



Publicación Semestral. Vol. 1, No. 2, julio-diciembre 2022, Ecuador (p. 70-79). Edición continua

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON CLORHIDRATO DE LISOZIMA SOBRE EL CONTROL DE COCCIDIOSIS Y PARÁMETROS PRODUCTIVOS DE CERDOS PREDESTETE

Hidenobu Kinoshita¹, José Aponte¹ y Álvaro Ojeda^{2*}

¹Área de Ingeniería Agronómica, Universidad Nacional Experimental Rómulo Gallegos, San Juan de Los Morros, Venezuela.

²Instituto de Producción Animal. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela.

*Dirección para correspondencia: ajojeda99@yahoo.com

Fecha de Recepción: 31-05-2022

Fecha de Aceptación: 05-07-2022

Fecha de Publicación: 31-07-2022

Resumen

Para evaluar el efecto de la suplementación oral con Lisozima (E.C. 3.2.1.17) sobre la presencia de ooquistes de coccidias y parámetros productivos en lechones, se realizó un estudio en una granja comercial con historia de coccidiosis, localizada en el estado Guárico, Venezuela. Se seleccionaron 165 lechones machos procedentes de 30 camadas, los cuales fueron estratificados por peso vivo, fecha de nacimiento y número de partos de la madre, para ser asignados dentro de cada camada a: Control (sin tratamiento anticoccidial), Coccidiostato (aplicación al 4to día de edad de 1 ml de solución con 50 mg/ml de Toltrazuril) y Lisozima (aplicación a las 24 h y 4to día de edad de 1 ml de gel con 5080000 UI de Clorhidrato de Lisozima). Los lechones en Coccidiostato y Lisozima mostraron una reducción ($p < 0.01$) del 58.7% en el conteo de ooquistes, con prevalencia moderada en control (230 hpg) y leve (95 ± 5.3 hpg) en los restantes tratamientos. No hubo diferencias entre tratamientos ni bloques en peso al nacimiento (1.47 ± 0.37 kg/animal; $p > 0.05$), mientras al destete los lechones en Coccidiostato y Lisozima fueron superiores al control ($p = 0.04$). Esta misma tendencia se observó en la variación del peso vivo ($p = 0.03$), donde los lechones que recibieron el Coccidiostato o el gel con Clorhidrato de Lisozima superaron al grupo control en un 35%. Se concluye que la Lisozima es una alternativa viable para el control de Coccidiosis en lechones, con la necesidad de continuar los estudios para esclarecer su mecanismo de acción.

Palabras clave: Lisozima, enzima, coccidia, lechones, crecimiento.

IDs Orcid:

Hidenobu Kinoshita: <https://orcid.org/0000-0003-2905-5315>

José Aponte: <https://orcid.org/0000-0003-1034-2664>

Álvaro Ojeda: <https://orcid.org/0000-0003-2542-3133>

Artículo científico: Efecto de la suplementación con clorhidrato de Lisozima sobre el control de Coccidiosis y parámetros productivos de cerdos predestete

Publicación Semestral. Vol. 1, No. 2, julio-diciembre 2022, Ecuador (p. 70-79)

EFFECT OF LYSOZYME HYDROCHLORIDE SUPPLEMENTATION ON COCCIDIOSIS CONTROL AND PRODUCTIVE PARAMETERS OF PREWEANED PIG

Abstract

To evaluate the effect of oral supplementation with Lysozyme (E.C. 3.2.1.17) on the presence of coccidia oocysts and productive parameters in piglets, a study was conducted in a commercial farm with a history of coccidiosis, located in the state of Guárico, Venezuela. 165 male piglets from 30 litters were selected, which were stratified by live weight, date of birth and number of births of the mother, to be assigned within each litter to: Control (without anticoccidial treatment), Coccidiostat (application on the 4th day of age of 1 ml of solution with 50 mg / ml of Toltrazuril) and Lysozyme (application at 24 h and 4th day of age of 1 ml of gel with 5080000 IU of Lysozyme Hydrochloride). Piglets in Coccidiostat and Lysozyme showed a reduction ($p < 0.01$) of 58.7% in the oocyst count, with moderate prevalence in Control (230 hpg) and mild (95 ± 5.3 hpg) in the remaining treatments. There were no differences between treatments or blocks in birth weight (1.47 ± 0.37 kg/animal; $p > 0.05$), while at weaning the piglets in Coccidiostat and Lysozyme were higher than control ($p = 0.04$). This same trend was observed in the variation of live weight ($p = 0.03$), where piglets that received coccidiostat or gel with Lysozyme Hydrochloride outperformed the control group by 35%. It is concluded that Lysozyme is a viable alternative for the control of Coccidiosis in piglets, with the need to continue studies to clarify its mechanism of action.

Keywords: Lysozyme, enzyme, Coccidia, piglets, growth.

1. INTRODUCCIÓN

Con el término de Coccidiosis se identifica la infección generada por diversas especies de parásitos protozoos intracelulares obligatorios pertenecientes a los géneros *Eimeria* y *Cystoisospora*, siendo considerada *Cystoisospora suis* la especie de mayor impacto sanitario y económico en lechones (Lindsay et al., 2019). Si bien la infección puede ocurrir durante cualquier fase de la cría de cerdos, generalmente sólo produce signos clínicos en lechones entre 7 y 11 días de edad, donde se observa enteritis no hemorrágica, atrofia de las vellosidades intestinales y baja absorción de nutrientes, lo que consecuentemente afecta la tasa de crecimiento y uniformidad de la camada (Cazorla Perfetti et al., 2014; García Dávila et al., 2017). La coccidiosis generalmente cursa como una enfermedad de alta morbilidad, pero de baja mortalidad, favoreciendo animales más propensos a infecciones intestinales y respiratorias secundarias, lo que compromete el desempeño productivo de la explotación (Mundt et al., 2006; Lindsay et al., 2019).

Para una exitosa reducción de la presión de infección frecuentemente se requiere aplicar medidas de desinfección de instalaciones combinadas con programas de quimioterapia que incluyan el empleo de compuestos anticoccidiales, sin embargo estos se hallan sometidos a una elevada presión por motivos de salud pública (Oliver y Wells, 2015), por lo que existe la necesidad de identificar protocolos alternativos de prevención y control de la coccidiosis porcina con base en productos de menor impacto ambiental, lo que redundará positivamente en la salud de los consumidores y en la definición de estrategias de manejo compatibles con los actuales parámetros de regulación en materia de bienestar animal (Dubey, 2019; Ózsvári, 2018).

En este sentido, la Lisozima (1.4-N-acetilmuramidasa, E.C. 3.2.1.17) es un enzibiótico de amplia distribución natural, que se presenta como antimicrobiano alternativo debido a su actividad hidrolítica a nivel de los peptidoglicanos de la pared celular de bacterias, particularmente sobre los enlaces β -1.4 entre ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina, promoviendo de esta manera la pérdida de la integridad microbiana, lo que conduce a la muerte celular (Oliver et al., 2014; Gong et al., 2021). De este modo, la lisozima ha sido descrita como parte de las barreras no específicas para el control de patógenos a nivel gastrointestinal, documentándose su actividad moduladora del perfil de la microbiota intestinal

Artículo científico: Efecto de la suplementación con clorhidrato de Lisozima sobre el control de Coccidiosis y parámetros productivos de cerdos predestete

Publicación Semestral. Vol. 1, No. 2, julio-diciembre 2022, Ecuador (p. 70-79)

y su impacto positivo sobre la morfometría del epitelio gastrointestinal (May et al., 2012; Lu et al., 2021).

En pollos de engorde experimentalmente infectados con *E. tenella* se ha observado una reducción de la concentración de lisozima en suero sanguíneo, simultáneamente con un incremento de 78 veces en los niveles de lisozima en contenido cecal, lo que ha sido asociado a su efecto antimicrobiano, siendo demostrado que la concentración de dicho enzibiótico en el tracto gastrointestinal de pollos de engorde depende de la especie de *Eimeria* y su grado de patogenicidad, así como el nivel de lesiones tisulares causadas (Sotirov y Koinarski, 2005; Knecht et al., 2012). Adicionalmente, es conocido que los productos de la pérdida de integridad celular microbiana actúan como ligandos bacterianos inmumoduladores que estimulan la secreción de IgA y la actividad fagocítica, siendo además que la lisozima sintetizada por neutrófilos y macrófagos es drenada en los fagosomas que contienen microorganismos patógenos (Ragland y Criss, 2017; Assefa & Bihon, 2019).

En este sentido, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la suplementación oral con Clorhidrato de Lisozima sobre la presencia gastrointestinal de ooquistes de coccidias y algunos parámetros productivos en cerdos predestete.

2. METODOLOGÍA

2.1 Ubicación

El estudio se realizó en una granja comercial con historia de infección por coccidiosis ubicada en el Municipio Ortiz del estado Guárico, Venezuela. La unidad de producción se localiza a una altura de 432 msnm, con precipitación media anual entre 600 y 800 mm, período de lluvias (mayo y octubre) y de sequía (noviembre y abril) bien definidos, y temperatura ambiente promedio de 26.5°C, con mínimas de 21,0 y máximas de 32.0°C (INIA, 2021).

2.2 Animales y manejo

Se eligieron 30 camadas de 11 ± 0.3 lechones nacidos vivos, seleccionado para la presente evaluación 165 lechones machos todos procedentes de madres multíparas (PIC 1010 x PIC1020). Cada camada estuvo alojada en puestos paritorios individuales distribuidos en tres salas de maternidad, cada uno con piso de concreto, fosa de deyecciones y zona cubierta por lámina de plástico reticulado para aislamiento térmico de las crías. El área para lechones dispuso de comedero tipo tolva, bebedero de chupón para suministro de agua *ad libitum* y

fuelle de calor (foco 150 watts). Previo al acceso de las madres al puesto paritorio, las instalaciones fueron lavadas empleando soluciones desinfectantes con base en amonio cuaternario, y posteriormente las paredes y piso sometidos a recubrimiento con cal dolomita.

Al nacer cada lechón se limpió con polvo secante, se le cortó y desinfectó el cordón umbilical, y se procedió a su pesaje e identificación individual a través de tatuaje en área auricular derecha.

El manejo general de los lechones se ajustó a lo considerado en granja, con suministro intramuscular de hierro, corte de cola y colmillos, desparasitación, entre otros. A todos los lechones se les suministró el mismo alimento comercial (22% proteína cruda, 4% extracto etéreo, 3% fibra cruda y 50% extracto libre de nitrógeno) partir de los 11 días de edad, formulado según las especificaciones nutricionales de la línea genética.

2.3 Diseño del experimento

Los lechones fueron estratificados al nacer por peso vivo, fecha de nacimiento y número de partos de la madre, para ser asignados dentro de cada camada a los siguientes tratamientos experimentales: **CONTROL** (sin tratamiento anticoccidial), **COCCIDIOSTATO** (aplicación oral a los 4 días de edad 1 ml de solución conteniendo 50 mg/ml de Toltrazuril, Baycox® 5%, Bayer KVP Pharma-Alemania) y **LISOZIMA** (aplicación oral a las 24 h de nacido y 4^{to} día de edad de 1 ml de gel conteniendo 5.080.000 UI de Clorhidrato de Lisozima, LIZOvet Gel®. Agropecuaria Agriquimvet-Venezuela).

2.3.1 Variables

Conteo de ooquistes: al momento del destete se seleccionaron al azar el 50% de los lechones de cada camada en cada tratamiento experimental, para realizar la toma de muestras de heces obtenidas directamente de la ampolla rectal empleando estimulación anal con hisopos estériles. Las muestras fueron colectadas en envases estériles de plástico, y durante las 8 h posteriores se realizó el recuento de huevos por gramo de heces (hpg) a través de la Técnica de McMaster (Hendrix, 1999). A los fines de presente estudio, para definir la intensidad de infección parasitaria se tomó como criterios de evaluación lo siguiente: ausente (0 hpg) leves (50-100 hpg), moderada (101-500 hpg) y alta (>500 hpg).

Artículo científico: Efecto de la suplementación con clorhidrato de Lisozima sobre el control de Coccidiosis y parámetros productivos de cerdos predestete

Publicación Semestral. Vol. 1, No. 2, julio-diciembre 2022, Ecuador (p. 70-79)

Peso vivo: El registro de peso vivo individual de los lechones al nacer y al momento del destete (20 ± 2 días) se efectuó con una balanza digital (marca JADEVER, modelo JWN-6K / capacidad 10 ± 0.001 kg).

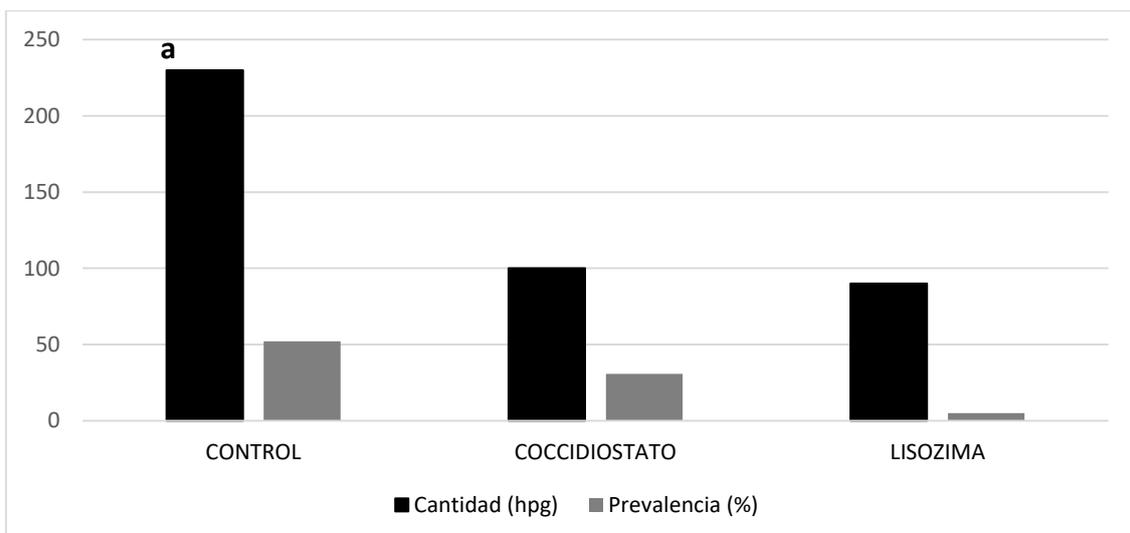
Mortalidad: se estimó a través de la diferencia ente el número de lechones en cada camada al inicio y finalización de la evaluación. Se registró en cada animal la causa de mortalidad a los fines de descartar la presencia de eventos fortuitos no asociados al manejo de los animales.

2.4 Análisis estadístico

La experiencia se ajustó a un diseño Completamente Aleatorizado con arreglo de bloques al azar, considerando cada sala de maternidad como un bloque. Cada tratamiento contó 113 lechones distribuidos aleatoriamente en los tres tratamientos. La información fue analizada por medio de un ANOVA, empleando el procedimiento GLM de SAS (2019). Las diferencias significativas entre tratamientos fueron determinadas a través de la Prueba de Rangos Múltiples Tukey. Los resultados de prevalencia fueron analizados por el test de Fisher para comparación de proporciones (Steel y Torrie, 1985), mientras que el software estadístico SAS (2019) fue empleado en el procesamiento de la información.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1, se observa el comportamiento de la cantidad (hpg) y prevalencia (%) de los ooquistes en las muestras de heces evaluadas.



Nota Letras diferentes sobre una misma columna indica diferencias estadísticas ($p < 0.05$)

Figura 1. Cantidad (hpg) y prevalencia (%) de ooquistes de coccidias en cerdos predestete.

El tratamiento de los lechones con agentes antimicrobianos (COCCIDIOSTATO y LISOZIMA) generó una reducción ($p < 0.01$) del 58.7% en el conteo de ooquistes, con una infección por coccidias de nivel moderada en el tratamiento CONTROL (230 hpg), en comparación a un nivel leve (95 ± 5.3 hpg) en los tratamientos que emplearon Toltrazuril o Clorhidrato de Lisozima como estrategia de prevención de coccidiosis. Esta respuesta estuvo asociada a una mayor prevalencia en el tratamiento CONTROL (52%) respecto al tratamiento LISOZIMA (5%).

El toltrazuril es un derivado triazinómico que genera anomalías en la estructura del aparato de Golgi, retículo endoplasmático y el espacio perinuclear del protozoo patógeno, lo que impacta negativamente sobre su metabolismo respiratorio y la síntesis de ácidos nucleicos, impidiendo así el desarrollo de estadios intracelulares como la esquizogonia y la gametogonia, comprometiendo su reproducción sexual y asexual (Bach et al., 2003). Respecto al mecanismo de acción anticoccidial del Clorhidrato de Lisozima, si bien no se ha descrito con precisión para el caso de cerdos, Zhang et al. (2021) señalan que la Lisozima es parte de la barrera química de protección innata del epitelio gastrointestinal, sumándose a la acción antimicrobiana de la mucina, péptidos antimicrobianos y proteína regeneradora derivada de islotes 3; entre otros.

Algunas especies de *Eimeria* reducen la expresión de genes que controlan la síntesis de mucina tales como MUC2 y MUC5ac, debilitando la protección innata del tejido gastrointestinal y comprometiendo la disponibilidad de nutrientes para poblaciones microbianas benéficas (*Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, y *Verrucomicrobia*) que se alimentan de los carbohidratos presentes en el mucus, lo que conlleva a limitar la protección gastrointestinal a partir de mecanismos de exclusión competitiva (Lu et al., 2021). En estas circunstancias, trabajos conducidos en broiler retados con *E. acervulina* evidencian que las aves pueden movilizar Lisozima sérica a la luz intestinal en una tasa estrechamente dependiente de la patogenicidad del microorganismo y el grado de intensidad de las lesiones epiteliales (Sotirov y Koinarski, 2003).

Además, de lo anterior el efecto detrimental de la Lisozima sobre poblaciones de *Eimeria* en cerdos podría estar asociado a la estimulación del sistema inmune ya que los productos de la actividad hidrolítica de la Lisozima son capaces de incrementar la secreción de

Artículo científico: Efecto de la suplementación con clorhidrato de Lisozima sobre el control de Coccidiosis y parámetros productivos de cerdos predestete

Publicación Semestral. Vol. 1, No. 2, julio-diciembre 2022, Ecuador (p. 70-79)

Inmunoglobulina A (IgA), lo que activa los macrófagos y consecuentemente genera una rápida desaparición de microorganismos patógenos, tal como lo postulan Oliver y Wells (2015). Aunque no hay reportes del impacto anticoccidial de la Lizozima en cerdos, trabajos realizados con broiler desafiados con *Eimeria maxima* y *Clostridium perfringens* evidencian como una fuente de Lizozima incorporada al alimento a razón de 200 g/tn genera una reducción en la incidencia de enteritis necrótica en las aves, proponiéndose el empleo del enzibiótico en circunstancias donde el uso de los antibióticos no es deseable (Zhang et al., 2010).

Tal como se presenta en Tabla 1, no hubo diferencias entre tratamientos ni bloques en el peso al nacimiento de los lechones (1.47 ± 0.37 kg/animal; $p > 0.05$), mientras al momento del destete, los lechones de los tratamientos COCCIDIOSTATO y LISOZIMA fueron superiores al CONTROL ($p = 0.04$). Esta misma tendencia se evidencia en la variación del peso vivo ($p = 0.03$), siendo que en promedio los lechones que recibieron el coccidiostato o el gel con Clorhidrato de Lizozima superaron al grupo control en una media de 35%. En cuanto a la mortalidad, ésta fue superior ($p = 0.04$) en lechones del tratamiento CONTROL, siendo el aplastamiento por la madre y la poca vitalidad al nacer las causas principales. En ninguna de las variables asociadas a peso vivo o mortalidad se observó efecto de la sala de maternidad ($p < 0.05$).

Tabla 1. Comportamiento del peso vivo y mortalidad de cerdos predestete.

Variable	Tratamiento			Prob.	
	Control	Coccidiostato	Lizozima	Tratam.	Bloque
Peso al nacer (kg)	1.50	1.48	1.52	0.07	>0.05
Peso final (kg)	4.9 ^b	5.3 ^{ab}	5.7 ^a	0.04	>0.05
Variación de peso (kg)	0.162 ^b	0.182 ^{ab}	0.199 ^a	0.03	>0.05
Mortalidad (%)	3.1 ^b	1.3 ^a	1.9 ^a	0.04	>0.05

Nota. Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas.

Además, de esperarse una mejora en la salud gastrointestinal a partir del uso de los antimicrobianos evaluados, estos resultados se pueden entender al revisar algunos estudios metabolómicos en cerdos con reto inmune crónico y que consumen Lizozima y otros antimicrobianos, los cuales han evidenciado una mayor eficiencia de uso de los nutrientes respecto al grupo control, con un perfil que favorece la deposición de proteína tisular en contraposición a menores depósitos de grasa y contenido de nitrógeno úrico en sangre, este

último parámetro como una medida indirecta de la oxidación de aminoácidos dietarios (Oliver et al., 2014). Finalmente, en el caso de retos sanitarios crónicos, se ha demostrado que la Lisozima reduce la severidad de la respuesta inmune a través de la disminución de algunas citoquinas proinflamatorias (IL-6 y TNF- α), las cuales son responsables de dirigir nutrientes a la respuesta inmune en desmedro de su disponibilidad para procesos de crecimiento (Oliver et al., 2014; Ragland y Criss, 2017).

4. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de la presente evaluación, la función antibacteriana de la lisozima se produce a través de la acción directa bacteriolítica fijándose a la pared celular bacteriana o con la estimulación de la función fagocítica de los macrófagos. demostrando ser una alternativa viable para el control de coccidiosis en lechones, con la necesidad de continuar los estudios para esclarecer totalmente su mecanismo de acción y generar así protocolos de manejo que permitan la eficaz reducción del uso de antimicrobianos tradicionales en fases iniciales de la cría de cerdos.

5. REFERENCIAS

- Assefa, A., & Bihon, A. (2019). Bovine cysticercosis in Ethiopia: A systematic review and meta-analysis of prevalence from abattoir-based surveys. *Preventive Veterinary Medicine*, 169, 104707. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104707>
- Cazorla Perfetti, D., Leal Rojas, G., Escalona Nelo, Á., Hernández Nava, J., Acosta Quintero, M., & Morales Moreno, P. (2014). Aspectos clínicos y epidemiológicos de la infección por coccidios intestinales en Urumaco, estado Falcón, Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 54(2), 159–173.
- Dubey, J. P. (Ed.). (2019). *Coccidiosis in Livestock, Poultry, Companion Animals, and Humans*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429294105>
- García Dávila, P., Rivera Fernández, N., García Dávila, P., & Rivera Fernández, N. (2017). El ciclo biológico de los coccidios intestinales y su aplicación clínica. *Revista de la Facultad de Medicina* (México), 60(6), 40–46.
- Gong, Q.-L., Zhao, W.-X., Wang, Y.-C., Zong, Y., Wang, Q., Yang, Y., Yang, Y., Shi, K., Li, J.-M., Leng, X., Du, R., & Zhao, Q. (2021). Prevalence of coccidia in domestic pigs in China between 1980 and 2019: A systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors*, 14, 248. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04611-x>
- Hendrix, C. M. (1999). *Diagnóstico Parasitológico Veterinario*. Editorial Harcourt Brace. 2da Edic. Madrid, España. 325 p. <http://www.libreriaserviciomedico.com/product/299723/diagnostico-parasitologico-veterinario--hendrix>

Artículo científico: Efecto de la suplementación con clorhidrato de Lisozima sobre el control de Coccidiosis y parámetros productivos de cerdos predestete

Publicación Semestral. Vol. 1, No. 2, julio-diciembre 2022, Ecuador (p. 70-79)

- Knecht, D., Jankowska, A., & Zaleśny, G. (2012). The impact of gastrointestinal parasites infection on slaughter efficiency in pigs. *Veterinary Parasitology*, 184(2–4), 291–297. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.09.006>
- Lindsay, D. S., Dubey, J. P., & Santín-Durán, M. (2019). *Coccidia and other protozoa*. Diseases of swine, 1015-1027. <https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch66>
- Lu, C., Yan, Y., Jian, F., & Ning, C. (2021). Coccidia-microbiota interactions and their effects on the host. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 751481. doi: 10.3389/fcimb.2021.751481
- May, K. D., Wells, J. E., Maxwell, C. V., & Oliver, W. T. (2012). Granulated lysozyme as an alternative to antibiotics improves growth performance and small intestinal morphology of 10-day-old pigs. *Journal of Animal Science*, 90(4), 1118-1125. doi: 10.2527/jas.2011-4297
- Mundt, H. C., Joachim A., Becka M. & Dausgchies A. (2006). *Isospora suis*: an experimental model for mammalian intestinal coccidiosis. *Parasitology Research*, 98, 167-175. doi. 10.1007/s00436-005-0030-x
- Oliver, W. T., & Wells, J. E. (2015). Lysozyme as an alternative to growth promoting antibiotics in swine production. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6, 1-7. doi. 10.1186/s40104-015-0034-z
- Oliver, W. T., Wells, J. E., & Maxwell, C. V. (2014). Lysozyme as an alternative to antibiotics improves performance in nursery pigs during an indirect immune challenge. *Journal of Animal Science*, 92(11), 4927-4934. doi: 10.2527/jas.2014-8033.
- Ózsvári, L. (2018). Production impact of parasitisms and coccidiosis in swine. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*, 7, 217–222. <https://doi.org/10.15406/jdvar.2018.07.00214>
- Ragland, S. A. & Criss, A. K. (2017). From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLOS Pathogens*, 13: 1-22. doi: 10.1371/journal.ppat.1006512
- Sotirov, L. & Koinarski, V. (2003). Lysozyme and complement activities in broiler-chickens with coccidiosis. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 154, 780-784. https://www.researchgate.net/publication/280229021_Lysozyme_and_complement_activities_in_broilerchickens_with_coccidiosis
- Sotirov, L. & Koinarski, V. (2005). Lysozyme and complement activities in broiler-chickens with coccidiosis. II. Experiment with *E. acervulina*. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 156, 199-201. https://www.researchgate.net/profile/Lilyan-Sotirov/publication/280229021_Lysozyme_and_complement_activities_in_broilerchickens_with_coccidiosis/links/55ae15d508ae98e661a46e37/Lysozyme-and-complement-activities-in-broilerchickens-with-coccidiosis.pdf
- Steel, R. & Torrie J. (1985). *Bioestadística: Principios y Procedimientos*. Editorial Mc Graw-Hill. 2da. Edic. Bogotá. Colombia. 622 p. file:///C:/Users/Usuario_2/Downloads/Steel_Robert_G_Bioestadistica_Principios.pdf
- Zhang, G., Mathis, G. F., Hofacre, C. L., Yaghmaee, P., Holley, R. A., & Durance, T. D. (2021). Effect of a radiant energy-treated lysozyme antimicrobial blend on the control of clostridial necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Diseases Digest*, 5, 43–44. doi:10.1637/9549-937010-digest.1