

93
2es



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EVALUACION DE UN PROBIOTICO PARA LA
PREVENCION DE LA INFECTIVIDAD Y
MORTALIDAD POR *Salmonella gallinarum* EN
POLLOS DE ENGORDA DE UN DIA DE EDAD.**

T E S I S

**PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO
Z O O T E C N I S T A**

**P O R
DONAJI GARCIA LOPEZ**

**ASESORES : MVZ., M.C., PH. D. GUILLERMO TELLEZ ISAIAS
DVM., M.S., PH. D. BILLY M. HARGIS**



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**EVALUACION DE UN PROBIOTICO PARA LA PREVENCIÓN DE LA
INFECTIVIDAD Y MORTALIDAD POR *Salmonella gallinarum* EN
POLLOS DE ENGORDA DE UN DÍA DE EDAD.**

**Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la
Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del Título de
Médico Veterinario Zootecnista
Por:**

DONAJI GARCIA LOPEZ

Asesores:

**M.V.Z., M.C., Ph. D. Guillermo Tellez Insias
D.V.M., M.S., Ph. D. Billy M. Hargis**

México, D.F.

1995

DEDICATORIAS

A Claudia López Jiménez y Celso García Espinosa :

Mis padres, por darme la vida y con ella la libertad de tomar mis decisiones siempre dándome su apoyo, su confianza y el claro ejemplo de superación y honestidad. Gracias a ustedes lo he tenido todo, pero lo más valioso ha sido su amor.

Amis hermanos:

Celso, Luisa, Elia, Claudio (por ayudarme cuando lo necesite), Delta (bobi : por tu paciencia) y Moni (por ser además mi amiga) por su cariño y ejemplo.

A Marisol :

Porque no sólo lleno la casa de mamilas y pañales, sino de risas y amor.

A Enrique:

Por que es un paso que dimos juntos. Gracias por confiar en mí, por tu paciencia y apoyo, pero sobre todo por ese cariño tan grande.

A Enequina Jiménez Castro:

Mi abuela, por enseñarme el amor a la vida, de despertar y darle gracias a Dios y por todo tu cariño.

A la Sra. Magdalena Castellanos † :

Por que además de cariño, me dió el ejemplo de luchar por la vida, sin lamentaciones en los momentos difíciles y por el legado que dejó : su hijo.

AGRADECIMIENTOS

A mi abuelo, Maurilio López, mi tía Dorita a Nancy y Claudia : Por su cariño y esos momentos tan gratos.

A mis tíos: Adán y Carito , Eva, César y Gloria , Cuauhtémoc, Judith y Olga por su ejemplo de superación, honradez y hermandad.

A Evita: por esa ternura que despertó en todos.

A mis primos: Elsa, César, Yuxi, Ita, Eneida, Charly, Job, Arquímedez, Stephanie, Teresa, Adán, Lalo y Araceli. Por que en contacto o no, formamos una gran familia.

A mis amigos de toda la vida: Gaby, Marco, Martha L., Karim y José Luis; por que en todas mis etapas han estado conmigo.

A Juanita y Mara: Por que marcaron una etapa muy importante en mi vida con el sello valioso de su amistad.

A quienes me dieron ejemplo y apoyo día con día: Greta, Javier, Gerardo, Martha , Paty y Pedro... y perdurarán como amigos toda la vida.

A mis hermanas por convicción : Norma, Pilar Velazco, Pilar Ponce, Ginny, Gissele, Ruthsella y Verónica, por que nos une el maravilloso mundo del guidismo.

A mis niñas : Sandra, Berenice, Bibiana, Vianey, Verónica, Frida, Paty, Ruth, Gloria, Cinthia, Itzel y Laura karina, por su confianza, cariño y amistad.

Al Doctor Guillermo Telléz Isaías: Por creer en mí y brindarme su ayuda GRACIAS.

A Xóchitl Hernández : Por todo tu apoyo, tu compañerismo y sobre todo por tu paciencia.

A Salvador Tavera : Por ser el primero en confiar en mí y brindarme tu valiosa amistad.

Al DPA: Aves y mis compañeros : Pilar, Odette y Cecilia por lo importante que fué su ayuda en la realización de este trabajo. Magda y Luisa, gracias por escucharme.

A mi jurado : por su tiempo y consejos.

A mi Facultad, mi Universidad. Me siento orgullosa de pertenecer a ella.

A quienes me inspiraron: Zar, Kayzer y Misha.

A quienes nos ayudan a obtener resultados : Las aves.

Por su apoyo económico : Al USAID : University Linkage Project # PCE - 5063-A-00-2045-00 y a Grupo Agropecuario Tepexpan, S. A. de C. V.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
OBJETIVOS E HIPOTESIS	10
MATERIAL Y METODOS	11
RESULTADOS.....	14
DISCUSION.....	15
CONCLUSIONES.....	17
LITERATURA CITADA.....	18
CUADROS.....	27
FIGURAS.....	30
ANEXOS.....	31

RESUMEN

GARCIA LOPEZ, DONAJI. EVALUACIÓN DE UN PROBIÓTICO PARA LA PREVENCIÓN DE LA INFECTIVIDAD Y MORTALIDAD POR *Salmonella gallinarum* EN POLLOS DE ENGORDA DE UN DÍA DE EDAD. (Bajo la asesoría de: MVZ, MC, PhD Guillermo Téllez Isafas y DVM, MS, PhD Billy Marshal Hargis).

El presente estudio evalúa la capacidad de un cultivo en flujo continuo, (CF3), obtenido a partir del contenido cecal de aves adultas libres de *Salmonella spp.* contra la colonización cecal e invasión de órganos por *Salmonella gallinarum* (*S. g.*) en pollo de engorda. Al día de edad se administró vía oral el CF3 (10^8 UFC/ml anaerobias) en todos los animales del grupo experimental (E) (105/105), ninguno de los animales testigo T (105/105) recibieron el probiótico. Cuarenta y ocho horas después, 33.33 % (35/105) de los pollos de ambos grupos fueron desafiados vía oral con *S. g.* (10^8 UFC/ml), a dichas aves se les denominó E y T. De la mortalidad diaria se realizó cultivo bacteriológico directo de hígado. Las aves sobrevivientes fueron sacrificadas a los 14 días postinoculación y se cultivaron muestras de hígado-bazo y tonsilas cecales de acuerdo a los lineamientos establecidos por el Plan Nacional de Mejoramiento Avícola (NPIP). Al término del estudio, CF3 redujo la invasión en órganos en un 27.58 % ($P < 0.005$) en los pollos E. Igualmente, la administración de CF3 redujo el número de aves positivas a *S. g.* en tonsilas cecales en un 38.56 % ($P < 0.001$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas ni en la mortalidad total ni en el aislamiento diario de *S. g.* ($P > 0.05$) entre los grupos. Estos datos sugieren que el CF3 puede ser utilizado para controlar la transmisión horizontal contra *Salmonella gallinarum*.

INTRODUCCIÓN

La Tifoida Aviar (T.A.) se encuentra presente en la avicultura comercial de algunos países de Latinoamérica, Africa y Medio Oriente afectando principalmente a las aves productoras de huevo para consumo y a las aves reproductoras pesadas (67).

En México la T. A. ha venido ocasionando grandes pérdidas económicas a la avicultura a través de los años. Estudios realizados en 1987 sobre las repercusiones económicas de la Tifoida Aviar en reproductoras pesadas se calculó una pérdida aproximada de 80,000 millones de pesos; existiendo en el país 4 millones de aves, de estas el 40% estaban infectadas, dejando de producir 120,000 toneladas de carne anuales (72,80).

El agente etiológico, *Salmonella gallinarum* (S.g.), es una bacteria perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, de forma bacilar, gram negativa, inmóvil, sin cápsula y no esporulada; fermenta la glucosa casi siempre con formación de gas pero no utiliza la lactosa ni la sacarosa, tiende a producir ácido sulfhídrico (H₂S). Sobrevive en forma libre en agua durante largos períodos de tiempo (54).

El género *Salmonella* se encuentra subdividido en 3 especies: *S. typhi*, *S. cholerae-suis* y *S. enteritidis* y por el momento se han clasificado más de 2,200 serotipos antigénicamente distintos (29). Esta clasificación se basa en las características de los antígenos "O" o somáticos para la formación de serogrupos y de los antígenos "H" o flagelares para la identificación del serotipo (34, 54, 73). *Salmonella gallinarum* se sitúa dentro de la especie *Salmonella enteritidis* y posee los antígenos somáticos 1, 9 y 12.

Estudios realizados por Boca, Hauditz y Komarov (57) han reportado la enfermedad en pollos jóvenes. Ziprin reportó que durante los primeros 5 días de edad los pollos son más susceptibles a la T.A. (106).

El período de incubación es de 4 a 5 días, aunque este varía por la virulencia de la cepa. El curso de la enfermedad es de 5 días pero puede extenderse hasta 2 a 3 semanas (71).

Las aves infectadas por T.A. y portadoras asintomáticas son el medio más importante de perpetuación y diseminación de la enfermedad, estas pueden infectarse no únicamente entre ellas mismas, sino también en generaciones sucesivas a través del huevo (71).

Estudios recientes indican que *Salmonella* puede entrar y colonizar el ciego de aves recién eclosionadas vía cloacal cuando ésta entra en contacto con superficies contaminadas de la incubadora (24). Otros investigadores han reportado que los movimientos de succión espontáneos de los labios de la cloaca de pollos recién eclosionados, acompañados de contracciones peristálticas del ciego, resultan en un movimiento de acarreo de materiales, desde los labios de la cloaca al ciego, dentro de las dos primeras horas después de la aplicación (92).

La bacteria puede ser aislada de hígado y bazo, siendo estos, los órganos de elección para el cultivo debido a la gran capacidad de *Salmonella gallinarum* para penetrar la pared intestinal y diseminarse a través del torrente sanguíneo a órganos internos (38, 77).

La industria avícola de hoy es manejada bajo condiciones extremas de higiene: los huevos son removidos de la gallina al momento de la ovoposición, son desinfectados, incubados bajo condiciones casi estériles y una vez eclosionados, son criados bajo condiciones de control muy estrictas; todo esto puede retardar el establecimiento de la flora cecal definitiva, incrementando la susceptibilidad de estos pollos a la colonización de patógenos entéricos, incluyendo *Salmonella*.

Estudios recientes han indicado que la exposición a microflora entérica normal de pollo puede ser un medio eficaz de protección contra los patógenos entéricos (Anexos 1,2 Y 3). Normalmente los ciegos de aves adultas contienen 10^{11} bacterias por gramo de materia cecal, a partir de una flora inicial principalmente anaerobia facultativa, posteriormente la flora aumenta gradualmente en complejidad alrededor de las primeras 4 a 6 semanas.

Se han aislado más de 40 diferentes tipos de bacilos y coxys anaerobios Gram positivos y Gram negativos no esporulados, así como por lo menos 17 diferentes especies de *Clostridia*. El género *Lactobacillus* está presente hasta el tercer día de edad (4, 8).

Como resultado de las investigaciones realizadas por Nummi (1973) en las que demostró que el contenido intestinal proveniente de pollos adultos sanos, administrado oralmente a pollos de un día de edad, disminuyeron su susceptibilidad a la infección por *Salmonella*, previniendo así el establecimiento de ésta en el intestino, ésta teoría llegó a ser conocida como "Concepto Nummi". Las primeras investigaciones sobre éste fenómeno fueron realizadas por Gause en 1934, llegando a postular que "dos especies con ecología similar no pueden vivir en el mismo sitio al mismo tiempo". Esto se conoce como el "Principio de Gause"(44):

Las características para que este principio se cumpla son las siguientes:

I. Que dos poblaciones que no están genéticamente emparentadas entre sí, ocupan el mismo nicho ecológico, es decir, que hagan lo mismo.

II. Que ocupen el mismo territorio, y

III. Si la población A se multiplica un poco más rápidamente que la población B, terminará la población A por desplazar a la población B (46).

El mecanismo ha sido descrito por varios autores que le han dado diferentes nombres: antagonismo bacteriano (Freter 1956), interferencia bacteriana (Duhon 1963), efecto barrera (Duchuzau y cols. 1970), resistencia a colonización (Van der Waaj y cols. 1971) y exclusión competitiva (Lloyd y cols. 1977).

Dentro de las teorías que se mencionan como los mecanismos por los cuales la flora normal inhibe la colonización de enteropatógenos o exclusión competitiva están: competencia por nutrientes limitantes (31, 32, 97), competencia por los sitios receptores (60, 70, 90, 91), disminución del potencial de oxidoreducción (Eh) intestinal (4, 42, 64) y la producción de cadenas cortas de ácidos grasos volátiles (AGV), que cuando están en su estado lipófilico no disocian sus inhibidores de la invasión por enteropatógenos, particularmente el ácido acético, propiónico y butírico (4, 6, 7, 10, 12, 79, 105).

Es improbable que cualquiera de estos mecanismos sea responsable por sí sólo de la inhibición de enteropatógenos.

En cuanto a la competencia por sitios receptores hay que tener en mente que es un fenómeno específico de huésped (9, 35), que la adhesión varía entre cepas de la misma especie (9) y que puede estar influenciada por las condiciones de crecimiento y experimentalmente por el medio utilizado (22, 37).

Las infecciones por *Salmonella* generalmente ocurren en el intestino grueso, debido probablemente a la poca motilidad, el pH alcalino y una falta general de enzimas digestivas. Algunos estudios indican que la adherencia y posterior invasión de la mucosa intestinal por *Salmonella* es un evento clave en infecciones por este género. El mecanismo por el cual la bacteria penetra al epitelio de la mucosa todavía no es conocido claramente, sin embargo hay evidencia, de que la bacteria y la célula hospedera tienen factores de importancia en el proceso de penetración bacteriana (14). La adhesión de la bacteria al epitelio escamoso muestra un alto grado de especificidad. En el pollo, sólo cepas de *Lactobacillus* aisladas de pollos y otras aves pueden adherirse a células epiteliales del buche. (35).

Sobre las razones teóricas que apoyan la competencia por nutrientes que operan en el intestino, no hay evidencia consistente. Estudios *in vitro* demuestran una competencia por fuentes de carbono entre la microflora

normal intestinal y *Shigella flexneri* (32), pero el efecto antagonista puede ser cambiado por la alteración del medio (47).

Las bacterias anaerobias de la flora intestinal de pollos maduros producen cadenas cortas de AGV (7), los cuales pueden inhibir el crecimiento de *Salmonella* (64). Estas bacterias también disminuyen el potencial de oxidación-reducción (Eh) de su medio ambiente (6). Bajos valores de Eh han sido reportados como incrementadores de la actividad antibacteriana de esos AGV (64).

Hinton (49) concluye que al aumento de las concentraciones de ácido láctico está directamente correlacionado con la disminución del pH cecal y causa un aumento significativo ($P < 0.05$) en la forma disociada de algunos ácidos grasos volátiles de cadena corta.

La baja concentración de AGV más el alto pH del intestino de los pollos recién eclosionados son las principales razones por la que estos pollos son más susceptibles a la colonización de *Salmonella* que las aves adultas.

Barnes y cols. (7) reportaron que el pH cecal de los pollos recién eclosionados es de aproximadamente 6.5; éste disminuye a 5.7 en el día 7, estableciéndose en 6.0 alrededor del día 21.

Meynell (64) reportó que un bajo pH en el intestino de ratón resulta en el incremento en la colonización por bacterias anaerobias obligadas nativas que produce condiciones desfavorables para el crecimiento de *S. typhimurium*. Barnes y cols. (6) reportaron además que la colonización de anaerobios facultativos en el tracto gastrointestinal de pollos disminuye el pH y promueve un crecimiento de bacterias anaerobias que producen AGV y otras sustancias que inhiben el crecimiento de enteropatógenos.

Es sabido que los AGV ejercen su actividad inhibitoria sobre las infecciones por *Salmonella* en su estado disociado, el cual es determinado por el pH. (5, 6, 12, 13, 64, 76). Bohnhoff y cols. reportaron que la actividad anti-*Salmonella* de los AGV son aumentadas bajo condiciones de anaerobiosis. (12).

Nisbet y cols. reportaron que la protección contra la colonización de *S. typhimurium* estaba altamente relacionada con el ácido propiónico no disociado (68). Previamente ellos mismos reportaron que el ácido propiónico es producido a partir de ácido láctico por bacterias cecales de cultivo en flujo continuo (CF).

El pH afecta la actividad antibacteriana de los AGV por la alteración del promedio de disociación del ácido (64). La forma lipofílica no disociada del ácido es responsable de la actividad antibacteriana de los AGV porque este puede penetrar más fácilmente la pared celular bacteriana. Una vez dentro, el ácido puede disociar

y destruir la pared. El promedio de ácido no disociado presente es determina lo por el pH de su medio ambiente y el pK_a del ácido.

Meynell (64) realizó experimentos *in vivo* para demostrar la interacción entre pH, cadenas cortas de AGV, y Eh bajo en la resistencia de la colonización intestinal en ratón por *Salmonella*. Barnes (7) dirigió estudios *in vitro* que demostraron que la flora anaerobia intestinal de pollos adultos criada en medio Vianco Levee (VI) con una fuente de carbohidratos de 0.25 % de glucosa podía producir suficientes AGV para inhibir *S. typhimurium*.

Aunque los antibióticos pueden ayudar inicialmente en el tratamiento de enteritis bacterianas, sus beneficios son a veces anulados por una diarrea post-antibiótica. Aunque la patogénesis de ésta diarrea no esta del todo entendida, hay estudios que evalúan la composición gastrointestinal y fical durante la terapia y han demostrado un decremento o desaparición de *Lactobacillus acidophilus*. (43).

Los *Lactobacillus* y *Streptococcus* son los grupos más comunmente utilizados en la producción de probióticos. La justificación para el uso de *Lactobacillus* radica en los estudios que muestran que cuando la flora intestinal se desarrolla después del nacimiento al aumentar *Lactobacillus* algunos patógenos disminuyen (88). Experimentos con pollos gnotobióticos han confirmado que *Lactobacillus* ejerce un efecto controlador sobre *E. coli* (36).

Por sí mismas, algunas de las bacterias incluídas en los probióticos son productoras de antibióticos. El *Lactobacillus* ha sido reportado como productor de varios tipos de antibióticos. *Lactobacillus acidophilus* produce acidofilin, lactocidin (98, 99) y acidolin (45). *Lactobacillus plantarum* produce lactolin (56).

Los metabolitos antibióticos de *Lactobacillus* : acidolin, acidofilin, lactohacilin y lactocidin han demostrado *in vitro* una actividad inhibitoria contra *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y cepas enteropatógenas de *E. coli* (65).

El *Streptococcus* produce los metabolitos Nissina y diplococcina. Algunos *Lactobacillus* producen suficiente H_2O_2 capaz de inhibir varios microorganismos (25, 78).

Las bacterias ácido-lácticas (LAB) producen ácidos orgánicos y ácidos lácticos que también inhiben el crecimiento de muchos organismos patógenos Gram negativos (40). Esta actividad puede estar dada por la baja en el potencial de oxido-reducción (disminuyendo con esto el O_2 disponible para los patógenos) y un bajo pH mantenido dentro del intestino a través del metabolismo LAB.(83)

El término probiótico fue primero utilizado por Parker en 1974 para describir "organismos y sustancias que contribuyen al balance de la microflora intestinal". El término "probiótico" se origina de dos palabras griegas que significan : "por la vida" y es contrario con el término antibiótico que significa "contra la vida".

Los probióticos incluyen bacterias y sus metabolitos siendo los más utilizados las bacterias productoras de ácido láctico (Anexo 4), las levaduras y las enzimas digestivas derivadas de ellas. (44).

Las características de un probiótico ideal son (37):

- No ser patógenos ni tóxicos para humanos y animales.
- Alta tolerancia a la bilis y acidez.
- Capacidad de alcanzar y colonizar el tracto digestivo.
- Bacterias rápidas productoras de ácido láctico (principalmente).
- Bacterias viables en número suficiente para ser significativas, conociendo la dosis mínima efectiva.
- Fácil proliferación *in vitro*.
- Fácil proliferación *in vivo*.
- Ser estable y capaz de permanecer viable por largos períodos, bajo condiciones de laboratorio y campo.
- Alta tasa de sobrevivencia después del procesamiento (recuperación, liofilización) (103).

Los probióticos han sido utilizados como promotores del crecimiento para reemplazar el uso tan difundido de antibióticos y otros suplementos químicos del alimento. Los resultados en dietas de pollo han sido variables, pero existen reportes con efectos favorables estadísticamente significativos sobre el peso y la producción del huevo (26, 66). A diferencia de lo confirmado en experimentos donde existió suplementación con antibióticos al alimento de pollo libre de gérmenes, donde no incrementaron su estado de crecimiento (100).

Los cultivos en CF fueron usados en estudios previos para reproducir las interacciones bacterianas que ocurren en el intestino grueso del ratón. Los autores sugieren que al menos los mecanismos de mayor importancia que operan en el modelo de CF se asemejan al del intestino grueso (32).

Nisbet y cols. (68) demostraron que la flora ocular nativa que protege contra la colonización por *Salmonella* puede mantenerse en cultivo de flujo continuo, sin pérdida de su eficacia. Más aún, Los

principales mecanismos de adherencia bacteriana a la pared intestinal, por ejemplo, la adherencia de una bacteria a otra, puede ser reproducido exactamente en los cultivos CF, así como aquellas sustancias que son requeridas para mantener el balance ecológico (33).

Los cultivos en CF han sido utilizados además para estudiar interacciones entre *Clostridium*, *Lactobacillus* y *Escherichia coli* (53).

Aunque las mezclas indefinidas de bacterias cecales o fecales obtenidas de pollos adultos han mostrado un control efectivo en la colonización por *Salmonella* cuando se administra a pollos recién nacidos (18, 15, 74, 90, 63) y se están comercializando en Suecia y Finlandia, el uso comercial de cultivos indefinidos es inaceptable en los demás países por la posibilidad de transmisión de patógenos aviares o humanos. (62, 93). Por ésta razón hay una necesidad de desarrollar mezclas de cultivos bacterianos definidos, que efectivamente controlen infecciones por *Salmonella sp.*

Stavric (93) encontró que la protección contra *Salmonella* fue menor cuando los pollos fueron inculados con cultivos bacterianos que primero crecieron separados en cultivo puro y justo antes de la administración fueron mezclados; que cuando los cultivos crecieron separados, fueron mezclados y nuevamente se dejaron en crecimiento.

Goren y cols. (42) reportaron que una mezcla de 295 cultivos puros de anaerobios obligados indefinidos, aislados de intestino de pollo no fue efectivo en el control de *Salmonella* hasta que los anaerobios facultativos fueron incluidos.

Esto sugiere que la estrecha asociación de varias bacterias en un cultivo mixto definido antes de la administración al pollo puede ser un factor importante en el desarrollo de un eficaz cultivo definido. Los factores claves para utilizar los probióticos de cultivos definidos en forma exitosa son la presencia de bacterias viables y en cantidades suficientes, con alta capacidad de colonizar el tracto gastrointestinal y con capacidad para crecer en el medio ambiente intestinal.

Los probióticos han sido administrados a pollos por una variedad de rutas de tratamiento, incluyendo ración directa sobre los pollos, inoculación clinal (16), inoculación in ovo (23), inoculación oral, inclusión en la primera agua de bebida, como suspensión en el alimento, y encapsulación en bolitas de alginato añadidos al alimento (48). Este último sistema ha sido utilizado para prolongar la supervivencia y permitir el continuo crecimiento de las bacterias bajo varias condiciones ambientales.

La comprensión de la importancia de la flora normal en la exclusión de *Salmonella* en las aves, puede proporcionar beneficios inmediatos a la industria avícola dado que el abuso de antibióticos, puede ser un facilitador en el establecimiento de infecciones por *Salmonella* al disminuir la microflora normal (19, 61).

OBJETIVOS

- 1.-Evaluar la eficacia del probiótico CF3 en el tratamiento de la Tifoidea Aviar.
- 2.-Comparar los porcentajes de mortalidad, morbilidad y aislamiento en las aves inoculadas con *Salmonella gallinarum* y en las aves inoculadas y tratadas con un probiótico.

HIPÓTESIS

La administración de un probiótico en pollos de engorda de un día de edad, puede ejercer un efecto protector sobre la posterior infección y colonización de *Salmonella gallinarum*, mediante un efecto de exclusión competitiva.

MATERIAL Y MÉTODOS

Salmonella : Se utilizó una cepa de campo patógena de *Salmonella gallinarum* U-2 (donada por el Dr. Mario Padrón), resistente a la novobiocina (NO) y al ácido nalidixico (AN). El inóculo para el desafío se preparó con solución salina fosfatada bufferada (PBS) estéril. La concentración celular viable del inóculo fue de 10^8 UFC/ ml determinada por el conteo de colonias en placas de Agar Verde Brillante (AVB).

Análisis de experimentación : Se utilizaron 210 pollos de engorda (Arbor Acres) de 1 día de edad procedentes de una incubadora comercial, que fueron manejados en piso de las unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves, FMVZ, UNAM. Se les proporcionó alimento comercial y agua *ad libitum*. A su llegada se realizó un estudio bacteriológico de la paja de transporte, alimento e hígado de pollo con el fin de demostrar la ausencia de *Salmonella* sp utilizando métodos convencionales de cultivo (1).

Probiótico : Es una mezcla de cultivos bacterianos mantenida en flujo continuo (CF) elaborado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica y la Universidad de Texas A & M a base de 29 bacterias (Anexo 5) anaerobias facultativas y obligadas, denominado CF3.

Los ciegos de 3 aves de 10 semanas de edad libres de *Salmonella* spp., sirvieron para la preparación del inóculo original; se obtuvieron asepticamente y fueron transferidos inmediatamente a una cámara de anaerobiosis (Coy Laboratory Products Ann Arbor, Mich.). Cada ciego fue cortado en varios pedruzcos y macerado, homogeneizado con su contenido, se le agregó glicerol para una concentración final del 20%. Fueron añadidos 5 ml del contenido cecal a 100 ml del medio VL., incubado anaeróticamente a 39 °C y utilizado como el cultivo origen para el sistema de cultivo en CF (21).

El probiótico se caracteriza porque las proporciones de ácido acético y propiónico son similares a las reportadas previamente en el ciego de pollos jóvenes (17).

En el Departamento de Producción Animal: Aves se recibió como un liofilizado, reconstituyéndose en VL e incubándose a 37 °C, 48 horas antes de la llegada de los pollos.

Diseño experimental : Los animales se dividieron en dos grupos, de 105 cada uno, uno de ellos se utilizó como grupo experimental, en donde todas las aves recibieron 0.5 ml del probiótico vía oral al día de edad; a

las aves del grupo testigo no se les administró el probiótico. A las 48 horas, en ambos grupos se inocularon únicamente 35 aves con 0.25 ml del inculo de *Salmonella gallinarum* a una concentración de 10^8 UFC/ml por vía oral, ya que con ésta dosis se obtiene un 100 % de mortalidad (39); en lo posterior estas aves inoculadas se identificaron como T⁺ y E⁻ para las pertenecientes a los grupos testigo y experimental respectivamente.

Las aves no inoculadas permanecieron en el mismo sitio de las aves inoculadas, con el fin de reproducir la enfermedad por transmisión horizontal. Se estimó obtener mínimo un 80% de infección de esta manera.

Diariamente se registró la morbilidad y mortalidad, de la que se realizó aislamiento bacteriológico a partir de la siembra directa de hígado en placas de AVB, adicionado con 200 mg/ml de AN y 25 mg/ml de NO, (AVB + AN-NO).

A los 14 días post-desafío las aves sobrevivientes se sacrificaron para realizar cultivo de órganos de acuerdo a los lineamientos del Plan Nacional de Mejoramiento Avícola (NPIP) de los E.U. (96).

	EXPERIMENTALES		TESTIGOS	
GRUPO (N)	E (70)	E ⁻ (35)	T (70)	T ⁻ (35)
TRATAMIENTO	Con CF3	Con CF3	Sin CF3	Sin CF3
	Sin <i>S. gallinarum</i>	Con <i>S. gallinarum</i>	Sin <i>S. gallinarum</i>	Con <i>S. gallinarum</i>

Colonización e invasión de órganos por *Salmonella gallinarum*: El hígado y bazo fueron colectados asepticamente, trabajándose como una muestra combinada, con el fin de determinar la invasión a órganos. De la misma manera se colectaron las tondeas cecales para determinar la colonización; para así incubarlos de 18 a 24 horas a 37°C en caldo tetracinato (58). Después de la incubación, el medio fue agitado y se procedió a realizar siembras en placas de (AVB + AN-NO), las cuales se incubarán por 24 horas a 37° C para posteriormente examinar el crecimiento de colonias lactosa negativas y resistentes a AN-NO. Se realizaron pruebas bioquímicas de estas colonias para verificar que correspondían a *Salmonella gallinarum*.

Se determinó el porcentaje de reducción de invasión y colonización en órganos de aves sacrificadas, mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\% \text{Testigo} - \% \text{Experimental}}{\% \text{Testigo}} = \% \text{Reducción}$$

• Comunicación personal D. V. M., M. S., Ph. D. Billy M. Hargis.

Universidad de Texas A & M.

Análisis estadístico: Para determinar las diferencias significativas en cuanto a invasión de órganos y mortalidad se utilizó un análisis de Ji-cuadrada (104).

RESULTADOS

Análisis bacteriológico de paja de transporte, alimento y aves: A la llegada de los animales se tomaron muestras representativas de paja, alimento y 10 pollinos con resultados negativos al aislamiento de *Salmonella* spp.

Mortalidad: El cuadro 1 muestra la mortalidad causada por la inoculación oral de 10^8 UFC/ml de *Salmonella gallinarum* en pollos de engorda al tercer día de edad en ambos grupos. La mortalidad se presentó a partir del cuarto día postinoculación en los 2 grupos y tanto en los animales inoculados y en los no inoculados. No se observó una diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) en la mortalidad registrada por los grupos E y E' al compararlos respectivamente con las aves testigo T y T'.

En relación a la mortalidad acumulada (MA) se observó en las aves E' un retardo en la mortalidad, ya que en el día 9, en las aves T' se observaron 14 aves, a diferencia de 7 en el grupo E; la MA fue igual en ambos grupos a partir del día 13. Respecto a la MA de las aves T y E no se encontró diferencia alguna.

Invasión de órganos por *Salmonella gallinarum* en aves muertas: El cuadro 2 muestra los pollos positivos al aislamiento de *Salmonella gallinarum* del cultivo primario de hígado a partir de la mortalidad causada por la inoculación oral de 10^8 UFC/ml de S. g. al tercer día de inoculación y posterior al tratamiento o no con el probiótico. No fue posible aislar la bacteria en 5 aves que murieron por la infección. No se observó una diferencia significativa ($P > 0.05$) en la invasión de órganos entre grupo tratado y testigo.

Invasión de órganos por *Salmonella gallinarum* de aves sobrevivientes: A los 14 días postinoculación se sacrificaron los animales y los resultados se muestran en el cuadro 3. Se observó en los animales E una diferencia significativa ($P < 0.005$) en el número de pollos positivos en un 34,92 % al cultivo de órganos (Hígado-Bazo); al compararlos con el grupo T con 62,5 %. De igual manera se observó una diferencia altamente significativa ($P < 0.001$) en el total de positivas E al cultivo de tonsilas cecales de un 31,74 % al compararlos con las T con 70,3% (Figura 1).

DISCUSION

Dentro de los principales problemas que afectan a la avicultura comercial se encuentran las infecciones causadas por enterobacterias, principalmente aquellas causadas por *Salmonella* sp. La importancia de *Salmonella gallinarum* no solo radica en la mortalidad, sino en el retraso del desarrollo, baja de la producción de huevo, baja en la fertilidad, costas por concepto de vacunas y antibióticos; así como, la existencia de portadoras sanas. (71)

En el presente estudio se evaluó la mortalidad y el aislamiento bacteriano de *Salmonella gallinarum*, en animales tratados con un probiótico al día de edad y posteriormente desafiados a las 48 horas con una concentración viable de 10^8 UFC/ml de *Salmonella gallinarum* (E⁺). No se encontraron diferencias significativas con el grupo testigo (T⁻). Sin embargo, se observó una reducción en la invasión del 44 % y de la colonización del 55 % en las aves tratadas no inoculadas (E) a los 14 días postinoculación, lo que sugiere un efecto protector del producto (CF3) contra la infección vía transmisión horizontal, mediante el principio de exclusión competitiva.

Posiblemente, la dosis de desafío de *Salmonella gallinarum* utilizada en el presente experimento (10^8 UFC/ml) resulta ser muy elevada como para permitir la protección efectiva del probiótico; Hinton y cols. (49) demostraron una disminución en la colonización de *Salmonella typhimurium*, en ciego, de pollo inoculado con 10^8 UFC/ml a diferencia de aquellos desafiados con 10^6 UFC/ml, así como una mayor concentración de AGV y una menor recuperación de bacteria cuando los ciegos se cultivaron en caldo salmón.

En el presente estudio los pollos utilizados fueron alimentados con un producto comercial sin aditivos y contrario a lo observado anteriormente la composición de la flora fecal puede ser independiente de la naturaleza de la dieta. Un número considerable de investigadores han demostrado que el equilibrio de numerosos tipos de bacterias no se afecta profundamente por el contenido de las dietas, incluyendo las líquidas (33). Sin embargo, Bailey y cols. (3) tras comparar varios productos comerciales con aditivos antimicrobianos y anticoccidiales en el alimento encontraron que una combinación de nicarbacina y bacitracina interfería con el efecto protector del cultivo de exclusión competitiva para la colonización de *S. typhimurium*, en pollo.

La empresa que se hará cargo de la explotación comercial del producto evaluado (CF3), hizo un cálculo del costo del mismo y concluyó un aproximado de \$ 0.10 U. S. A. por ave, que sería igual a \$ 1.00 U. S. A. por 10 aves (1995).

Así pues, las probióticos son una alternativa en la profilaxis de enfermedades intestinales como nos lo demuestra los diversos estudios hechos por Nisbet y cols., Corrier y cols. y otros que avalan el principio de exclusión competitiva.

La resistencia a la invasión de órganos internos y tonsilas cecales por *S. g.* (cuadro 3) en este experimento se asocia a este principio.

Los resultados de este estudio apoyan a otros en que los cultivos con sistema de CF pueden ser utilizados para estudiar el complejo sistema cecal de las aves y para seleccionar, aislar y mantener cultivos de bacterias nativas que inhiben el crecimiento de *Salmonella*.

Los cultivos de mezclas de bacterias defiridas deben estar compuestos de cepas que sean compatibles y que no alteren el balance normal del ecosistema cecal.

CONCLUSIONES

Al avance de la tecnología se ve la necesidad de obtener alimentos lo menos procesados posible, químicamente hablando, dentro de este procesamiento podemos incluir el tratamiento de los animales con antibióticos; además que al productor le preocupa de sobrepasar los altos costos que esto le provoca.

De acuerdo a las condiciones y resultados de este experimento se puede concluir que la administración de CF3 administrado solamente al día de edad y 48 horas previas a un desafío experimental con *Salmonella gallinarum* (10⁸ UFC/ml) no tuvo un efecto importante en la prevención de la mortalidad, colonización intestinal ni en la invasión a órganos en pollo de engorda. Pero si se puede provocar una protección cuando la transmisión se realiza de manera horizontal.

Este es el primer experimento realizado con *Salmonella gallinarum*, por lo que se sugieren estudios posteriores con variaciones en las concentraciones viables de la bacteria, así como evaluar diferentes vías de administración del probiótico.

LITERATURA CITADA

- 1.-Andrews, H. W., Poolna, P. L., Wilson, C. R. and Romero, A.: Isolation and identification on *Salmonella* In: *Bacteriological analytical manual*, 5th. Ed., *Associations of Official Analytic Chemistry*, Washington, D.C. pp 1-29 (1978).
- 2.-Anderson, W. R., Mitchell, W. R., Barnum, D. A. and Julian, J. R.: Practical aspects of competitive exclusion for the control of *Salmonellas* in turkeys. *Avian Dis.* 28:1071-1078. (1984).
- 3.-Bailey, J. S. Blankenship, C. L., Stern, J. N., Cox, A.N. and McHar.: Effect of antioocidial and antimicrobial feed additives on prevention of *Salmonella* colonization of chicks treated with anaerobic cultures of chickens feces. *Avian. Dis.* 22:324-329. (1988).
- 4.-Barnes, E. M.: The intestinal microflora of poultry and gamebirds during life and after storage. *J. Appl. Bacteriol.* 46:407-419. (1972).
- 5.-Barnes, E. M. and Impery, C. S.: Competitive exclusion of *Salmonella* from the newly hatched chick. *Vet. Rec.* 106:61-62. (1980).
- 6.-Barnes, E. M., Impery, C. S. and Cooper, M.D.: Manipulation of the crop and intestinal flora of the newly hatched chick. *Clin. Nutr.* 33:2426-2433. (1980).
- 7.-Barnes, E. M., Impery, C. S. and Stevens, B. J. H.: Factors affecting the incidence and anti-*Salmonella* activity of the anaerobic cecal flora of the chick. *J. Hyg.* 82:263-283. (1979).
- 8.-Barnes, E. M., Mead, G. C. and Barnum, D. A.: The intestinal flora of the chicken in the period 2 to 6 weeks of age, with particular reference to the anaerobic bacteria. *Br. Poul. Sci.* 13:311-326. (1972).
- 9.-Barrow, P. A., Brooker, B. E., Fuller, R. and Newport, M. J.: The attachment of bacteria to the gastric epithelium of the pig and its importance in the microecology of the intestine. *J. Appl. Bacteriol.* 48:147-154. (1980).
- 10.-Bergeum, O., Hansen, A. H., Pincussen, L. and Weiss, E.: Relation of volatile fatty acids and hydrogen sulphido to intestinal flora. *J. Infect. Dis.* 69:155-166. (1941).
- 11.-Blankenship, I. C., Bailey, J. S., Stern, N. J., Cox, N. A.: Experiences with CE treatment field trials to control *Salmonella* and *Campylobacter* in chickens. Page 18 in: *Abstracts of the International Symposium "Colonization control of human pathogens in poultry"*. Het. Spelderholt, ed., Doorwerth. The Netherlands. (1991).

- 12.-Bohrhoff, M., Miller, C.P. and Marin, W. R.: Resistance of the mouse's intestinal tract to experimental *Salmonella* infection. II. Factors responsible for its loss following streptomycin treatment. *J. Exp. Med.* 120:817-828.(1964).
- 13.-Bohrhoff, M., Miller, C.P. and Marin, W. R.: Resistance of the mouse's intestinal tract to experimental *Salmonella* infection. I. Factors which interfere with the initiation of infection by oral inoculation. *J. Exp. Med.* 120:805-816. (1964).
- 14.-Brett, B. F., Heflicorn, F. and Fallow, S.: Epithelial cell surfaces induces *Salmonella* proteins required for bacterial adherence and invasion. *Science* 341:940-943. (1989).
- 15.-Corier, E. D., Hargis, M. B., Hinton, A., Lindsey, D. Jr., Caldwell, D., Manning, J. and DeLoach, R.J. Effect of anaerobic cecal microflora and dietary lactose on colonization resistance of layer chicks to invasive *Salmonella enteritidis* *Avian Dis.* 35:337-343.(1991).
- 16.-Corier, E. D., Hinton, A., Kubara, L. F. Jr., Ziprin, R. L. and DeLoach, J. R.: Decreased *Salmonella* colonization in turkey poult inoculated with anaerobic cecal microflora and provided dietary lactose. *Poultry Sci.* 70:1345-1350. (1991).
- 17.-Corier, E. D., Hinton, A., Ziprin, R. L. Jr., Beier, R. C. and DeLoach, J. R.: Effect of dietary lactose on cecal pH, bacteriostatic volatile fatty acids, and *Salmonella typhimurium* colonization of broiler chicks. *Avian Dis.* 34:617-625. (1990).
- 18.-Corier, E. D., Hinton, A., Ziprin, R. L. Jr., Beier, R. C. and DeLoach, J. R.: Effect of dietary lactose on *Salmonella* colonization of market-age-broiler chickens. *Avian Dis.* 34:668-676.(1990)
- 19.-Corier, E. D., Nisbet, J. D., Hollister, G. A., Beier, C. R., Scalan, M. C., Hargis, M. B. and DeLoach, R. J.: Resistance against *Salmonella enteritidis* cecal colonization in Leghorn chicks by Vent Lip Application of cecal bacteria culture. *Poul. Sci.* 73:648-652. (1994).
- 20.-Corier, E. D., Nisbet, J. D., Hollister, G. A., Scalan, M. C., Hargis, M.B., DeLoach, R.J.: Development of defined cultures of indigenous cecal bacteria to control *Salmonellosis* in broiler chicks. *Poul. Sci.* 72:1164-1168.(1993).
- 21.-Corier, E. D., Nisbet, J. D., Scalan, M. C., Hollister, G. A. and DeLoach, R. J.: Control of *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chicks with a continuous-flow characterized mixed culture of cecal bacteria. *Poul. Sci.* 74:916-924. (1995).

- 22.-Conway, P. I., Corbach, S. L. and Goldin, B. R.: Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.* **70**:1-12. (1987).
- 23.-Cox, N. A., Bailey, J. S., Blankenship, L. C. and Gildersleeve, R. P.: In ovo administration of a competitive exclusion culture treatment to broiler embryos. *Poultry Sci.* **71**:1781-1784. (1992).
- 24.-Cox, N.A., Bailey, J. S., Blankenship, L. C., Meinersmann, R. J., Stern, R. J. and McHan, F.: Fifty percent colonization dose for *Salmonella typhimurium* administered orally and intracocally to young broiler chicks. *Poultry Sci.* **69**:1809-1812. (1990).
- 25.-Dahira, R. S., Spock, M. I.: Hydrogen Peroxid formation by *Lactobacilli* and its effect on *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.* **51**:1562. (1986).
- 26.-Dilworth, B. C. and Day, E. J.: *Lactobacillus* cultures in brooder diets. *Poultry Sci.* **57**:1101 (1978).
- 27.-Dubrovsz, W. J., Black, B. L. and Cass, I. A.: Delivery of viable *Lactobacillus reuteri* to the gastrointestinal tract of poultry. *Poultry Sci.* **70**(Suppl. 1):158. (Abstr) 1991.
- 28.-Eilers, F. W. and Parkhurst, C. R.: *Lactobacillus reuteri* and why reduce *Salmonella* colonization in the oca of turkey poult. *Poultry Sci.* **70**(Suppl. 1):158. (Abstr) 1991.
- 29.-Ewing, H. W.: Identification of enterobacteriaceae, 4th. Ed. Elsevier, U. S. A. pp 252 (1986).
- 30.-Fox, M. S.: Probiotics: Intestinal inoculants for production animals. *Veterinary Medicine / August* (1988).
- 31.-Froter, R.: Experimental enteric *Shigella* and *Vibrio* infections in mice and guinea pigs. *J. Exp. Med.* **104**:411-417. (1956).
- 32.-Froter, R.: In vivo and in vitro antagonism of intestinal bacteria against *Shigella flexneri*. II. The inhibitory mechanism. *J. Infect. Dis.* **110**:38-46. (1962).
- 33.-Froter, R., Stauffer E., Cleven, D., Holdeman L. V. and Moore, W. F. C.: Continuous-flow cultures as in vitro models of the ecology of large intestinal flora. *Infect. Immun.* **39**:666-675. (1983).
- 34.-Freeman, A. B.: Microbiología de Buitos. 22a. ed. Ed. Interamericana - McGrawHill (1989).
- 35.-Fuller, R.: Ecological studies on the *Lactobacillus* flora associated with the crop epithelium of the fowl. *J. Appl. Bacteriol.* **36**:131-139 (1973).
- 36.-Fuller, R.: Epithelial attachment and other factors controlling the colonization of the intestine of the gnotobiotic chicken by *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.* **46**:335-342. (1978).
- 37.-Fuller, R.: Nature of the determinat responsible for the adhesion of *Lactobacilli* to chicken crop epithelial cells. *J. General Microbiol.* **87**:245-250. (1975).

- 38.-Gillingham, S.: Algunos aspectos del control de *Salmonella enteritidis*. Memorias XVII Convención Anual de Especialistas en Ciencias Avícolas. Puerto Vallarta, Jal., México, 83-94. (1992).
- 39.-Godoy, V. O.: Patogenicidad de una cepa de *Salmonella gallinarum* en pollos de engorda de 1 día de edad, en una infección experimental. Tesis de Lic. Fac. Med. Vet. Zoot. U. N. A. M. (1994).
- 40.-Goepfert, J. M. Hicks, R.: Effect of Volatile fatty acids on *Salmonella typhimurium* J. Bacteriol. 97:956-958. (1969).
- 41.-Goren, E., De Jong, A. W. Dorethal, P., Bolder, Mulder, A. W. R. and Jansen, A.: Reduction of *Salmonella* infection of broilers by spray application of intestinal microflora: a longitudinal study. Vet. Q. 10:249-255. (1988).
- 42.-Goren, E., De Jong, A. W. Dorethal, P., Koopman, J. P. and Kernis, H. M.: Protection of chicks against *Salmonella infantis* infection induced by strictly anaerobically cultured intestinal microflora. Vet. Q. 6:22-26. (1984).
- 43.-Gutz, V. et al.: Prophylaxis against ampicillin associated diarrhea with a *Lactobacillus* preparation. Am. J. Hosp. Pharm. 36:754-757. (1979).
- 44.-Guerrero, R. M., y Hoyos, G.: Biotecnología aplicada en las aves. IV Jornada Médico Avícola. pp. 99-103 (1993).
- 45.-Hamdan, I. Y., Milosajcik, E. M.: Growth, viability and antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus* J. Dairy Sci. 56:638. (1973).
- 46.-Hartlin, G.: The Competitive Exclusion. Science. Vol. 31. (1960)
- 47.-Hentges, D. J.: Role of the intestinal microflora in host defense against infection. In human Intestinal Microflora in Health and Disease ed. Hentges, D. J. Ch. 14, pp. 311-331. New York: Academic Press. (1983).
- 48.-Hollister, A. G., Corrier, D. E., Nisbet, D. J. and DeLoach, J. R.: Effect of cecal cultures encapsulated in alginate beads or lyophilized in skim milk and dietary lactose on *Salmonella* colonization in broiler chicks. Poultry Sci. 73:99-105. (1994).
- 49.-Hinton, Jr., Corrier, E. D., Spates, E. G., Ziprin, R. L., Blair, R. S. and DeLoach, J. R.: Biological control of *Salmonella typhimurium* in young chickens. Avian Dis. 34:626-633. (1990).
- 50.-Impery, C. S., Mead, G. C. and George, S. M.: Competitive exclusion of *salmonellae* from the chick caecum using a defined mixture of bacterial isolates from the caecal microflora of an adult bird. J. Hyg. 89:479-490. (1982).

- 51.-Impery, C. S., Mead, G. C., George, S. M.: Evaluation of treatment with defined and undefined mixtures of gut microorganisms for preventing *Salmonella* colonization in chicks and turkey poults. Food Microbiol. 1:143-147.(1984)
- 52.-Impery, C. S., Mead, G. C. and Hinton, M.: Influence of continuous challenge via the food on competitive exclusion of salmonellas from broiler chicks. J. Appl. Bacteriol. 63:139-146. (1987).
- 53.-Itoh, K. and Freter R.: Control of *Escherichia coli* populations by a combination of endogenous *Clostridia* and *Lactobacilli* in antibiotic mice and continuous-flow cultures. Infect. Immun. 57:579-566. (1989).
- 54.-Jawetz, E., Melnick, J. L. y Adalberg, E. A.: Microbiología Médica. 11a. ed. Ed. El manual moderno (1985).
- 55.-Jones, F. T.: Effect of primilac on *Salmonella* counts from experimentally inoculated processed broilers. Poultry Sci. 71(Suppl.1):171. (Abstr.) 1992.
- 56.-Kodama, R.: Studies on Lactic acid bacteria. II. Lactolin. A new antibiotic substance produced by lactic acid bacteria. J. Antibiot. 5:72. (1952).
- 57.-Kotarov, A.: Fowl typhoid in baby chicks. Vet. Rec., 12:1455-1457. (1932).
- 58.-Koneman, W. E., Allen, D. S., Dowell, R. V. and Sommers, M. H.: Diagnóstico Microbiológico, Ed. Médica Paramericana, México. pp 166 (1989).
- 59.-Lloyd, A. B., Cumming, B. R. and Kent, D. R.: Competitive exclusion as exemplified by *Salmonella typhimurium*. Pages 185-186 in: Proceedings of the Australian Poultry Science Convention, Hobart, Australia. (1974).
- 60.-Lloyd, A. B., Cumming, B. R. and Kent, D. R.: Prevention of *Salmonella typhimurium* infection in poultry by pretreatment of chickens and poults with intestinal extracts. Aust. Vet. J. 53:82-87. (1977).
- 61.-Manning, J. G.: The influence of selected antimicrobials and antioocidials on *Salmonella enteritidis* susceptibility in Leghorn-chicks. M. S. Thesis. Texas A & M University, C. S., Tx, U. S. A. (1991).
- 62.-Mead, G. C. and Impery, C. S.: Control of *Salmonella* colonization in poultry flocks by defined gut flora treatment. Proc. International Symposium on Salmonella. New Orleans. La. pp. 72-79. (1984).
- 63.-Mead, G. C. and Impery, C. S.: Present status of the Nurmi concept for reducing carriage of food poisoning *Salmonellas* and other pathogens in live poultry. In: Elimination of pathogenic organisms from meat and poultry. F. J. M. Smulders, ed. Elsevier Applied Science Publishers. Amsterdam, The Netherlands. pp.57-77. (1987).

- 64.-Meynell, G. G.: Antibacterial mechanisms of the mouse gut. II. The role of pH and volatile fatty acids in the normal gut. *Br. J. Exp. Pathol.* 44:209-211. (1963).
- 65.-Mikolajcik, E. M., Hamdan, I. Y.: *Lactobacillus acidophilus*. II. Antimicrobial agents. *Cultured Dairy Products J.* 10:18. (1975).
- 66.-Miles, R. D., Ansa, H. S., Harms, R. H., Carlson, C. W., Reid, R. L. and Crawford, J. S.: Effects of a living non-freeze dried *Lactobacillus acidophilus* culture on performance, egg quality and gut microflora in commercial layers. *Poultry Sci.* 60:993-1004. (1981).
- 67.-Mitchell, D. F.: Incidence and control of poultry diseases in Central and South America, *Preventive Vet. Med.*, 2:269-276 (1984).
- 68.-Nisbet, J. D., Corrier, E.D. and DeLoach, R. J.: Effect of mixed cecal microflora maintained in continuous culture, and dietary lactose on *Salmonella typhimurium* colonization of broiler chicks. *Avian Dis.* 37:528-535. (1993).
- 69.-Nisbet, J. D. Corrier, E. D., Scales, M. C., Hollister, G. A., Beier, C.R. and DeLoach, R.J.: Effect of a defined continuous-flow derived bacterial culture and dietary lactose on *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chickens. *Avian Dis.* 37:1017-1025. (1993).
- 70.-Nurmi, E. and Rantala, M.: New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature* 241:210-211. (1973).
- 71.-Padrón, N. M.: Control de tifoidea aviar en aves reproductoras pesadas. *Avicultura Profesional* 5:7-10. (1987).
- 72.-Padrón, N. M.: Generalidades sobre Pulverosis y Tifoidea Aviar. VII Congreso sobre control y erradicación de la Tifoidea Aviar. Monterrey, N. L., México. pp. 13-21 (1987).
- 73.-Padrón, N. M.: Infecciones paratífoides en el pollo de engorda. *Avicultura Profesional*, 6:123-130. (1989).
- 74.-Pivnick, H.B., Blanchfield, E. and Ducout: Prevention of *Salmonella* infection in chicks by treatment with fecal culture from mature chickens (Nurmi cultures). *J. Food Prod.* 44:909-913. (1981).
- 75.-Pivnick, H. and Nurmi, E.: The Nurmi concept and its role in the control of *salmonellae* in poultry, Pages 41-70 in: Developments in food microbiology I. R. Davies, ed. Applied Science Publishers, Ltd., Essex, England. (1982).
- 76.-Pjescak, M.: On biological effects of lactose in layers. *Act. Zootech.* 21:122-130. (1970).

- 64.-Meynell, G. G.: Antibacterial mechanisms of the mouse gut. II. The role of pH and volatile fatty acids in the normal gut. *Br. J. Exp. Pathol.* 44:209-211. (1963).
- 65.-Mikolajcik, E. M., Handan, I. Y.: *Lactobacillus acidophilus*. II. Antimicrobial agents. *Cultured Dairy Products J.* 10:18. (1975).
- 66.-Miles, R. D., Arafa, H. S., Harms, R. H., Carlson, C. W., Reid, B. L. and Crawford, J. S.: Effects of a living non-freeze dried *Lactobacillus acidophilus* culture on performance, egg, quality and gut microflora in commercial layers. *Poultry Sci.* 60:993-1004. (1981).
- 67.-Mitchell, D. F.: Incidence and control of poultry diseases in Central and South America, *Preventive Vet. Med.*, 2:269-276 (1984).
- 68.-Nisbet, J. D., Corrier, E.D. and DeLoach, R. J.: Effect of mixed cecal microflora maintained in continuous culture, and dietary lactose on *Salmonella typhimurium* colonization of broiler chicks. *Avian Dis.* 37:528-535. (1993).
- 69.-Nisbet, J. D. Corrier, E. D., Sclater, M. C., Hollister, G. A., Beier, C.R. and DeLoach, R.J.: Effect of a defined continuous-flow derived bacterial culture and dietary lactose on *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chickens. *Avian Dis.* 37:1017-1025. (1993).
- 70.-Nurmi, E. and Rantala, M.: New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature* 241:210-211. (1973).
- 71.-Padrón, N. M.: Control de tifoidea aviar en aves reproductoras pesadas. *Avicultura Profesional* 5:7-10. (1987).
- 72.-Padrón, N. M.: Generalidades sobre Pulverosis y Tifoidea Aviar. VII Congreso sobre control y erradicación de la Tifoidea Aviar. Monterrey, N. L., México. pp. 13-21 (1987).
- 73.-Padrón, N. M.: Infecciones parasitofólicas en el pollo de engorda. *Avicultura Profesional*, 6:123-130. (1989).
- 74.-Ivnick, H.B., Blanchfield, E. and Ducout.: Prevention of *Salmonella* infection in chicks by treatment with fecal culture from mature chickens (Nurmi cultures). *J. Food Prod.* 44:909-913. (1981).
- 75.-Ivnick, H. and Nurmi, E.: The Nurmi concept and its role in the control of *salmonellae* in poultry, Pages 41-70 in: Developments in food microbiology I. R. Davies, ed. Applied Science Publishers, Ltd., Essex, England. (1982).
- 76.-Hjecak, M.: On biological effects of lactose in layers. *Act. Zootech.* 21:122-130. (1970).

- 77.-Pomeroy, B. S. and Nagaraja, K. V.: Fowl typhoid. In: Diseases of poultry. Edit. by Calnek, B. W., Barnes, H. J., Fard, C. W., Raid, W. M., and Yoder, H. W. 9th Ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. 87-98. (1991).
- 78.-Price, R. J., Lee, J. S.: Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing *Lactobacilli*. *J. Milk Food Tech.* 33:13 (1970).
- 79.-Que, J. V., Casey, W. S. and Hentges, J. D.: Factors responsible for increased susceptibility of mice to intestinal colonization after treatment with streptomycin. *Infect. Immun.* 53:116-123. (1986).
- 80.-Ramírez, J. H.: Repercusiones económicas de la Tifoida Aviar en reproductoras pesadas. VII Congreso sobre control y erradicación de la Tifoida Aviar. Monterrey, N. L., México.
- 81.-Reid, C. R. and Barnum, D. A.: Evaluation of turkey cecal microflora in protecting day-old poults from *Salmonella typhimurium* challenge. *Avian Dis.* 27:632-643. (1983)
- 82.- Reid, C. R. and Barnum, D. A.: The effects of treatments of cecal contents on their protective properties against *Salmonella* in poults. *Avian Dis.* 29:1-11. (1984).
- 83.-Sandline, W. F. et al: Lactic acid Bacteria in Food and Health. a review with special reference to enteropathogenic *Escherichia coli* as well as certain enteric diseases and treatment with antibiotics and *Lactobacilli*. *J. Milk Food Tech.* 35:691. (1972).
- 84.-Schneitz, C.: Research note: Automated droplet application of a competitive exclusion preparation. *Poultry Sci.* 71:2125-2128. (1992).
- 85.-Schneitz, C., Weirack, O. M. and Smycer, C. F.: Protective chicks and poults from *salmonellae* by oral administration of "normal" gut microflora. *Avian Dis.* 22:273-287. (1978).
- 86.-Seura, E. and Nummi, E.: Therapeutical trials with antimicrobial agents and cultured cecal microflora in *Salmonella infantis* infection in chickens. *Poultry Sci.* 58:1171-1174. (1979).
- 87.-Seura, E., Nagaraja, K. V., Pomeroy, B. S.: Gentamicin and bacterial culture (Nurmi culture) treatments either alone or in combination against experimental *Salmonella hadar* infection in turkey poults. *Avian Dis.* 29:617-629. (1985).
- 88.-Smith, H. W.: The development of the flora of the alimentary tract in young animals. *J. Pathol. Bacteriol.* 90:495. (1965).

- 89.-Snocenybos, G. H., Weirack, M. O. and Smyser C. F.: Further studies on competitive exclusion for controlling *Salmonella* in chickens. *Avian Dis.* 24:904-914. (1979).
- 90.-Snocenybos, G. H., Weirack, M. O. and Smyser C. F.: Protecting chicks and poults from *Salmonella* by oral administration of normal gut microflora. *Avian Dis.* 22:273-287. (1978).
- 91.-Soojaji, A. S., Rufner, R., Snocenybos, G. H. and Weirack, O. M.: Adherence of *Salmonella* and native gut microflora to the gastrointestinal mucosa of chicks. *Avian Dis.* 26:576-584. (1982).
- 92.-Sorvari, R., Naukkarinen, A. and Sorvari, T. E.: Anal sucking-like movements in the chicken and chick embryo followed by the transportation of environmental material to the bursa of Fabricius, caeca and caecal tonils. *Poultry Sci.* 56:1426-1429. (1977).
- 93.-Stavric, S.: Microbial colonization control of chicken intestine using defined cultures. *Food Technol.* 41:93-98. (1987).
- 94.-Stavric, S., Gleason, T. M. and Blanchfield, B.: Efficacy of undefined and defined bacterial treatment in competitive exclusion of *Salmonella* from chicks, Pages 323-330 in: Colonization control of human bacterial enteropathogens in poultry. I. C.Blankenship, ed Academic Press, Inc., San Diego, CA. (1991)
- 95.-Stavric, S., Gleason, T. M., Buchanan, B. and Blanchfield, B.: Experience on the use of probiotics for *Salmonella* control in poultry. *Let. Appl. Microbiol.* 14:69-71. (1992)
- 96.-United State Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service. National Poultry Improvement Plan and Auxiliare Provisions. Veterinary Services, Publications A. P. H. I. S. 91-40. U. S. Government Printing Office. (1989).
- 97.-Ushijima, T. and Seta, A.: Select fecal bacteria and nutrients essential for antagonism of *Salmonella typhimurium* in anaerobic continuous-flow cultures. *J. Med. Microbiol.* 35:111-117. (1991).
- 98.-Vakil, J. R., Shahani, K. M.: Partial purification of antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus*. *Bacteriol. Proc.* 9:9. (1965).
- 99.-Vincent, J. G. et al: Anti-bacterial activity associated with *Lactobacilli acidophilus*. *J. Bacteriol.* 78:477-484. (1959).
- 100.-Whitchill, A. R. et al.: Stimulatory effect of Aureomycin on the growth of chicks. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 74:11-13. (1950).
- 101.-Weirack, O. M., Snocenybos, G. H., Smyser, C. F. and Soojaji, A. S.: Reciprocal competitive exclusion of *Salmonella* and *Escherichia coli* by native intestinal microflora of the chicken and turkey. *Avian Dis.* 26:585-595. (1982).

- 102.-Wierup, M., Wold-Traet, M., Nurmi, E. and Hakkinen M.:Epidemiologic evaluation of *Salmonella*-controlling effect of nationwide use of a competitive exclusion culture in poultry. *Poultry Science*, 67:1026-1033. (1988).
- 103.-Wu, J.: The microbiologist's function in developing action-specific microorganisms. Biotechnology in the feed industry. *Proceedings of Alltech's third annual symposium*. (1987).
- 104-Zar, J.: Biostatistical analysis. 2nd. ed. Ed. Prentice Hall Inc. Englewood Cliffs, New Jersey, pp 348-351. (1984).
- 105.-Ziprin, R. L., Beier, R. C. and DeLoach J. R.: Effect of dietary lactose on cecal pH, bacteriostatic volatile fatty acids, and *Salmonella typhimurium* colonization of broiler chicks. *Avian Dis.* 34:617-625. (1990).
- 106-Ziprin, R. L., Corrier, R. L. and Elszak, M. H.: Maturation of resistance to Salmonellosis in newly hatched chicks: Inhibition by cicloporine. *Poul. Sci.*, 68:1637-1642. (1989).

CUADRO I

MORTALIDAD DIARIA (MD) Y ACUMULADA (MA) AL DESAFIO CON UN INOCULO 10⁷ UFC/ML. DE S.g. EN AVES PREVIAMENTE TRATADAS CON UNA MEZCLA DE CULTIVOS DETERMINADOS (CF3)

DIAS P.1*	TESTIGO NO INOCULADO		EXPERIMENTAL NO INOCULADO		TESTIGO INOCULADO		EXPERIMENTAL I. INOCULADO	
	T	E	T	E	T	E	T	E
1	0		0		0		0	
2	0		0		0		0	
3	0		0		0		0	
4	1	1	1	1	2	2	1	1
5	1	2	1	2	1	3	0	1
6	0	2	1	3	2	5	1	2
7	0	2	0	3	4	9	3	5
8	1	3	0	3	2	11	0	5
9	0	3	0	3	3	14	2	7
10	1	4	0	3	0	14	1	8
11	0	4	1	4	1	15	3	11
12	0	4	3	7	0	15	1	12
13	0	4	0	7	0	15	3	15
14	2	6	0	7	0	15	0	15
TOTAL.	6/70 (8.57%)		7/70 (10%)		15/35 (42.85%)		15/35 (42.85%)	

*P. 1. Días post-inoculación.

CUADRO 2

**AISLAMIENTO A PARTIR DE LA MORTALIDAD DIARIA DE AVES
 DESAFIADAS CON S.g. 48 HORAS DESPUES DE SER TRATADAS CON UNA
 MEZCLA DE CULTIVOS DEFINIDOS (CF3)**

	TESTIGO NO INOCULADO T	EXPERIMENTAL NO INOCULADO E	TESTIGO INOCULADO T'	EXPERIMENTAL INOCULADO E'
DIAS	(+)Sg/no.	(+)Sg/no.	(+)Sg/no.	(+)Sg/no.
P.I.	aves	aves	aves	aves
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	0	-	-
4	0/1	0	2/2	100
5	0/1	0	0/1	0
6	-	0/1	2/2	100
7	-	-	4/4	100
8	0/1	0	2/2	100
9	-	-	2/3	66.6
10	0/1	0	-	-
11	-	0/1	0	0
12	-	0/3	0	0
13	-	-	-	1/1
14	0/2	0	-	1/3
TOTAL.	0/6	0	12/15	86.66
		0/7		13/15
				80

CUADRO 3

AISLAMIENTO A PARTIR DEL SACRIFICIO DE AVES SOBREVIVIENTES AL DESAFIO CON S. g. 48 HORAS DESPUES DE HABER SIDO TRATADAS CON UNA MEZCLA DE CULTIVOS DEFINIDOS

	HIGADO / BAZO /INVASION)	TONSILAS CECALES (COLONIZACION)
T	40/64 (62.5)	45/64 (70.3)
T'	18/20 (90.0)	20/20 (100)
TOTAL	58/84 (69.0)	65/84 (77.3)
E	22/63 (34.92)*	20/63 (31.74)**
E'	18/20 (90)	20/20 (100)
TOTAL	40/83 (48.19)	40/83 (48.19)

Datos expresados en positivos de totales y porcentajes.

* P < 0.005

** P < 0.001

E Con CF3 / sin S. g.

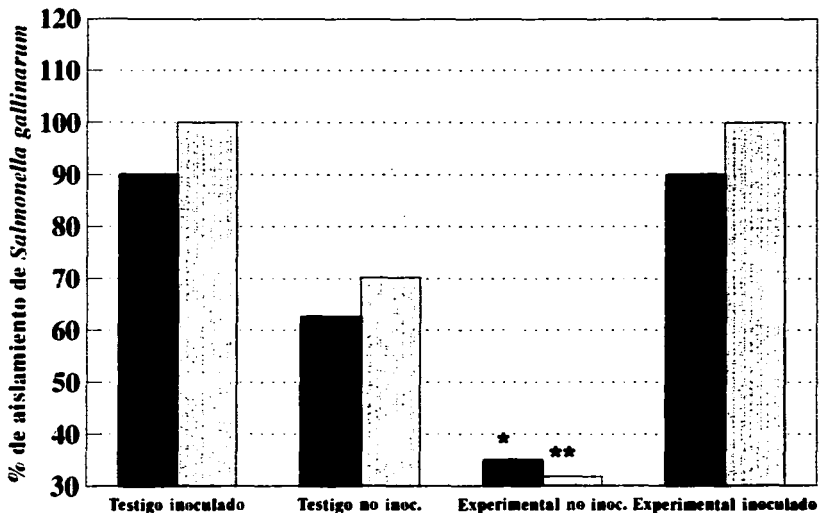
T Sin CF3 / sin S. g.

E' Con CF3 / con S. g.

T' Sin CF3 / con S. g.

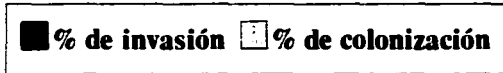
**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

FIGURA 1. AISLAMIENTO A PARTIR DE AVES SACRIFICADAS Y TRATADAS CON UNA MEZCLA DE CULTIVOS DETERMINADOS MANTENIDOS EN FLUJO CONTINUO (CF3)



* (P<0.005)

** (P<0.001)



ANEXO I

**INVESTIGACIONES REALIZADAS EN POLLO CON CULTIVO DE FLORA
INTESTINAL NORMAL**

INVESTIGADOR	AÑO	CITA	VIA DE ADMINISTRACION
Nurmi y Rantala	1973	(70)	ral
Lloyd y cols.	1974	(59)	oral
Snoeycnbos y cols.	1978	(90)	oral
	1979	(91)	oral
Seuna	1979	(86)	
Barnes y cols	1980	(5)	liofilizado en alimento
Pivnick y cols.	1981	(74)	agua
Impery y cols.	1982	(50)	agua
	1987	(52)	liofilizado en alimento
Pivnick y Nurmi	1982	(75)	agua
Mead e Impery	1984	(62)	agua
Goren y cols.	1984	(42)	rocio <i>in ovo</i> + rocio al ave en incubadora
Stavric y cols.	1987	(93)	oral
	1991	(94)	rocio en incubadora o agua
	1992	(95)	oral
Bailey y cols.	1988	(3)	oral

ANEXO I
CONTINUACION

INVESTIGADOR	AÑO	CITA	VIA DE ADMINISTRACION
Wierup y cols.	1988	(102)	agua
Schneitz y cols.	1990	(85)	agua
	1992	(84)	rocio <i>in ovo</i> + rocio al ave en incubadora
Corrier y cols.	1990	(17)	oral
	1993	(20)	oral
	1994	(19)	labio de la cloaca
Dobrogosz y cols.	1991	(27)	liofilizado en alimento
Blankenship y cols.	1991	(11)	rocio en incubadora + agua
Jones	1992	(55)	liofilizado en alimento
Cox y cols.	1992	(23)	inyección in ovo
Nisbet y cols.	1993	(68)	oral
	1993	(69)	oral
Hollister y cols.	1994	(48)	cápsulas de alginato en alimento

ANEXO 2

INVESTIGACIONES REALIZADAS CON CULTIVO DE FLORA INTestinal NORMAL DE PAVO ADULTO EN PAVIPOLLO.

INVESTIGADOR	AÑO	CITA
Lloyd y cols.	1977	(60)
Reid y Barnum	1983	(81)
	1984	(82)
Seuna y cols.	1985	(87)
Edens y Parkhurst	1991	(28)

ANEXO 3

INVESTIGACIONES REALIZADAS CON CULTIVOS DE FLORA NORMAL DE POLLO Y PAVO EN POLLITO Y PAVIPOLLO.

INVESTIGADOR	AÑO	CITA
Weinack y cols.	1982	(101)
Anderson y cols.	1984	(2)
Imperyy cols.	1984	(51)
Corrier y cols.	1991	(16)

ANEXO 4

ORGANISMOS MAS COMUNMENTE UTILIZADOS EN PROBIOTICOS COMERCIALES (30)

BACTERIAS ACIDO- LACTICAS	OTRAS
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Bacillus toyoi</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Lactobacillus caseis</i>	<i>Torulopsis spp</i>
<i>Streptococcus faecium</i>	<i>Bifucus bifidum</i>
<i>Streptococcus lactis</i>	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>Streptococcus diacetylactus</i>	

ANEXO 5

BACTERIAS PRESENTES EN UN CULTIVO BACTERIANO, CF3, AISLADAS DE LA FLORA CECAL NATIVA DE POLLOS ADULTOS Y MANTENIDOS EN FLUJO CONTINUO (21)

BACTERIA	ANAEROBIO FACULTATIVO	ANAEROBIO OBLIGADO
<i>Enterococcus faecalis</i> (cepa M)	+	
<i>Enterococcus faecalis</i> (cepa N)	+	
<i>Enterococcus faecalis</i> (cepa O)	+	
<i>Enterococcus faecalis</i> (cepa X)	+	
<i>Enterococcus faecalis</i> (cepa Z)	+	
<i>Enterococcus avium</i>	+	
<i>Lactococcus lactis</i>	+	
<i>Lactococcus</i> sp.	+	
<i>Escherichia coli</i> (cepa CC-3A)	+	
<i>Escherichia coli</i> (cepa CC-3B)	+	
<i>Citrobacter freundii</i>	+	
<i>Enterobacter</i> sp.	+	
<i>Pseudomonas</i> sp.	+	
<i>Serratia liquefaciens</i>	+	
<i>Propionibacterium</i> sp. ^{1,2}		+
<i>propionibacterium</i> sp. ^{1,2}		+
<i>Propionibacterium</i> sp. ^{1,2}		+
<i>Propionibacterium</i> sp. ^{1,2}		+
<i>Eubacterium</i> sp. ¹		+
<i>Eubacterium</i> sp. ^{1,2}		+
<i>Eubacterium</i> sp. ¹		+
<i>Lactobacillus</i> sp.		+
<i>Fusobacterium</i> sp. ¹		+
<i>Veillonella</i> sp. ^{1,2}		+
<i>Bacteroides</i> sp. ¹		+

¹ Anaerobios obligados que producen ácido graso volátil: acético, propiónico o butírico.

² Anaerobios obligados que producen ácido propiónico.