitology*:

505–518. doi:10.1016/j.ijpara.2018.01.003

90. **Pastor-Fernández I, Pegg E, Macdonald S, Tomley F, Blake D, Marugán-Hernández V. 2019.** Laboratory growth and genetic manipulation of *Eimeria tenella*. *Curr. Protoc. Microbiol*: 81.
91. **Patra G, Kumar A, Ghosh S, Lalnunpuia C, Bachan M, Saikia B, Bhagawati J. 2017.** Vaccines against protozoan parasites of veterinary importance: a review. *J Entomol Zool Stud*: 1016–1021
92. **Peek H, Landman W. 2011.** Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. *Veterinary Quarterly*: 143–161. doi:10.1080/01652176.2011.605247
93. **Price K, Hafeez M, Bulfon J, Barta J. 2016.** Live *Eimeria* vaccination success in the face of artificial non-uniform vaccine administration in conventionally reared pullets. *Avian Pathology*: 82–93. doi:10.1080/03079457.2015.1125442
94. **Provaznikova M, Bedrnik P. 1997.** Vaccination of chickens against coccidiosis during embryonal development. Pages 100–101 in *Control of coccidiosis into the next millenium. VIIth International Coccidiosis Conference and COST820 Workshop*. Keble College, Oxford, UK.
95. **Qi N, Wang Y, Liao S, Wu C, Lv M, Li J, Sun M. 2013.** Partial protective of chickens against *Eimeria tenella* challenge with recombinant EtMIC-1 antigen. *Parasitology Research*: 2281–2287. doi: 10.1007/s00436-013-3389-0
96. **Quiroz-Castañeda R, Dantán-González E. 2015.** Control of avian coccidiosis: future and present natural alternatives. *BioMed Res Int*. <https://doi.org/10.1155/2015/430610>.
97. **Rafiqi S, Garg R, Reena K, Ram H, Singh M, Banerjee P. 2018.** Immune response and protective efficacy of *Eimeria tenella* recombinant refractile body protein, EtSO7, in chickens. *Vet Parasitol* <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401718302334> Accessed 28 Dec 2018 258:108–113
98. **Reid A, Blake D, Ansari H, Billington K, Browne H, Dunn M, Hung S, Kawahara F, Miranda D, Malas T, Mourier T, Nagra H, Nair M, Otto T, Rawlings N, Rivaille P, Sánchez A, Sanders M, Subramaniam C, Tay Y, Wu X, Dear P, Doerig C, Gruber A, Ivens A, Parkinson J, Shirley M, Wan K, Berriman M, Tomley F, Pain A. 2014.** Análisis genómico de los agentes causantes de la coccidiosis en pollos domésticos. *Genoma Res*. p 1676 – 1685.
99. **Reid A, Blake D, Ansari H, Billington K, Browne H, Bryant J, Dunn M, Hung S,**

- Kawahara F, Miranda-Saavedra D, Malas T. 2014.** Genomic analysis of the causative agents of coccidiosis in domestic chickens. *Genome Res* 24:1676–1685
100. **Ritzi M, Abdelrahman W, Mohnl M, Dalloul R. 2014.** Effects of probiotics and application methods on performance and response of broiler chickens to an *Eimeria* challenge. *Poult Sci*:8 – 2772.
101. **Sathish K, Mohana S, Bala M, Harini C, Ponanna N, Srinivasan V, Rajan S. 2017.** Subunit vaccine based on plant expressed recombinant *Eimeria* gametocyte antigen Gam82 elicit protective immune response against chicken coccidiosis. *J Vaccines* 8:6–13
102. **Sharman P, Smith N, Wallach M, Katrib M. 2010.** Chasing the golden egg: vaccination against poultry coccidiosis. *Parasite immunology*: 590–598. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2010.01209.x>
103. **Shirley M, Bedrnik P. 1997.** Live attenuated vaccines against avian coccidiosis: Success with precocious and egg-adapted lines. *Parasitology*: 481–484.
104. **Shivaramaiah C, Barta J, 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*: 23–34.
105. **Smith A, Hayday A. 2000.** An alphabeta T-cell-independent immunoprotective response towards gut coccidia is supported by gammadelta cells. *Immunology*, 101(3), 325–332. doi:10.1046/j.1365-2567.2000.00122.x
106. **Sokale A, Williams C, Cummings T, Gerard P, Bello A, Peebles, E. 2018.** Effects of *in ovo* injection of different doses of coccidiosis vaccine and turn out times on broiler performance. *Poultry Science*: 1891–1898. doi:10.3382/ps/pey028
107. **Sokale A, Williams C, Hoerr F, Collins K, Peebles E. 2021.** Effects of administration of an *in ovo* coccidiosis vaccine at different embryonic ages on vaccine cycling and performance of broiler chickens. *Poultry science*: 100. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.11.078>
108. **Sokale A, Zhai W, Pote L, Williams C, Peebles E. 2016.** Effects of coccidiosis vaccination administered by *in ovo* injection on the hatchability and hatching chick quality of broilers. *Poultry Science*: 370. doi:10.3382/ps/pew370
109. **Sokale A, Zhai W, Pote L, Williams C, Peebles E. 2017.** Effects of coccidiosis vaccination administered by *in ovo* injection on Ross 708 broiler performance through 14 days of post-hatch age. *Poultry science*: 2546–2551.

<https://doi.org/10.3382/ps/pex041>

110. **Song H, Yan R, Xu L, Song X, Shah M, Zhu H, Li X. 2010.** Efficacy of DNA vaccines carrying *Eimeria acervulina* lactate dehydrogenase antigen gene against coccidiosis. *Exp Parasitol*: 224–231.
111. **Song X, Huang X, Yan R, Xu L, Li X. 2015.** Efficacy of chimeric DNA vaccines encoding *Eimeria tenella* 5401 and chicken IFN- $\gamma$  or IL-2 against coccidiosis in chickens. *Experimental Parasitology*: 19–25. doi: 10.1016/j.exppara.2015.05.003
112. **Song X, Ren Z, Yan R, Xu L, Li X. 2015.** Induction of protective immunity against *Eimeria tenella*, *Eimeria necatrix*, *Eimeria maxima* and *Eimeria acervulina* infections using multivalent epitope DNA vaccines. *Vaccine*: 2764–27
113. **Soutter F, Werling D, Tomley F, Blake D. 2020.** Poultry Coccidiosis: Design and Interpretation of Vaccine Studies. *Frontiers in Veterinary Science*: 7. doi:10.3389/fvets.2020.00101
114. **Stiff M, Bafundo, K. 1993.** Development of immunity in broilers continuously exposed to *Eimeria sp.* *Avian Diseases*: 295–301.
115. **Suarez C, Bishop R, Alzan H, Poole W, Cooke B. 2017.** Advances in the application of genetic manipulation methods to apicomplexan parasites. *Int. J. Parasitol*: 701–710
116. **Sun H, Wang L, Wang T, Zhang J, Liu Q, Chen P, Zhao X. 2014.** Display of *Eimeria tenella* EtMic2 protein on the surface of *Saccharomyces cerevisiae* as a potential oral vaccine against chicken coccidiosis. *Vaccine*: 1869–1876
117. **Sundar S, Harikrishnan T, Latha B, Chandra G, Kumar T. 2017.** Anticoccidial drug resistance in chicken coccidiosis and promising solutions: a review. *J Entomol Zool Stud*: 1526–1529
118. **Suprihati E, Yunus M. 2018.** Evaluation of the antigenicity and immunogenicity of *Eimeria tenella* by reproductive index and histopathological changes of cecal coccidiosis virulent live vaccine in broiler chickens. *Afr J Infect Dis*: 104–110
119. **Tan L, Li Y, Yang X, Ke Q, Lei W, Mughal M, Zhao J. 2017.** Genetic diversity and drug sensitivity studies on *Eimeria tenella* field isolates from Hubei Province of China. *Parasit Vectors*: 137
120. **Tang X, Liu X, Yin G, Suo J, Tao G, Zhang S, Suo X. 2018.** A novel vaccine delivery model of the apicomplexan *Eimeria tenella* expressing *Eimeria maxima* antigen protects chickens against infection of the two parasites. *Front. Immunol*: 1982
121. **Tang X, Suo J, Li C, Du M, Wang C, Hu D, Suo X. 2018.** Transgenic *Eimeria tenella* Expressing Profilin of *Eimeria maxima* Elicits Enhanced Protective Immunity

- and Alters Gut Microbiome of Chickens. *Infection and Immunity*, 86(9). doi:10.1128/iai.00888-17
122. **Tang X, Wang C, Liang L, Hu D, Zhang S, Duan C, Suo J, Liu X, Suo X, Cui S. 2019.** Co-immunization with two recombinant *Eimeria tenella* lines expressing immunoprotective antigens of *E. maxima* elicits enhanced protection against *E. maxima* infection. *Parasit. Vectors*: 347.
  123. **Tang X, Yin G, Qin M, Tao G, Suo J, Liu X, Suo X. 2016.** Transgenic *Eimeria tenella* as a vaccine vehicle: expressing TgSAG1 elicits protective immunity against *Toxoplasma gondii* infections in chickens and mice. *Sci*: 29379
  124. **Tensa L, Jordan B. 2019.** Comparison of the application parameters of coccidia vaccines by gel and aspersión. *Poultry Science*: 634–641. doi:10.3382/ps/pey364
  125. **Tian L, Li W, Huang X, Tian D, Liu J, Yang X, Song X. 2017.** Protective efficacy of coccidial common antigen glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) against challenge with three *Eimeria* species. *Front Microbiol*:124–132
  126. **Velkers F, Bouma A, Stegeman J, Jong M. 2012.** Transmission of a live *Eimeria acervulina* vaccine strain and response to infection in vaccinated and contact-vaccinated broilers. *Vaccine*: 322–328. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.10.090
  127. **Venkatas J, Adeleke M. 2019.** A review of *Eimeria* antigen identification for the development of novel anticoccidial vaccines. *Parasitology Research*. doi:10.1007/s00436-019-06338-2
  128. **Veritrade.** 2022. Lima: Superintendencia nacional de aduanas y administración tributaria. [Internet]. Disponible en: <https://www.veritradecorp.com/es>
  129. **Wallach M. 2010.** Role of antibody in immunity and control of chicken coccidiosis. *Trends in parasitology*: 382–387. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.04.004>.
  130. **Wang X, Wu L, Gao Y, Zhang Y, Weng Y, Lin R. 2017.** Evaluation of the protective effect of pVAX-EtMIC3-recombined plasmid against *E. tenella* in chicken. *Parasitology Research*: 1023–1028. doi:10.1007/s00436-017-5383-4
  131. **Watkins K, Brooks M, Jeffers T, Phelps P, Ricks, C. 1995.** The effect of *in ovo* oocyst or sporocyst inoculation on response to subsequent coccidial challenge. *Poultry science*: p 1597–1602. doi: <https://doi.org/10.3382/ps.0741597>
  132. **Wattrang E, Thebo P, Lundén A, Dalgaard T. 2016.** Monitoring of local CD8 $\beta$ -expressing cell populations during *Eimeria tenella* infection of naive and immune chickens. *Parasite Immunology*: 453–467. doi:10.1111/pim.12331

133. **Weber F, Evans N. 2003.** Immunization of broiler chicks by *in ovo* injection of *Eimeria tenella* sporozoites, sporocysts, or oocysts. Poultry science: 1701–1707. doi: <https://doi.org/10.1093/ps/82.11.1701>
134. **Weber F, Genteman C, LeMay M, Lewis D, Evans N. 2004.** Immunization of broiler chicks by *in ovo* injection of infective stages of *Eimeria*. Poultry science: 392–399. doi: <https://doi.org/10.1093/ps/83.3.392>
135. **Wiedmer S, Erdbeer A, Volke B, Randel S, Kapplusch F, Hanig S, Kurth M. 2017.** Identification and analysis of *Eimeria nieschulzi* gametocyte genes reveal splicing events of gam genes and conserved motifs in the wall-forming proteins within the genus *Eimeria* (Coccidia, Apicomplexa). Parasite: 2450. doi:10.1051/parasite/2017049
136. **Willcox M, Bodeker G. 2004.** Traditional herbal medicines for malaria. BMJ: 1156–1159.
137. **Williams R. 2002.** Anticoccidial vaccines for broiler chickens: Pathways to success, Avian Pathology: 317–353. doi: 10.1080/03079450220148988
138. **Williams R. 2002.** Fifty Years of Anticoccidial Vaccines for Poultry (1952–2002). Avian Diseases: 775–802. doi:10.1637/0005-2086(2002)046[0775:fyoavf]2.0.co;
139. **Witcombe D, Smith N. 2014.** Strategies for anti-coccidial prophylaxis. Parasitology: 1379–1389. doi:10.1017/s0031182014000195
140. **Xu J, Zhang Y, Tao J. 2013.** Efficacy of a DNA Vaccine Carrying *Eimeria maxima* Gam56 Antigen Gene against Coccidiosis in Chickens. The Korean Journal of Parasitology: 147–154. doi:10.3347/kjp.2013.51.2.147
141. **Yun C. 2000.** Intestinal immune responses to coccidiosis. Developmental & Comparative Immunology: 303–324. doi:10.1016/s0145-305x(99)00080-4
142. **Zhang D, Xu H, Sun B, Li J, Zhou Q, Zhang H, Du A. 2012.** Adjuvant effect of ginsenoside-based nanoparticles (ginsomes) on the recombinant vaccine against *Eimeria tenella* in chickens. Parasitol Res: 2445–2453
143. **Zhang Q, Chen X, Eicher S, Ajuwon K, Applegate T. 2016.** Effect of threonine deficiency on intestinal integrity and immune response to feed withdrawal combined with coccidial vaccine challenge in broiler chicks. British Journal of Nutrition: 2030–2043. doi:10.1017/s0007114516003238