



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

**EMPLEO DE EUBIÓTICOS EN DIETAS PARA POLLO DE ENGORDA Y SU EFECTO EN  
CARACTERÍSTICAS PRODUCTIVAS, SALUD INTESTINAL Y CONTEO DE ENTEROBACTERIAS  
ESPECÍFICAS.**

**TESIS**  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:  
**ARMANDO GARCÍA REYNA**

TUTOR PRINCIPAL:  
**ARTURO CORTES CUEVAS (FMVZ-UNAM)**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
**ERNESTO ÁVILA GONZÁLEZ (FMVZ-UNAM)**  
**JOSÉ ARCE MENOCA (FMVZ-UMSNH)**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., JULIO 2023



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

## **DEDICATORIAS**

*A dios, con quien me apoyo en momentos frágiles y de ambigüedad.*

*A mis padres, Angeles y Armando, mis grandes inspiradores de vida.*

*A Graciela por todos los desafíos que hemos superado juntos.*

*A Kena, que siempre me recuerda lo capaz que podemos ser.*

*A Rodrigo, de quien aprendo todos los días un sinfín de cosas.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la UNAM por brindarme la oportunidad de alcanzar esta meta personal y profesional.

Al Dr. Arturo Cortes Cuevas por su confianza, su paciencia, gracias por sus consejos para realizar este proyecto, su gran empatía y a quien agradezco de manera especial este logro.

Al Dr. Ernesto Ávila González por nutrir el proyecto con sus grandes conocimientos, siempre pendiente del proyecto, de los avances, un gran maestro en mi vida académica y profesional.

Al Dr. José Arce Menocal por las recomendaciones y la dirección que dio al proyecto, la gentileza de su persona y su paciencia.

A los miembros del jurado, Dra. María del Pilar Castañeda Serrano, Dra. Adriana Llorente Bousquets, Dra. Silvia Carrillo Domínguez y al Dr. Juan Carlos del Río García por sus comentarios y observaciones al proyecto.

Al CONACYT por otorgarme el apoyo económico para emprender este proyecto profesional.

A las empresas CTCBIO de México y DANISCO por el apoyo financiero brindado a esta investigación.

Al CEIEPAv por otorgarme las facilidades para realizar el proyecto en sus instalaciones y a todos los que participaron de una manera invaluable, en especial a los Dres. (as); Jorge Miguel Iriarte, Alma Selene Vázquez, Benjamín Fuente, Osiris Pérez, Karina García, David Ramos, Tomás Jínez.

A la Dra. Claudia C. Márquez Mota y la Dra. Mireya Juárez Ramírez por su gran contribución y asesoría en los trabajos de laboratorio, compartiendo su conocimiento y su experiencia, con gran sencillez y profesionalismo.

A la Dra. Guadalupe Nuñez, por su amistad y su apoyo profesional.

## **Empleo de eubióticos en dietas para pollo de engorda y su efecto en características productivas, salud intestinal y conteo de enterobacterias específicas.**

### **RESUMEN**

El uso de nuevos aditivos eubióticos, como los bacteriófagos, pueden reemplazar el uso de antibióticos promotores del crecimiento y mejorar la salud intestinal. Para ello se realizó un experimento, con la intención de estudiar el efecto de diferentes eubióticos sobre características productivas y de la canal, morfología e histometría intestinal, cambios histológicos como respuesta inmune y contenido de enterobacterias en íleon y ciego. Se empleó un diseño completamente al azar con cinco tratamientos con 8 repeticiones de 25 pollos cada una. Se emplearon 1000 pollos Ross 308 mixtos, de un día de edad. Las aves se alojaron en piso de cemento en una caseta convencional. Se empleó una dieta basal sorgo+soya a la cual se le adicionaron los aditivos en estudio. Los tratamientos quedaron distribuidos de la siguiente manera: T1 = Dieta basal sorgo-pasta de soya sin promotor de crecimiento; T2 = Como 1 + bacteriófagos (BF); T3 = Como 1 + antibiótico; T4 = Como 1 + probiótico; T5 = Como 1 + simbiótico. Los resultados mostraron un mejoramiento ( $P<0.05$ ) del 5% en la ganancia de peso e índice de conversión al utilizar los aditivos eubióticos, incluyendo los BF. Se observó una menor ( $P<0.05$ ) densidad intestinal al suplementar con el probiótico. La altura y el área de las vellosidades en duodeno, sitio de mayor absorción, fue mayor ( $P<0.05$ ) al utilizar los aditivos eubióticos. En el score histológico, fue mayor ( $P<0.05$ ) en duodeno, con la adición del antibiótico y los eubióticos, asociado a una respuesta de inflamación fisiológica y controlada que permitió mayor integridad intestinal. Con la expresión relativa de enterobacterias, como *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus salivarius* permitieron asociar cambios positivos en la microbiota y una mejor productividad al usar aditivos eubióticos, incluyendo los BF, con resultados comparables al del antibiótico. Finalmente, el uso de estos eubióticos puede sustituir a la bacitracina como promotores del crecimiento.

Key words: Pollo de engorda, salud intestinal, eubióticos, bacteriófagos.

## ABSTRACT

Using new additives eubiotics, as bacteriophages, it is possible to replace antibiotics growth promoters and improve gut health. For this reason, an experiment was carried out to study the effect of different eubiotics on productive characteristics, intestinal integrity, as well as the content of enterobacteria in the cecum of broiler chickens. A completely randomized design with five treatments and 8 replicates of 25 birds each was used. In total 1000 mixed broiler chickens from Ross308 strain, one day old were obtained from a commercial hatchery. The birds were housed on concrete floors in a conventional house. A sorghum+soybean meal control diet was used, to which the additives under study were added. The treatments were distributed as follows: T1 = Control diet without antibiotic or eubiotic; T2 = T1 + bacteriophages (BP); T3 = T1 + antibiotic; T4 = T1 + probiotic; T5 = T1 + symbiotic. The results obtained at 49 days of age for weight gain and feed conversion rate enhanced ( $P < 0.05$ ) with the addition of antibiotic, eubiotics, including BP. A lower ( $P < 0.05$ ) intestinal density was observed with the probiotic. The height and area of villi in duodenum was higher ( $P < 0.05$ ) when antibiotic and eubiotics were included. In the histological score, in duodenum, the antibiotic and eubiotics resulted with a higher score ( $P < 0.05$ ), associated to a physiological and controlled inflammation response that allowed improving gut integrity. With the relative expression of enterobacteria, such as *L. reuteri* and *L. salivarius*, allowed associating positive changes in the microbiome and better performance when including the eubiotics, including BP, with comparable results to the antibiotic. Finally, the use of these eubiotics may substitute Zn-Bacitracine as growth promoters.

Key words: Broiler chicken, gut health, eubiotics, bacteriophages.

## **INDICE GENERAL**

<b>RESUMEN .....</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IV</b>
<b>LISTA DE CUADROS.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
2.1. Aditivos usados en la industria del pollo de engorda.....	3
2.2. Estructura e integridad intestinal en el pollos de engorda.....	16
2.3. Funcionalidad intestinal en el pollos de engorda.....	21
2.4. Inmunidad intestinal en el pollo de engorda .....	26
2.5. Microbiota intestinal en el pollo de engorda .....	35
2.6. Interacción dieta-microbiota-sistema inmune .....	43
2.7. Uso de los aditivos eubióticos y productividad .....	44
2.8. Impacto de los eubióticos en el bienestar animal.....	46
2.9. Relación de los eubióticos con la inocuidad alimentaria .....	47
2.10. Costo-beneficio de los eubióticos.....	48
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>50</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>51</b>
4.1. Objetivo general .....	51
4.2. Objetivos específicos .....	51
<b>5. HIPÓTESIS .....</b>	<b>52</b>
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>53</b>
6.1. Área de estudio .....	53
6.2. Población de estudio y manejo .....	53
6.3. Dietas experimentales.....	53
6.4. Características productiva y de la canal.....	54
6.5. Morfología intestinal .....	55
6.6. Preparación histológica del intestino delgado .....	56
6.7. Histometría intestinal.....	56

6.8. Cambios histológicos intestinales.....	57
6.9. Cuantificación de enterobacterias específicas .....	58
6.10. Diseño experimental y análisis estadístico .....	60
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>63</b>
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>73</b>
<b>10. REFERENCIAS.....</b>	<b>74</b>
<b>11. ARTÍCULO I. Aceptado en Brazilian Journal of Poultry Science .....</b>	<b>107</b>
Abstrac.....	107
Introducción .....	107
Material y métodos.....	108
Resultados.....	111
Discusión .....	112
Conclusiones .....	114
Referencias.....	115

## LISTA DE CUADROS

## Página

<b>Cuadro 1.</b> Tipos de aditivos usados en la nutrición animal .....	3
<b>Cuadro 2.</b> División de aditivos alimenticios en categorías .....	4
<b>Cuadro 3.</b> Actividad eubiótica y no eubiótica de los aditivos alternativos a los APC. ....	15
<b>Cuadro 4.</b> Factores involucrados en la inflamación como respuesta inmune innata .....	32
<b>Cuadro 5.</b> Mecanismos de acción de probióticos y prebióticos sobre el microbioma .....	44

### Cuadros presentes en la parte experimental

<b>Cuadro 1.</b> Composición de las dietas basales para pollos de engorda de 1-49 días .....	90
<b>Cuadro 2.</b> Score ISI de cambios histológicos intestinales.....	91
<b>Cuadro 3.</b> Primers usados en el análisis de PCR en tiempo real .....	91
<b>Cuadro 4.</b> Rendimiento productivo por semana en pollos de engorda de 1 a 49 d, alimentados con dietas sorgo-soya suplementadas con eubióticos.....	92
<b>Cuadro 5.</b> Características de la canal en pollos de engorda a los 49 d, alimentados con sorgo-soya suplementadas con eubióticos.....	93
<b>Cuadro 6.</b> Amarillamiento de la piel en pollos de engorda alimentados con dietas sorgo-soya suplementadas con eubióticos.....	94
<b>Cuadro 7.</b> Amarillamiento de la piel medido en rastro de pollos de engorda alimentados con dietas sorgo-soya suplementadas con eubióticos.....	94
<b>Cuadro 8.</b> Rendimiento de hígado en pollos de engorda a los 21, 35 y 49 d, alimentados con dietas sorgo-soya suplementadas con eubióticos.....	94
<b>Cuadro 9.</b> Morfología intestinal en pollos de engorda alimentados con dietas sorgo-soya suplementadas con eubióticos .....	95
<b>Cuadro 10.</b> Histometría intestinal en pollos de engorda a los 49 de edad, alimentados con dietas sorgo-soya suplementadas con eubióticos. ....	96
<b>Cuadro 11.</b> Conteo de células caliciformes en pollos de engorda a los 49 d, alimentados con dietas sorgo-soya suplementadas con eubióticos.....	97
<b>Cuadro 12.</b> Suma total del score de cambios histológicos en el duodeno, yeyuno e íleon, de pollos tratados con eubióticos, a los 35 y 49 d de edad.....	98
<b>Cuadro 13.</b> Cambios histológicos en Duodeno de pollos tratados con eubióticos a los 49 d de edad.....	98

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Ciclos lítico y lisogénico de los fagos.....	13
<b>Figura 2.</b> Uniones paracelulares y sus componentes. ....	18
<b>Figura 3.</b> Formación de células caliciformes en el epitelio de las vellosidades intestinales. .....	19
<b>Figura 4.</b> Compartimientos que integran el GALT.....	27
<b>Figura 5.</b> Representación de la respuesta inmune innata y específica intestinal .....	29
<b>Figura 6.</b> Respuestas proinflamatoria y antiinflamatoria para alcanzar la homeostasis intestinal.....	31
<b>Figura 7.</b> Filotipos microbianos encontrados en el intestino del pollo de engorda.....	36
<b>Figura 8.</b> Distribución espacial de la composición de la microbiota por filotipos en el intestino de pollos Ross308 a los 28 d de edad .....	37

### **Figuras presentes en la parte experimental**

<b>Figura 1.</b> Densidad intestinal en pollos de engorda a los 49 d de edad alimentados con dietas sorgo-soya suplementadas con aditivos eubióticos .....	99
<b>Figura 2.</b> Área de vellosidad en duodeno, yeyuno e íleon de pollos a los 49 d alimentados con dietas sorgo-soya suplementadas con aditivos eubióticos.....	100
<b>Figura 3.</b> Suma total del score de cambios histológicos en duodeno, yeyuno e íleon de pollos alimentados con dietas sorgo-soya suplementadas con aditivos eubióticos a los 49 d de edad.....	101
<b>Figura 4</b> Efecto de los aditivos eubióticos sobre la expresión relativa de <i>E. coli</i> , <i>L. reuteri</i> y <i>B. animalis</i> en íleon de pollos alimentados con dietas sorgo-soya suplementadas con aditivos eubióticos, a los 49 d de edad.....	102
<b>Figura 5.</b> Efecto de los aditivos eubióticos sobre la expresión relativa de <i>E.coli</i> , <i>C.</i> <i>perfringens</i> y <i>L. salivarius</i> en ciegos de pollos alimentados con dietas sorgo-soya suplementadas con aditivos eubióticos, a los 21 y 49 d de edad. ....	103
<b>Figura 6.</b> Vellosidades de pollos alimentados con dietas sorgo-soya suplementadas con eubióticos, a los 21 días de edad (H&E; x100).....	104
<b>Figura 7.</b> Vellosidades de pollos alimentados con dietas sorgo-soya suplementadas con eubióticos, a los 49 días de edad (H&E; x100).....	105
<b>Figura 8.</b> Fotomicrografía de secciones histológicas de duodeno (x400) .....	106

## ABREVIATURAS

<b>AGCC</b>	Ácidos Grasos de Cadena Corta
<b>APC</b>	Antibiótico promotor del crecimiento
<b>ARG</b>	Genes de resistencia a antibióticos, del inglés <i>Antibiotic Resistance Genes</i>
<b>BF</b>	Bacteriófagos
<b>CPA</b>	Células presentadoras de antígenos
<b>CLDN</b>	Claudina
<b>IC</b>	Índice de conversión
<b>IEC</b>	Células epiteliales intestinales, del inglés <i>Intestinal epithelial Cells</i>
<b>ITF</b>	Intestinal trefoil factor
<b>IgAs</b>	Inmunoglobulina IgA secretora intestinal
<b>GALT</b>	Tejido linfoide asociado al intestino, del inglés <i>Gut associated lymphoid tissue</i>
<b>GDP</b>	Ganancia diaria de peso
<b>GP</b>	Ganancia de peso
<b>IEL</b>	Linfocitos intraepiteliales
<b>LPL</b>	Linfocitos de la lámina propia
<b>OC</b>	Ocludina
<b>PAMP</b>	Patrón molecular asociado al patógeno, del inglés <i>Pathogen associated molecular patterns</i>
<b>PRR</b>	Receptor de reconocimiento de patrones, del inglés <i>Pattern recognition receptors</i>
<b>TJ</b>	Uniones estrechas del epitelio intestinal, del inglés <i>Tight junction</i>
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	Factor alfa de crecimiento tumoral, del inglés <i>Tumoral Growth Factor</i>
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>UFP</b>	Unidades formadoras de placas
<b>ZO</b>	Zónula ocludens

## I. INTRODUCCIÓN

El uso de aditivos como alternativas a los antibióticos promotores del crecimiento (APC) ha ganado auge a nivel global, y con la prohibición de estos antibióticos en la formulación de alimento para aves, desde el año 2006 en países integrados al proyecto de Vigilancia Europea del Consumo de Antimicrobianos Veterinarios (ESVAC, por sus siglas en inglés) y a partir del 2017 con ciertas regulaciones en E.E.U.U. (Mehdi *et al.*, 2018; Rahman *et al.*, 2022), la producción animal se ha enfocado en el control de enfermedades, para disminuir los efectos negativos provocados por el manejo irracional de los antibióticos en las últimas décadas, como la resistencia bacteriana a los antibióticos, los residuos de antibióticos que terminan en productos avícolas de consumo humano y demás residuos que las aves excretan como metabolitos tóxicos al medio ambiente (Roberts *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2017; Mehdi *et al.*, 2018; Rafiq *et al.*, 2022; Kalia *et al.*, 2022). Estos aditivos, clasificados por algunos investigadores como promotores “naturales” del crecimiento (Caly *et al.*, 2015; Sethiya, 2016), tienen un efecto benéfico sobre la salud intestinal, destacando entre ellos; 1) probióticos, 2) prebióticos, 3) fitobióticos, 4) ácidos orgánicos y 5) enzimas (Parisien *et al.*, 2007; Mehdi *et al.*, 2018; Roberts *et al.*, 2015; Wickramasuriya *et al.*, 2022; Kalia *et al.*, 2022).

La salud intestinal está fuertemente relacionada con la productividad en las aves, lo que implica que exista simbiosis entre el huésped y su microbioma intestinal. Estos aditivos, también conocidos como eubióticos, por su efecto modulador en la microbiota intestinal, pueden rebalancear la disbiosis intestinal, inducida por agentes externos, empezando por el alimento (Yasar *et al.*, 2017). Esto es posible, mediante algunas acciones que ejercen, de manera directa o indirecta, tales como; i) inhibir la adhesión de patógenos a sitios en el epitelio intestinal; ii) estimular la producción de metabolitos antimicrobianos; iv) promover la inmunomodulación; v) influir en las actividades metabólicas y digestivas del intestino (Cisek & Binek, 2014; Kocot *et al.*, 2022; Rafiq *et al.*, 2022; Shini y Bryden, 2022; Kalia *et al.*, 2022). Aunque el costo de estos aditivos suele estar por encima del antibiótico que se reemplaza, el costo de la enfermedad es mucho mayor al costo de la prevención al establecer el uso de las alternativas de los APC (Roberts *et al.*, 2015).

Todos ellos participan en el mejoramiento de la morfología intestinal y la absorción de nutrientes, por lo que su inclusión promueve el crecimiento y el rendimiento productivo de las aves (Thacker, 2013; Roberts *et al.*, 2015). Sin embargo, pese a los efectos positivos de estos aditivos, se siguen buscando nuevas alternativas comerciales. Dentro de ellas, los bacteriófagos se han propuesto, no sólo como biocontroladores de enfermedades, sino como los nuevos probióticos, no obstante, aún hace falta más información sobre sus mecanismos de acción fisiológicos, inmunológicos y microbiológicos a nivel intestinal (Roberts *et al.*, 2015), para reconocer en ellos un efecto eubiótico, capaz de influir positivamente en la salud intestinal. Por lo anterior, se realizó el presente estudio para evaluar el efecto de adicionar un antibiótico, un probiótico, un simbiótico y un coctel de bacteriófagos en pollos de engorda alimentados con dietas sorgo-soya sobre las características productivas y de la canal, morfometría intestinal, score de cambios histológicos y el conteo de algunas enterobacterias.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. ADITIVOS USADOS EN LA INDUSTRIA DEL POLLO DE ENGORDA

#### CLASIFICACIÓN DE LOS ADITIVOS ALIMENTICIOS

Los diferentes aditivos usados en la producción animal pueden ser de diferentes tipos, y según la Comunidad Económica Europea (CEE) se pueden clasificar como sigue:

**Cuadro 1. Tipos de aditivos usados en la nutrición animal.**

1. Antibióticos	8. Vitaminas o provitaminas.
2. Sustancias antioxidantes	9. Oligoelementos.
3. Sustancias aromáticas y saborizantes.	10. Agentes ligantes, antiaglomerantes y coagulantes.
4. Coccidiotatos	11. Reguladores de la acidez.
5. Emulsionantes, estabilizantes, espesantes y gelificantes.	12. Enzimas.
6. Colorantes y pigmentantes.	13. Microorganismos.
7. Conservadores.	14. Ligantes de radionucleicos.

Tomado de Sumano y Gutiérrez, 2010

Rosen (1996) sugirió el término de “microingredientes” al referirse a “aditivos alimenticios”, clasificando los 14 grupos anteriores dentro de 4 categorías que definen cuál es su función como aditivos alimenticios y las funciones que comparten: a) Nutricionales; b) Pronutrientes; c) Acondicionadores y d) Profilácticos (Cuadro 2).

Dentro de los nutricionales se encuentran las vitaminas, minerales, aminoácidos, ácidos orgánicos y en algunos casos incluyen a las plantas enzimáticas (Rosen, 1996; Madhupriya *et al.*, 2018). Los llamados pronutrientes son aquellos que promueven la producción animal, comúnmente conocidos como aditivos zootécnicos (Rosen 1996), incluyéndose en este grupo inmunomoduladores, antimicrobianos, promotores de la salud intestinal (estimulación de enzimas digestivas, modificación de morfología

intestinal, mejoramiento de la digestibilidad) y que coadyuvan en el rendimiento productivo o la calidad de productos animales (Madhupriya *et al.*, 2018). Los acondicionadores, que puede incluir aditivos sensoriales o aditivos tecnológicos que pueden modificar las características de los alimentos (Rosen, 1996) gracias a sus propiedades pigmentantes, antioxidantes, absorbentes de micotoxinas y como reductores de gases nocivos en la avicultura (Madhupriya *et al.*, 2018). En el apartado de los profilácticos se encuentran los anticoccidianos y otros medicinales con efecto antimicrobiano (Rosen, 1996). Existen aditivos como los fitogénicos que pueden tener más de un efecto positivo y no pueden clasificarse estrictamente en uno solo de los grupos descritos (Madhupriya *et al.*, 2018) en el Cuadro 2.

**Cuadro 2. División de aditivos alimenticios en categorías.**

Grupo	Categoría			
	Nutrientes	Pronutrientes	Acondicionadores	Profilácticos
Antibióticos		+		+
Antioxidantes	+	+	+	
Saborizantes		+	+	
Coccidiostatos		+		+
Estabilizadores, gelificantes	+	+	+	
Pigmentantes	+	+	+	
Conservadores	+	+	+	
Vitaminas y análogos	+			
Elementos traza	+	+		
Promotores del crecimiento		+		
Ligantes y antiaglomerantes	+	+	+	
Reguladores de la acidez	+	+	+	+
Enzimáticos		+		
Microorganismos		+		

Tomado de Rosen, 1996

## **ANTIBIÓTICOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO Y SUS EFECTOS**

Se refiere a aquellos antibióticos que, se utilizan a dosis subterapéuticas para mejorar el crecimiento y el índice de conversión en pollos de engorda (Dhama *et al.*, 2014). Por más de 50 años, el uso de los APC ha ayudado a prevenir los efectos negativos de enfermedades bacterianas en la industria avícola. Los antibióticos están clasificados de acuerdo con su estructura química, su modo de acción y su espectro de bacterias contra las que actúa. En la industria avícola, se han utilizado APC tales como tetraciclina, bacitracina, tilosina, salinomicina, enramicina, virginiamicina, entre otros.

La promoción del crecimiento inducida en aves por diferentes antibióticos está acompañada por diferencias en el microbioma cecal, dando lugar a cambios metabólicos y fisiológicos que contribuyen a mejorar su rendimiento productivo: 1) mejoran la capacidad microbiana para usar la urea y el amoníaco como fuentes de energía; 2) aumentan la concentración de sales biliares, al inhibir microbios que portan hidrolasas de sales biliares; 3) aumentan la concentración de bilirrubina en ciego, con actividad antioxidante y antiinflamatoria; 4) promueven el metabolismo de aminoácidos y síntesis de vitaminas (biotina, piridoxina); 5) incrementan la disponibilidad de nutrientes al reducir microbios; 6) disminuyen la prevalencia de microbioma asociado con la degradación de mucina y la inflamación; 7) aumentan la absorción de nutrientes, a través de un epitelio polarizado más delgado, lo que en otro momento se describía como reducción del grosor de la pared intestinal (Applegate *et al.*, 2010 ; Yadav y Jha, 2019; Plata *et al.*, 2022; Rahman *et al.*, 2022).

Los APC también han sido de gran utilidad en la prevención de infecciones subclínicas y la reducción en el uso de nutrientes por las bacterias patógenas (Applegate *et al.*, 2010). No obstante, se sabe que microorganismos como *Salmonella* spp., *E. coli*, entre otros, han mostrado resistencia a algún antibiótico (Mehdi *et al.*, 2018). La resistencia a los antibióticos es definida como la habilidad de los microorganismos para proliferar en presencia de un antibiótico que generalmente inhibe o mata microorganismos de la misma especie. La resistencia se da por mutación o adquisición de genes portados por

elementos genéticos móviles tales como los transposones, integrones, plásmidos e inclusive fagos. Además, algunos microorganismos con esta resistencia se han detectado como residuos en los productos avícolas, tal es el caso de las tetraciclinas, los macrólidos y los aminoglucósidos (Mehdi *et al.*, 2018). Asimismo, gran cantidad de antibióticos administrados a los animales son excretados al medio ambiente vía urinaria y fecal, de tal manera, que se han encontrado residuos de antimicrobianos, como la bacitracina, salinomicina, y virginamicina en la cama de las aves, detectados en concentraciones que van de 0.07 a 66 mg/L. La biotransformación y la biodegradación de los antibióticos pueden tomar hasta 150 días y sus metabolitos pueden permanecer bioactivos y ser potencialmente más tóxicos que sus compuestos originales (Mehdi *et al.*, 2018). Esto ha promovido la bioacumulación de estos en los ecosistemas acuáticos y suelos cercanos a sitios urbanos. El ambiente acuático es considerado como un punto importante de adquisición y propagación de genes de resistencia a los antibióticos, entre las bacterias potencialmente patógenas como *Enterococcus* spp. y *E. coli*, lo cual es potencialmente transferible a las bacterias que habitan en el humano (Mehdi *et al.*, 2018).

Aunque los APC, no han promovido una adecuada homeostasis intestinal, se sabe que los antibióticos preescritos para curar infecciones en humanos también tienen efectos moduladores significantes sobre la microbiota intestinal. El tratamiento con antibiótico causa reducción de bacterias benéficas y de la alfa diversidad microbiana. Los antibióticos como moduladores de la relación simbiótica entre el huésped y la microbiota intestinal puede inducir cambios eubióticos en el ecosistema intestinal, tal es el caso de la rifaximina en humanos (Ponziani *et al.*, 2017). De ahí que dos propiedades principales de los antibióticos deben ser reconocidos: el efecto clásico contra patógenos (enfermedades infecciosas) y la modulación (positiva o negativa) de la microbiota intestinal comensal, con lo cual algunos antibióticos pudieran tal vez reclasificarse no sólo como antibióticos sino como eubióticos si son capaces de ser moduladores positivos de la microbiota del tracto gastrointestinal (Ponziani *et al.*, 2017).

## **ADITIVOS PROMOTORES DE LA SALUD INTESTINAL**

### **PROBIÓTICOS**

Son monocultivos o mezcla de cultivos de organismos vivos utilizados como aditivos, que, en cantidades adecuadas, confieren salud al huésped (Roberts *et al.*, 2015; Kocot *et al.*, 2022). La FDA (Food and Drug Administration) utiliza la frase “Productos microbianos de alimentación directa” (DFM, por sus siglas en inglés) para los probióticos utilizados en la alimentación animal (FAO, 2016). Para que un microorganismo sea llamado probiótico, debe satisfacer tres criterios estrictos: 1) estar vivos; 2) estar correctamente caracterizados según la cepa, género y especie; 3) deben ser seguros, conforme a reportes científicos (Kocot *et al.*, 2022). La selección de cepas probióticas también debe considerar los siguientes atributos: 1) no patógeno; 2) origen conocido; 3) dosis estrictamente definida; 4) tolerante a procesos industriales, como la elaboración del alimento que las incluye; 5) habilidad para crecer en medios, económicamente viables para su producción; 6) resistente al ácido gástrico y a los ácidos biliares. Al parecer ninguna cepa, por si sola, cumple con todos los criterios (Kocot *et al.*, 2022).

De acuerdo con Bajagai *et al.* (2016) y Molina (2019), los probióticos se pueden clasificar de la siguiente manera: Probióticos bacterianos y no bacterianos (*Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus* spp.); Probióticos formadores (*Bacillus* spp) y no formadores de esporas (gram negativos: *Bacteriodes* spp., *Megasphaera* spp.; gram positivos: *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Propionibacterium* spp.); Probióticos alóctonos (microbiota como levaduras) y autóctonos (microbiota indígena); Probióticos mono-especie y multiespecies. El grupo más grande entre los probióticos es el de las bacterias ácido lácticas (LAB, por sus siglas en inglés). En este grupo destacan, *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum* de acuerdo con la nueva clasificación taxonómica), *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri* de acuerdo con la nueva clasificación taxonómica), entre otras cepas.

## **SUBPRODUCTOS BIOACTIVOS**

El uso de probióticos se restringe a productos que contienen microorganismos vivos, de ahí que para definir el uso de microorganismos no viables o fracciones microbianas que afectan positivamente la salud intestinal, se describen de la siguiente manera:

**Paraprobóticos.** Es un término acuñado para indicar el uso de células probióticas inactivadas o fracciones celulares de probióticos que confieren efectos benéficos para el huésped, por lo que también son llamados probióticos inactivados (no viables) o probióticos fantasma (Danladi *et al.*, 2022).

**Postbióticos.** También llamados metabióticos se definen como la “preparación de productos o subproductos metabólicos de bacterias no viables derivados de microorganismos probióticos con actividad biológica en el huésped (Danladi *et al.*, 2022). Los postbióticos incluyen AGCC (ácidos grasos de cadena corta), ácidos teicoicos, neuropéptidos derivados de peptidoglicanos, exopolisacáridos, enzimas y fragmentos de paredes celulares. Son producidos en su mayoría como un producto de la fermentación de fibra dietaria (Kocot *et al.*, 2022).

**Péptidos antimicrobianos.** Por sus propiedades antimicrobianas, han sido aislados y caracterizados de microorganismos vivos. Representan componentes del sistema inmune innato de defensa. La mayoría de los péptidos microbianos contienen entre 30 a 60 aminoácidos y son moléculas polares con regiones hidrofóbicas. Estos péptidos pueden tener actividad contra bacterias gram positivas y gram negativas, así mismo, contra hongos y virus. Cuando estos péptidos derivan de bacterias se denominan bacteriocinas. Son muy específicos, por lo que afectan a bacterias patógenas específicas. Al ser proteínas, no se absorben como moléculas intactas, Por ende, no implican un riesgo de aparecer en la carne de las aves. Estas bacteriocinas interactúan con las membranas, permitiendo la salida de metabolitos o iones, pérdida del potencial de membrana y aumento en la permeabilidad (Thaker, 2013).

**Ácidos orgánicos.** Son agentes de conservación usados para proteger el alimento de la proliferación de bacterias y hongos. Estos ácidos son principalmente ácidos carboxílicos portando un grupo hidroxilo sobre el carbono alfa, tales como los ácidos málico, láctico y el tartárico. Los ácidos orgánicos también pueden ser ácidos monocarboxílicos tales como los ácidos acético, fórmico, butírico y propiónico. La acción antimicrobiana de los ácidos orgánicos es debido al hecho de que los ácidos no disociados pueden difundir a través de la membrana bacteriana lipofílica y alterar el sistema de reacciones enzimáticas y de transporte (Mehdi *et al.*, 2018).

**Enzimas.** La suplementación enzimática en la alimentación animal es una práctica habitual en diversas especies sobre todo no rumiantes como aves y cerdos. El objetivo principal de esta suplementación es la liberación de nutrientes permitiendo una mejora de la digestibilidad y absorción de los componentes nutricionales, como la fibra y la proteína (Thacker, 2013; Roberts *et al.*, 2015). Se incluyen en la dieta, bien sea mediante la suplementación de la actividad enzimática endógena ( $\alpha$ -amilasa, proteasa, lipasa) o la suplementación con actividades enzimáticas no existentes a nivel endógeno (xilanasa,  $\beta$ -glucanasa,  $\alpha$ -galactosidasa y fitasa) (Thacker, 2013). Dos de las enzimas carbohidrasas dominantes, la xilanasa y la  $\beta$ -glucanasa ocupan el 80% del mercado mundial (Thacker, 2013; Roberts *et al.*, 2015). Las enzimas usadas en la alimentación animal son comúnmente producidas por bacterias (ej.: *Bacillus subtilis*), hongos (ej.: *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*) o levaduras (ej.: *Saccharomyces cerevisiae*).

## **PREBIÓTICOS**

El término prebiótico fue empleado por Gibson y Roberfroid en 1995, e incluye 3 partes esenciales: un sustrato (ingredientes nutricionales, no digestibles), un efecto fisiológico benéfico y un mecanismo mediado por la microbiota (Flesh *et al.*, 2014; Kocot *et al.*, 2022). El prebiótico debe satisfacer 3 criterios: 1) no ser hidrolizado/absorbido en estómago o intestino delgado; 2) debe ser específico para beneficiar bacterias comensales en el intestino grueso; 3) la fermentación del sustrato debe inducir efectos benéficos dentro del huésped (Roberts *et al.*, 2015; Kiczorowska *et al.*, 2017).

Los prebióticos se puede clasificar en: a) Carbohidratos polisacáridos (arabinosilanos, o AX, ciclodextrinas, fructanos, lactosa,  $\beta$ -glucano); b) Carbohidratos oligosacáridos (mannano-oligosacáridos o MOS, fructo-oligosacáridos o FOS, agaro-oligosacáridos o AOS, galacto-oligosáridos o GOS) (Kiczorowska *et al.*, 2017; Kocot *et al.*, 2022). La definición actual fue extendida para incluir también sustancias no carbohidratos, tales como c) polifenoles (curcumina, quercetina, naringenina, hesperetina) y; d) ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés), como LA, DHA y EPA (Kocot *et al.*, 2022).

**Estimbióticos.** Son definidos como aditivos no digeribles pero fermentables, como los XOS (xilo-oligosacaridos fermentables). Los XOS es el sustrato preferencial de bacterias benéficas, principalmente Bifidobacterias. Además, se atribuye a los XOS la función de señalización, como guía del microbioma para utilizar más efectivamente un sustrato fermentable (xilano) existente en el tracto gastrointestinal en vez de actuar como simple sustrato para la fermentación, demostrado al ver su efecto a dosis bajas (0.1 y 1 g/kg) Ribeiro *et al.* (2018). Cho *et al.* (2020) describieron que, aunque estos estimbióticos pueden estimular la fermentación microbiana de la fibra, se apoya la hipótesis de que no son propiamente prebióticos, precisamente, porque son requeridos en dosis muy bajas (0.01%), hasta 20 y 30 veces menor que los MOS o los FOS, y con mejores resultados.

## **SIMBIÓTICOS**

Los simbióticos están formados por la asociación de uno o más probióticos con uno o más prebióticos (Flesch *et al.*, 2014). En otras palabras, son definidos como “una mezcla de microorganismos vivos y sustrato selectivamente utilizado por microorganismos que confieren un efecto benéfico sobre el huésped”. Los prebióticos son complementarios y sinérgicos a los probióticos (Flesch *et al.*, 2014; Kocot *et al.*, 2022). Por ende, esta combinación favorece el crecimiento y sobrevivencia de las bacterias probióticas (Roberts *et al.*, 2015). Flesch *et al.* (2014) mencionaron que de acuerdo con regulaciones técnicas las cantidades mínimas viables de un probiótico debe estar en el rango de  $10^8$  –  $10^9$  CFU en la recomendación diaria del producto listo para consumo. Lo anterior con la finalidad de alcanzar un mínimo de  $10^7$  CFU en el contenido intestinal. Para el caso

del prebiótico se ha demostrado que 4-10 g/día de FOS es el mínimo requerido para promover el crecimiento de *Bifidobacteria*.

## **FITOBÍOTICOS**

Llamados también fitogénicos o compuestos derivados de plantas. Incluyen un amplio rango de materiales de plantas, que han sido utilizados como saborizantes, conservadores, medicinales, en formas sólidas, secas, así como extractos o aceites esenciales. Por su origen, estos aditivos alimenticios tienen una variación considerable en su composición química, razón por la cual puede haber diferencias en la eficacia de los productos comerciales (Applegate *et al.*, 2010). Se utilizan sus compuestos bioactivos que son metabolitos secundarios de las plantas (PSM, por sus siglas en inglés).

**Aceites esenciales.** Estos representan una subcategoría de fitogénicos (Applegate *et al.*, 2010). Son líquidos oleosos aromáticos obtenidos de plantas y usualmente tienen la característica de olor y sabor de la planta de la que derivan. Son normalmente una mezcla de metabolitos vegetales secundarios y pueden contener compuestos fenólicos (ej.: timol, carvacrol y eugenol), terpenos (ej.: extractos cítricos y de piña), alcaloides (capsaisina), lectinas, aldehídos (ej.: cinamaldehído), polipéptidos o poliacetilenos. Se estima que existan 3000 aceites esenciales conocidos. En su mayoría pueden cambiar la liposolubilidad en la superficie de las membranas externas de las bacterias, causando su ruptura o desintegración (Thacker, 2013; Sethiya, 2016).

## **BACTERIÓFAGOS COMO TERAPIA ANTIBACTERIANA**

Los bacteriófagos (BF) o fagos son las estructuras biológicas con ácidos nucleicos más abundantes sobre la tierra, incluso rebasan en número a las bacterias, existiendo a razón de  $10^{31}$  (Hernández & Castellanos, 2014). D'Herelle fue el primero en aislar y caracterizar a los BF y el también desarrolló la primer fagoterapia contra tifoidea aviar inducida por *Salmonella Gallinarum* en pollos (Wernicki *et al.*, 2017). A pesar de que se realizaron múltiples esfuerzos para generalizar su uso como agentes terapéuticos en las décadas de 1920 y 1930 fueron cayendo en el olvido por la ciencia de la época, debido al

descubrimiento de los antibióticos, también por falta de conocimiento de los BF y diversos errores en la metodología al momento de experimentar con ellos (Hernández y Castellanos, 2014). La replicación de los fagos es similar a virus de células eucariotas: adsorción, penetración e inyección del ácido nucleico, replicación de ácidos nucleicos (periodo vegetativo), formación y liberación de viriones desde la célula hospedera, esta última etapa considerada como de maduración (Wernicki *et al.*, 2017).

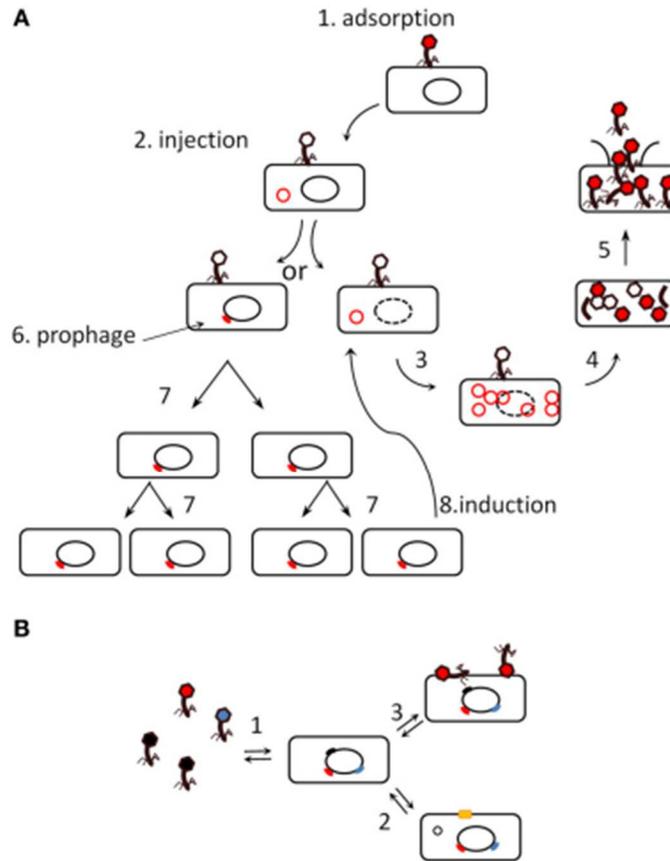
Ciclo de los bacteriófagos (De Paepe *et al.*, 2014; Wernicki *et al.*, 2017; Dominguez-Navarrete, 2020) (Figura 1):

**Lítico**            En el estado lítico o virulento, infectan bacterias, se replican y ocasionan lisis de las bacterias (fase pasiva), liberando nuevos fagos (fase activa).

**Lisogénico**    Los fagos integran su material genético en el cromosoma bacteriano (llamado en esta fase profago o temperado), se replica con él, pero no ocasiona alteraciones en la célula bacteriana ni liberación de nuevos fagos, permaneciendo inactivos (atenuado) mientras las condiciones lo permitan.

**Crónico**        Esclavizan bacterias para que las mismas secreten nuevos fagos al ambiente. Bien puede considerarse parte de la fase activa.

La presentación de los estados funcionales, lítico y lisogénico, depende de la actividad de dos genes: del represor, *cl*, que inhibe la actividad lítica, y del regulador, *cro*, que bloquea la función del gen represor (Dominguez-Navarrete, 2020). El ciclo lisogénico puede ser interrumpido por rayos solares, rayos UV, agentes alquilantes como ciertos antibióticos tales como la mitomicina C (Wernicki *et al.*, 2017). Fagos con ciclo lisogénico:  $\lambda$  *E. coli*,  $\mu$  *E. coli*, *Salmonella*, *Citrobacter* y *Erwinia*, MM1 *S. pneumoniae*; y  $\phi$ 11 *S. aureus* (Wernicki *et al.*, 2017). Además, según las condiciones ambientales y el tipo de bacteria, la infección por fagos puede ser también: infección crónica, pseudolisogénica e infección abortiva (Wernicki *et al.*, 2017).



The phage-bacterium mixture of a polylysogen strain

**Figura 1. Los ciclos lítico y lisogénico de los fagos.** 1. Adsorción a la superficie bacterina. 2. Inyección del ADN. 3. Se replica el ADN. 4. Producción y ensamblaje de proteínas de la cápside. 5. Lisis del huésped bacteriano. 6. Fagos temperados que pueden volverse líticos o lisogénicos. 7. Replicación pasiva por la maquinaria bacteriana. 8. Inducción o activación viral por estrés y otras causas. (B) Cepas bacterianas poli-lisogénicas. 1. Nivel alto de viriones; 2. Eliminación de algunos profagos y restauración del gen interrumpido por el profago con proteína de superficie; 3. Adsorción de viriones adoptándolos como factores de virulencia. Tomado de De Paepe *et al.*, 2014.

Hasta el momento existen más de 5500 BF. El 96% de los BF conocidos se clasifican como caudovirales, los cuales se dividen en tres familias: Myoviridae (cola contráctil), Siphoviridae (cola no contráctil) y Podoviridae (cola muy corta) (Kurtböke, 2012; Parisien *et al.*, 2007). Dentro de las bacterias que han sido huéspedes de estos BF se encuentran: *Campylobacter* spp. (fam. Myoviridae y Siphoviridae), *Pseudomonas* spp., *Pseudoalteromona* spp., *Bacteroides fragilis*, *Staphylococcus aureus* (Podoviridae, Siphoviridae y Myoviridae), *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*,

*Salmonella* spp., *Escherichia coli* y otras enterobacterias (Atterbury *et al.*, 2007; Segundo *et al.*, 2010; Kurtböke, 2012; Abbas *et al.*, 2022).

Respecto al uso de BF como biocontroladores de bacterias patógenas (ver cuadro 3), se han detectado retos para mejorar su eficacia en aves y otras especies productivas (Huff *et al.*, 2004; Atterbury *et al.*, 2007; Parisien *et al.*, 2007; Segundo *et al.*, 2010; Jassim y Limoges, 2014; Oliveira *et al.*, 2015; Wernicki *et al.*, 2017; Johnson *et al.*, 2017).

- Protección de los BF contra la acidez gástrica.
- Espectro de acción muy limitado, por su especificidad; especie, serotipo o cepa.
- Terapia fágica contra bacterias intracelulares.
- Liberación de endotoxinas en la lisis bacteriana.
- Farmacodinamia y farmacocinética.
- Neutralización de fagos por el sistema inmune del hospedero.
- Resistencia bacteriana a los fagos.
- Selección de bacteriófagos, individual o grupal.
- Uso de bacteriófagos para sinergizar la acción de otros productos.

**Cuadro 3. Actividad eubiótica y no eubiótica de aditivos alternativos a los APC.**

ADITIVO	ACTIVIDAD EUBIÓTICA	ACTIVIDAD NO EUBIÓTICA	Referencia
<b>Probióticos</b>	Inhibición de la disbiosis por exclusión competitiva. Producción de sustancias antimicrobianas. Inhibición de la producción de toxinas por otras bacterias. Producción de ácidos orgánicos. Promueven el crecimiento de microbiota benéfica.	Mantenimiento y protección de la barrera intestinal. Aumento de vellosidades intactas Inmunomodulación entre factores anti-inflamatorios y pro-inflamatorias. Mejoramiento de la actividad enzimática digestiva. Síntesis del comp. B y de AGCC. Disminución del estrés relacionado al manejo. Disminución de la incidencia de diarreas.	Cisek & Binek, 2014 Elhassan, et al., 2018 Kocot et al., 2022 Rafiq et al., 2022 Shini y Bryden, 2022
Ácidificantes	Acción antimicrobiana; reduce bacterias patógenos en intestino. Modulan el pH intestinal y limitan la proliferación de microbiota patogénica.	Modula secreciones pancreáticas y morfología intestinal. Inhibe procesos inflamatorios. Quelación de minerales.	Mehdi et al., 2018 Rahman et al., 2022
<b>Enzimas</b>	Incrementan la tasa de digestión, limitando la cantidad de sustrato para la microbiota. En el ciego, producen azúcares que se absorben poco, que alimenta a las bacterias benéficas.	Disminuye la viscosidad en la dieta, por consumo de PNA de los granos. Mejora el aprovechamiento de los nutrientes. Reducen la respuesta inmune inducida por alimento (FIIR) al fraccionar el tamaño de las fibras de los PNA evitando sea reconocido por algún PRR.	Roberts et al., 2015 Sethiya, 2016 Kogut, 2017 Rahman et al., 2022
<b>Prebióticos</b>	Ofrecen sitios de adherencia para bacterias patógenas, como efecto protector. Balancean o restauran la microbiota intestinal en el lumen y en el epitelio intestinal. Disminuyen el pH intestinal.	Favorece la producción de AGCC, como efecto metabólico. Estimula el crecimiento de células de absorción intestinal como efecto trófico. Modulan al sistema inmune intestinal, mejoran inmunidad a nivel GALT. Incrementan altura de las vellosidades	Dhama et al., 2014 Roberts et al., 2015 Sethiya et al., 2016 Kocot et al., 2022
Estimbióticos	Actividad prebiótica, promoviendo un microbioma más benéfico para el huésped. Estimula el incremento de bacterias fibrolíticas y productoras de butirato	Señalización de la microbiota para que desarrolle su capacidad de degradación de fibra. Modulación del sistema inmune.	Ribeiro et al., 2018 Cho et al., 2020
Fitobióticos	Estabilizan la microbiota y aumentan su resistencia. Polifenoles pueden estimular el crecimiento de microorganismos benéficos e incrementar producción de SCFA. Acción antimicrobiana (inhiben adhesión y aumentan permeabilidad de la bacterias.	Incrementan el consumo de alimento y su palatabilidad. Estimulando el crecimiento de células de absorción en el tracto intestinal. Mejoran la morfología, integridad y la función intestinal. Aumento de células calciformes. Acción antiinflamatoria (por compuestos fenólicos y no fenólicos). Producción de enzimas antioxidantes (glutatión peroxidasa, super óxido dismutasa).	Leusink et al., 2010 Kogut y Arsenault, 2016 Sethiya et al., 2016 Gheisar et al., 2017 Ahsan et al., 2018 Rahman et al., 2022
Bacteriófagos	Regulación de la población bacteriana. Actividad probiótica. Promoción de abundancia de microorganismos benéficos en ciego. Disminución de conteo de <i>Salmonella</i> spp.	Aumento en la producción de AGCC. Mejoramiento de la morfología intestinal (vellosidades). Acción antiinflamatoria. Regulación de la inmunidad local (inmunomodulación) Aumento en la expresión relativa de TJ.	Luziak- Szelachowska., 2017 Zeng et al., 2021 Sarrami et al., 2022 Pantoja-Don Juan et al., 2022 Abbas et al., 2022

## 2.2. ESTRUCTURA E INTEGRIDAD INTESTINAL DE LOS POLLOS DE ENGORDA

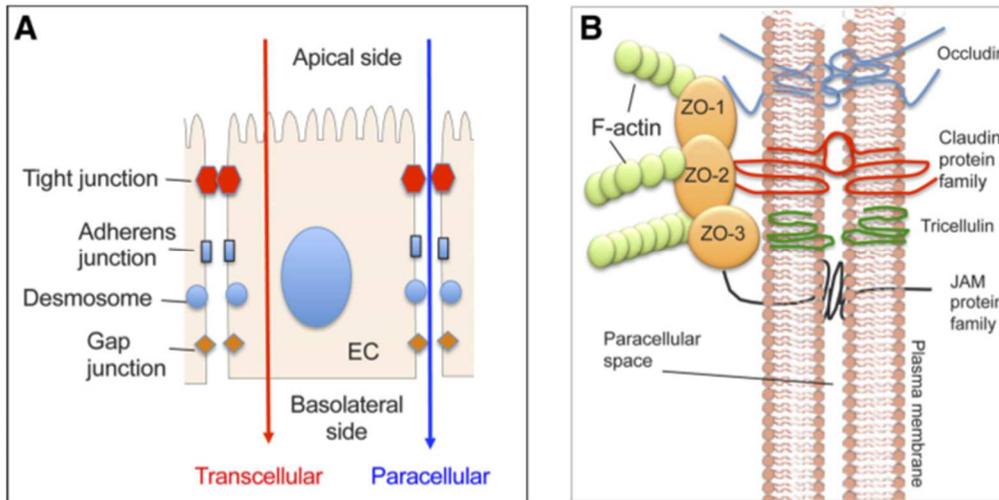
El intestino de un ave se divide en intestino delgado e intestino grueso. El intestino delgado se divide en duodeno, yeyuno e íleon. El duodeno localizado cerca del páncreas está conectado estrechamente a este por venas y arterias. Sin embargo, el yeyuno e íleon no están fijados a otros tejidos, lo que permite a estos segmentos encogerse durante el ayuno y agrandarse de nuevo cuando el alimento es consumido (Yamauchi, 2002). La barrera intestinal es caracterizada por poseer permeabilidad selectiva, lo cual significa que el agua, iones y sustancias de bajo peso molecular pueden pasar libremente, mientras que es impermeable a macromoléculas, toxinas, alérgenos alimenticios y agentes patógenos (Kocot *et al.*, 2022), considerados como componentes proinflamatorios (Sharma *et al.*, 2021).

**Capas del intestino.** El grosor intestinal en cada uno de sus segmentos está conformado por 4 capas, desde el interior hacia el exterior son: Mucosa, Submucosa, Muscular y Serosa. La mucosa intestinal presenta una monocapa de células prismáticas y la lámina propia formada de tejido conectivo laxo, le provee de soporte, nutrición y defensa. Por fuera de la mucosa hay una delgada capa de fibras musculares lisas, la *muscularis mucosae*, que marca el límite entre la mucosa y las demás estructuras de la pared intestinal. La submucosa, está formada por tejido conectivo más denso por el que transitan vasos sanguíneos arteriales que proporcionan la irrigación sanguínea a la mucosa, y por venas y vasos linfáticos que transportan al resto del organismo los nutrientes absorbidos. En la submucosa hay además numerosos nervios y ganglios del sistema nervioso autónomo. Por fuera de la submucosa hay dos capas de tejido muscular liso, la denominada circular interna, cuyas fibras musculares lisas están dispuestas en espirales apretadas en tanto que la capa longitudinal externa, cuyas espirales son muy alargadas (Brunser *et al.*, 2013).

**Tipos celulares en la mucosa intestinal.** La superficie de las vellosidades está cubierta con una capa celular de epitelio columnar simple (Yamauchi, 2002) que se continua hasta

el fondo de las criptas de Lieberkühn, donde se constituye el compartimiento germinal, de maduración y diferenciación de los enterocitos (Brunser *et al*, 2013). A partir de aquí, surgen 4 tipos de células epiteliales intestinales (IEC, por sus siglas en inglés): i) ENTEROCITOS, como células de absorción que comprenden más del 80% de las IEC; ii) CÉLULAS CALICIFORMES, encargadas de producir varias mucinas y péptidos trefoil necesarios en la reparación celular; iii) CÉLULAS ENTERO-ENDOCRINAS, las cuales exportan péptidos hormonales; iv) CÉLULAS DE PANETH, que se asientan y se diferencian en el fondo de las criptas, secretan criptidinas antimicrobianas o defensinas, enzimas digestivas y factores de crecimiento. A diferencia de las células paneth, el resto de las células migran hacia arriba para ser exfoliadas al llegar a la punta de las vellosidades 5 días después (Kim y Ho, 2010; Ensari & Marsh, 2018; Chelakkot *et al.*, 2018).

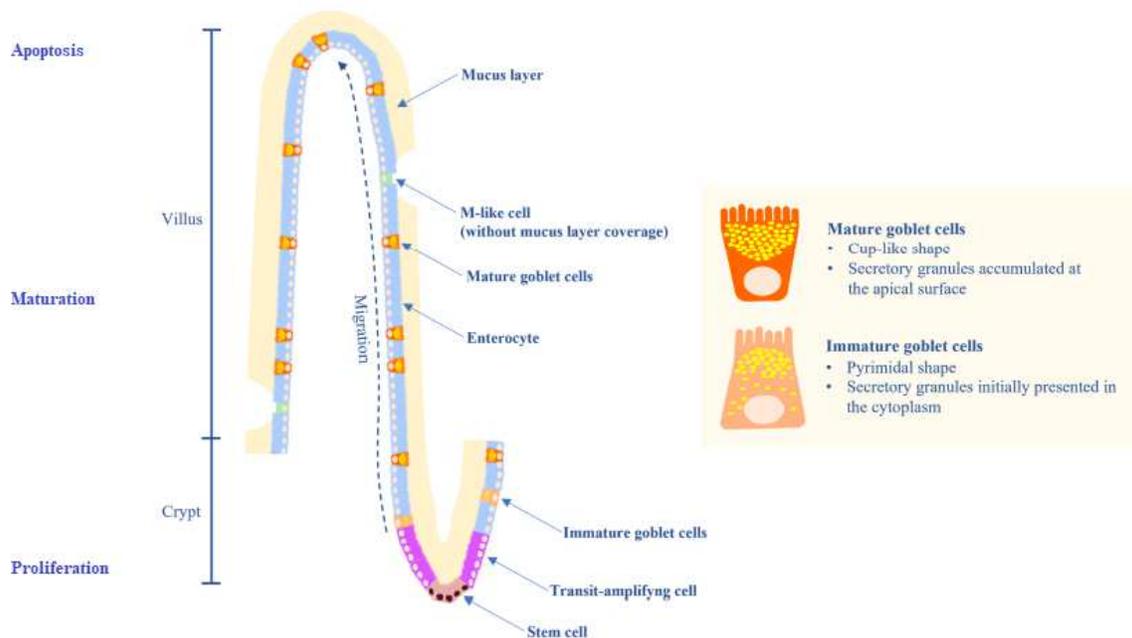
**Moléculas de adhesión intercelular.** Los enterocitos forman una monocapa cohesiva la cual actúa como una barrera permeable entre el lumen intestinal y el tejido subepitelial estéril, a manera de compuerta para la digestión, la absorción y el transporte de nutrientes (Kogut & Arsenault, 2016; Ensari & Marsh, 2018). El espacio paracelular entre los enterocitos está sellado por un complejo de unión intercelular compuesto de 3 estructuras: uniones estrechas (TJ, por sus siglas en inglés), uniones adherentes intermedias (zónula adherens) y desmosomas (macula adherens) (Alshamy *et al.*, 2018; Kocot *et al.*, 2022). Las TJ, que involucran al 48% del complejo de unión, están conformadas por proteínas transmembrana como claudinas (CLDN), ocludinas (OC) y proteínas de membrana periféricas (zónula ocludens, ZO; y proteínas regulatorias) (Kocot *et al.*, 2022). Las uniones adherentes y los desmosomas dan una sólida integridad conectiva entre las células epiteliales. También fomentan las interacciones intercelulares, pero no pueden regular la permeabilidad, a diferencia de las TJ que sí pueden. En ese sentido, las TJ ofrecen un doble papel, tanto como barrera como de poro (Panwar *et al.*, 2021). Es importante mencionar que la migración de las IEC (desde la cripta a la punta de las vellosidades), depende de las moléculas de adhesión entre las IEC, como las proteínas de TJ, OC y la ZO-1, tal como se puede observar en la Figura 2 (Jeurissen *et al.*, 2002).



**Figura 2. Uniones paracelulares y sus componentes.** A) Complejo de unión intercelular formado por uniones estrechas (TJ) en la parte apical, que permiten la difusión selectiva de fluidos, electrolitos y otras moléculas; Uniones adherentes involucradas en la adhesión celular y señalización intracelular; Desmosomas y uniones GAP, involucradas en la adhesión célula a célula y en la comunicación intracelular, respectivamente. B) Componentes de las uniones estrechas. Tomado de Wells *et al.*, 2016.

**Moco intestinal.** Las células caliciformes sintetizan glicoproteínas mucino-secretorias (MUC2) y moléculas bioactivas tales como mucinas fijas a la membrana epitelial (MUC1, MUC3, MUC17), péptidos factor trefoil, molécula  $\beta$  como resistina y proteína de fijación Fc- $\gamma$  (Kim y Ho, 2010). En humanos, la proporción de células caliciformes entre los tipos de IEC incrementa caudalmente desde el duodeno (4%) al colon distal (16%), similar al incremento en el número de organismos microbianos (Kim y Ho, 2010). Las mucinas son moléculas grandes con una estructura proteica rica en serina y treonina, las cuales están ligadas a cadenas laterales de oligosacáridos, que constituyen más del 70% del peso de la molécula. La secreción masiva de MUC2 por exocitosis es desencadenada por diferentes factores bioactivos, incluyendo agonistas colinérgicos, hormonas (neuropéptidos), microbios, productos microbianos y toxinas, citoquinas inflamatorias y especies reactivas al oxígeno y nitrógeno (Kim y Ho, 2010). La MUC2 cumple funciones de protección, lubricación, transporte y eliminación como componente de las capas de moco. Ofrece sitios de adhesión, y es fuente de nutrientes para las bacterias (Kim y Ho, 2010; Wickramasuriya *et al.*, 2022). La mucina unida a membrana y el factor trefoil apoyan en la restitución epitelial y reparación de heridas (Jeurissen *et al.*, 2002; Kim y Ho, 2010). El factor trefoil también incrementa la viscosidad del moco y la integridad

estructural de las capas de moco. Además, facilita la migración celular y bloquea la apoptosis. La molécula  $\beta$  como resistina sobre regula la expresión de MUC2 e induce la hiperplasia de las células caliciformes (Jeurissen *et al.*, 2002; Kim y Ho, 2010). La colonización por la microbiota intestinal comensal se limita a una capa de moco externa “suelta” que interactúa con los oligosacáridos de las glicoproteínas de la mucina, que le sirven de sustrato para la unión, mientras que una capa mucosa interna “firme” está en gran parte desprovista de bacterias, ya que no permite la unión y la colonización (Kim y Ho, 2010). Un grosor anormal en la capa de moco está asociado con infección entérica y pobre rendimiento productivo si es muy delgada y con deficiencia en la mezcla de enzimas digestivas si la capa de moco es muy densa tal como se aprecia en la Figura 3 (Jeurissen *et al.*, 2002; Wickramasuriya *et al.*, 2022).



**Figura 3. Formación de células caliciformes en el epitelio intestinal de las vellosidades.**

Tomado de Duangnumswang *et al.*, 2021.

## **MECANISMO DE ACCIÓN SOBRE LA INTEGRIDAD INTESTINAL**

**Como actúan los antibióticos.** Plata *et al.* (2022) aclararon que, como efecto indirecto de los APC, al actuar sobre la microbiota intestinal, y mermar el número de las bacterias patógenas, es posible disminuir la degradación del moco, con lo cual se favorece el mantenimiento de la integridad intestinal.

**Como actúan los eubióticos.** Respecto a la integridad de la barrera intestinal en yeyuno, Song *et al.* (2014) evaluaron la expresión de proteínas de las TJ, encontrando que el uso de una mezcla de probióticos (*B. subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *L. plantarum*) promovieron la expresión de OC, aunque no para la ZO-1. Además, midieron la permeabilidad de la TJ mediante resistencia eléctrica transepitelial y fluorescencia sin cambios a la suplementación con probióticos, sin embargo, demostraron que, por estrés calórico, las aves si incrementaron la permeabilidad mucosal. También se sabe que los prebióticos, simbióticos y postbióticos, promueven la regulación de expresión génica de proteínas TJ como potencial mecanismo de acción sobre la barrera intestinal (Kocot *et al.* (2022). La pérdida de integridad de la submucosa o perdida de proteínas de la TJ (CLDN, OC, ZO) pueden afectar la barrera, permitiendo la entrada de microorganismos/antígenos lumbales dentro de la submucosa y posiblemente dentro de la circulación sistémica (Chelakkot *et al.*, 2018; Wickramasuriya *et al.*, 2022; Fathima *et al.*, 2022). Wu *et al.* (2019) mostraron que al adicionar *E. faecium* en dietas para pollos con esteritis necrótica inducida, sobre reguló notablemente CLDN-1 en yeyuno en aves desafiadas y CLDN-3 en no desafiadas con *C. perfringens*, con lo que redujo la permeabilidad intestinal al fortalecer las TJ.

Por otra parte, Ahsan *et al.* (2018) al utilizar 3 niveles de inclusión de un aditivo fitogénico y Gurram *et al.* (2021) al usar inulina (derivado de achicoria) mostraron un incremento en el conteo de células caliciformes en el intestino de pollos Ross 308, lo cual se asocia con mayor producción de moco como componente esencial de la barrera intestinal. No obstante, en otro estudio reciente, con fitobióticos, no se observaron diferencias con el grupo control, en el conteo de células caliciformes (Al-Garadi *et al.*, 2022). El incremento

en la producción de moco, también pueden ocurrir en situaciones de estrés acompañado de la presencia de *C. perfringens* (Zaytoff *et al.*, 2020).

**Como actúan los bacteriófagos.** Aún se investigan los mecanismos de acción por los cuales, los bacteriófagos mantienen la integridad intestinal, así como los probióticos promueven la producción de moco, inhiben la translocación bacteriana y fortalecen las TJ (Shini y Bryden, 2022). En este tema Zeng *et al.* (2021) describieron que el uso de bacteriófagos (400 mg/kg de alimento), aumentó la expresión relativa de proteínas de las TJ (ZO-1, OC y CLDN-1) y con ello la integridad de la barrera epitelial.

### 2.3. FUNCIONALIDAD INTESTINAL EN LOS POLLOS DE ENGORDA

Se dice que la función intestinal puede ser determinada midiendo: 1) la altura de las vellosidades, el área de vellosidad y la mitosis celular usando un microscopio óptico; 2) morfología de la superficie de la vellosidad usando un microscopio electrónico de barrido y 3) mediante la ultraestructura de las células epiteliales usando un microscopio electrónico de transmisión (Yamauchi, 2002). En ese sentido, la funcionalidad está involucrada en la degradación alimenticia y la absorción intestinal. Factores fisicoquímicos como la viscosidad y el pH intestinal pueden alterarla, al mismo tiempo que afectan la actividad microbiana en el tracto gastrointestinal (Jeurissen *et al.*, 2002).

**Vellosidades.** El tracto intestinal en las aves es relativamente más corto que el de los mamíferos, y, por tanto, poseen menor tiempo de retención del alimento y menor capacidad digestiva que los mamíferos (Wickramasuriya *et al.*, 2022). No obstante, las aves poseen un área de vellosidad mayor, que brinda mayor superficie de mucosa, que permite aumentar el área de digestión y absorción (Yamauchi, 2002; Lavin *et al.*, 2008; Wickramasuriya *et al.*, 2022). Así mismo esta superficie de absorción se incrementa por 10 a 20 veces, gracias al borde apical en cepillo de los enterocitos en las vellosidades (Ensari y Marsh, 2018). En duodeno y yeyuno, la altura de las vellosidades puede representar el 80% del grosor de la mucosa y a medida que se avanza hacia el íleon, su

altura decrece y con ello, la absorción intestinal (Alshamy *et al.*, 2018; Tang *et al.*, 2020). Según Yamauchi (2002), durante el ayuno y la realimentación, el cambio en la altura de las vellosidades intestinales es un poderoso discriminador para juzgar la función del duodeno, pero un discriminador insatisfactorio para el yeyuno y el íleon.

**Densidad intestinal.** Después de la primera semana de edad, existe un crecimiento alométrico positivo del intestino, de las vellosidades intestinales y de la densidad intestinal, lo que puede variar entre estirpes. Además, se ha visto que esta densidad (g/cm) al ser evaluada por segmento intestinal, es mayor en duodeno, y desciende gradual y aboralmente para ser menor hacia el colrecto (Alshamy *et al.*, 2018). Esto, compensado con la altura de las vellosidades que va en aumento con la edad, las aves pueden absorber los nutrientes conforme sus demandas también aumentan al incrementar su masa corporal, sin embargo, su capacidad digestiva intestinal, depende más del área de superficie de vellosidades que de la longitud y masa intestinal (Alshamy *et al.*, 2018).

**Viscosidad y pH intestinal.** La viscosidad se considera un biomarcador de la salud intestinal en las aves. Su presencia limita la mezcla de nutrientes con enzimas pancreáticas y ácidos biliares, además disminuye el movimiento de nutrientes del lumen hacia la mucosa, lo que afecta la digestión y absorción de nutrientes (Jeurissen *et al.*, 2002; Roberts *et al.*, 2015; Shini y Bryden, 2022). Si la viscoelasticidad del moco es baja provee una más alta permeabilidad para la difusión de moléculas (Duannumsawang *et al.*, 2021). El pH intestinal de los pollos va cambiando a lo largo del tubo intestinal, disminuyendo cuando alcanza el proventrículo y la molleja, después progresivamente se hace menos ácido a lo largo del intestino delgado (Jeurissen *et al.*, 2002): buche (5.5), proventrículo (2.5-3.5), molleja (2.5-3.5), duodeno (5-6), yeyuno (6.5-7), íleon (7-7.5), ciego (6.9), cloaca (8) (Shini y Bryden, 2022). El pH es un importante parámetro fisicoquímico de la digesta que puede afectar la actividad microbiana (Shini y Bryden, 2022). Además, si el pH del moco es más alto, incrementa la interacción electrostática entre mucinas, lo cual mejora la permeabilidad selectiva de partículas cargadas. Si el pH

del moco es bajo, puede aumentar la viscoelasticidad del mismo (Duannumsawang *et al.*, 2021).

**Borde en cepillo.** Las microvellosidades junto sus enzimas y proteínas de transporte representan la diferenciación funcional más importante dentro de las vellosidades (Ensari & Marsh, 2018). Las enzimas del borde en cepillo (glucosidasas, peptidasas y fosfatasas) se encargan de la digestión de carbohidratos y proteínas. Se ha reportado que la actividad enzimática total por vellosidad en el duodeno es mayor que la observada en yeyuno e íleon, como resultado de una mayor altura de las vellosidades en el duodeno (Ravindran y Abdollahi, 2021).

### ***MECANISMO DE ACCIÓN SOBRE LA FUNCIONALIDAD INTESTINAL***

**Como actúan los antibióticos.** Los APC son capaces de inhibir microbios que portan hidrolasas de sales biliares, permitiendo un aumento en la concentración de sales biliares y mejorar la digestión intestinal (Jeurissen *et al.*, 2002; Plata *et al.*, 2022). Wang *et al.* (2014) demostraron que el uso de un APC (Enramicina+Flavomicina), mejoraron las características productivas en pollo de engorda a los 21 y a los 42 días de edad, asociado a un aumento en la altura de las vellosidades y en la digestibilidad de nutrientes.

**Como actúan los eubióticos.** El intestino delgado representa casi el 3% del peso vivo, mientras el intestino grueso apenas el 1% en las aves. Al respecto, se ha visto que el uso de un probiótico (*Enterococcus* spp, *L. acidophilus*) o un prebiótico (MOS derivados de *S. cerevisiae*) pudieron incrementar el peso relativo del intestino delgado comparado al de aves suplementadas con enramicina como APC o que no recibieron aditivos (Fernandes *et al.*, 2014). Al-Garadi *et al.*, 2022 observaron que un fitobiótico, permitió incrementar el peso (g) y la densidad intestinal (g/cm) en pollos de engorda, obteniendo un mayor peso vivo a los 35 días de edad, aunque sin mejoramiento en el índice de conversión.

Pelicano *et al.* (2005), quienes al utilizar *B. subtilis* registraron un aumento en la altura de vellosidades en yeyuno y en la profundidad de criptas en duodeno, yeyuno e íleon en pollos a los 21 días de edad. También encontraron una mayor densidad de vellosidades en duodeno, cuando combinaron el *B. subtilis* con MOS+ácido orgánico, y mucho mejor cuando utilizaron un probiótico múltiple (*L. acidophilus*, *L. casei*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus faecium*, *Bifidobacterium bifidum* and *Aspergillus oryzae*). Algo parecido reportaron Song *et al.* (2014) al utilizar una mezcla de probióticos que incluía 2 especies de *Bacillus* y una de *Lactobacillus*. Las aves que recibieron estos aditivos mostraron un incremento en la altura de las vellosidades intestinales obtenidas de yeyuno, reflejado en una reducción en índice de conversión. Elhassan *et al.* (2018) reportaron que el uso de *B. subtilis*, un acidificante (ácidos cítrico, fumárico, málico, láctico y ortofosfórico) y su efecto simbiótico, mostraron una mayor relación V:C en duodeno, con un mayor porcentaje de vellosidades intactas, al utilizar el probiótico. Igualmente, Fonseca *et al.* (2010) registraron un aumento en la altura de las vellosidades del íleon al suplementar un probiótico múltiple (*L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *Enterococcus faecium*, *B. bifidum* y *Streptococcus thermophilus*) en las dietas de pollos machos Cobb.

Ahsan *et al.* (2018) mostraron en pollos Ross 308 algunos efectos benéficos al utilizar 3 niveles de inclusión de un aditivo fitogénico (mezcla de aceites esenciales). Aunque los resultados no mostraron cambios para el rendimiento productivo, se observaron cambios positivos en morfología intestinal (yeyuno), mejorando de forma variable la altura y el diámetro de las vellosidades, la profundidad de criptas, así como el grosor de la capa muscular y el conteo de células caliciformes. En otro experimento al utilizar un extracto de abrojo como fitobiótico en 2 niveles de inclusión, se reportó un incremento en el área de absorción intestinal al suplementar el extracto a 0.75 g/kg, sin embargo, al aumentar la dosis, el efecto fue negativo sobre la morfometría de las vellosidades (Al-Garadi *et al.*, 2022).

Bogucka *et al.* (2019) al comparar un probiótico multiespecie (*L. lactis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *Carnobacterium divergens*, *S. cerevisiae*) sólo y combinado con un prebiótico

(RFO, oligosacárido de la fam. rafinosa), registraron un ancho y área de vellosidad, así como profundidad de criptas mayores al del grupo control en duodeno, yeyuno e íleon. En otro estudio, utilizaron XOS (0.15%) como prebiótico y *Pediococcus acidilactici* ( $10^9$  UFC/kg) como probiótico. Al evaluar su efecto simbiótico, observaron que el pH y la viscosidad redujeron mientras que la fermentación de carbohidratos y la producción de ácido butírico aumentaron, junto con altura de las vellosidades y la relación V:C obtenidas en íleon de pollos. El prebiótico y el probiótico mostraron un mayor nivel de piridoxina y otros metabolitos que ayudan a estabilizar la barrera mucosal del intestino. (Wu *et al.*, 2021). Julendra *et al.* (2021) mostraron este efecto sinérgico al combinar probióticos (*L. plantarum* y *S. cerevisiae*) con 0.5 y 1% de inulina en la dieta, obteniendo una mejor ganancia de peso, índice de conversión y menor mortalidad, que las aves que solo recibieron los probióticos. La mayor eficiencia alimenticia se debió al incremento en la altura de las vellosidades en yeyuno, que fue dependiente de la concentración de inulina.

Previamente, se ha reportado que la actividad enzimática intestinal (amilasa, tripsina, quimotripsina) en pollos de engorda permitió mejorar la altura de las vellosidades y la mayor relación V:C en yeyuno e íleon (Wu *et al.*, 2013), a la vez que se favorecieron otras variables, como la digestibilidad, tal como mencionaron Mountzouris *et al.* (2010), al utilizar tres concentraciones ( $10^8$ ,  $10^9$  y  $10^{10}$  UFC/kg) de un probiótico de 5 especies bacterianas (*L. salivarius*, *L. reuteri*, *E. faecium*, *P. acidilactici*, *Bifidobacterium animalis*) y un antibiótico (avilamicina). Determinaron un aumento en la digestibilidad al utilizar el probiótico ( $10^8$ /kg dieta) y el antibiótico. Similar a lo visto por Yun *et al.* (2017), que registraron una mejora en la digestibilidad de la materia seca al suplementar dietas en pollos de engorda (1 a 28 días de edad) con probióticos (0.2%) y prebióticos (1%), asociando este efecto, al aumento de *Lactobacillus* que se indujo por la combinación de los 2 aditivos.

**Como actúan los bacteriófagos.** Kim *et al.* (2014) reportaron una mejor digestibilidad de MS, PC y energía bruta, al incluir un coctel de BF en la dieta de cerdos en crecimiento, mejor que el grupo tratado con probióticos y el grupo control. Por su parte, Pantoja-Don Juan *et al.* (2022) indicaron que el uso de BF,  $\beta$ -mananasa y la combinación de estos,

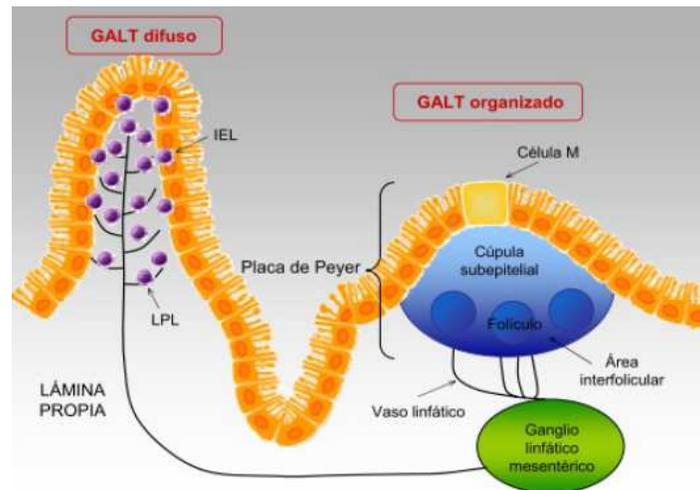
no produjo diferencias en los parámetros productivos de pollos de engorda, sin embargo, se observó un incremento en el largo de la vellosidad al utilizar los BF comparado al obtenido en las aves que recibieron antibiótico, y una reducción en la profundidad de las criptas que a su vez incremento la relación V:C al utilizar las enzimas, a diferencia de no usarlas. Sarrami *et al.* (2022) evaluaron la histometría de vellosidades en yeyuno y la concentración de AGCC en ciegos de pollos Ross 308. Compararon el efecto de 3 niveles de BF y el de un antibiótico. La mayor y menor altura de vellosidad se reportó al usar el nivel más alto de BF (1.5 g/kg) y la colistina, respectivamente. En profundidad de cripta el grupo control fue superior, no obstante, la relación V:C, área de superficie de la vellosidad y la producción de AGCC fueron mejores al usar los BF (1.5 g/kg). También Zeng *et al.* (2021) encontraron al comparar 3 niveles de BF (200, 400 y 600 mg/kg) con un antibiótico, un incremento consistente en la altura de la vellosidad, profundidad de cripta y relación V:C de las vellosidades en duodeno, yeyuno e íleon en lechones, con BF a la dosis de 400 mg/kg, mejor que lo obtenido con el antibiótico.

## 2.4. INMUNIDAD INTESTINAL EN EL POLLO DE ENGORDA

Existen tres áreas o compartimientos diferenciables anatómicamente, que forman parte del sistema inmune intestinal, descritos a continuación:

**Tejido linfoide organizado.** En el intestino se desarrolla este tejido conocido como tejido linfoide asociado al intestino (GALT) y que responde a los desafíos antigénicos (Figura 4). El GALT es la estructura más grande del sistema inmune en el intestino y el sitio primario de inducción de respuesta inmunitaria. El GALT incluye estructuras linfoides organizadas tales como la bolsa de Fabricio, tonsilas cecales, placas de Peyer y divertículo de Meckel. La bolsa de Fabricio es uno de los órganos linfoides primarios, responsable del desarrollo de células B. Las tonsilas cecales y las placas de Peyer son agregados linfoides definidos con un centro germinal conteniendo células inmunológicas, tales como linfocitos, células plasmáticas y células M (enterocito especializado). Estas células captan antígenos luminales, que luego entregan a células presentadoras de

antígenos (CPA) tales como células dendríticas y macrófagos (Guarner, 2007; Wickramasuriya *et al.*, 2022). El divertículo de Meckel, una estructura linfoide única en aves como un remanente de la yema en el intestino delgado, contiene un centro germinal con macrófagos y células B (Wickramasuriya *et al.*, 2022).



**Figura 4. Compartimentos que integran el GALT.** GALT organizado (placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos) y GALT difuso (linfocitos intraepiteliales o IEL y linfocitos de la lámina propia o LPL). Tomado de Hessissen, 2016.

**Epitelio intestinal.** Los enterocitos son parte importante del sistema inmunológico innato del intestino, capaces de fagocitar bacterias e inactivar toxinas (Chelakkot *et al.*, 2018; Wickramasuriya *et al.*, 2022). Además, los enterocitos pueden actuar como células presentadoras de antígenos y al iniciar una respuesta inmune (Figura 5), se da primero la activación de sensores, que continúa con la migración de factores transcripción (NF- $\kappa$ B y otros) al núcleo celular donde se activan la expresión de genes responsables de la síntesis de proteínas proinflamatorias (citoquinas y enzimas inducibles) de este modo, IEC emiten señales con capacidad de atraer y activar leucocitos (Figura 6), aumentar el flujo sanguíneo e incrementar permeabilidad capilar. Otra función inmune de las IEC es la producción de péptidos antimicrobianos. Estos son un grupo diverso de pequeñas moléculas que poseen efecto protector, antimicrobiano, inmunomodulatorio y modulador de la microbiota (Kogut & Arsenault, 2016, Fathima *et al.*, 2022) y que son expresados por una variedad de células, incluyendo células Paneth. Las defensinas son los péptidos más estudiados en pollos; el genoma de los pollos codifica para genes 14  $\beta$ -defensina,

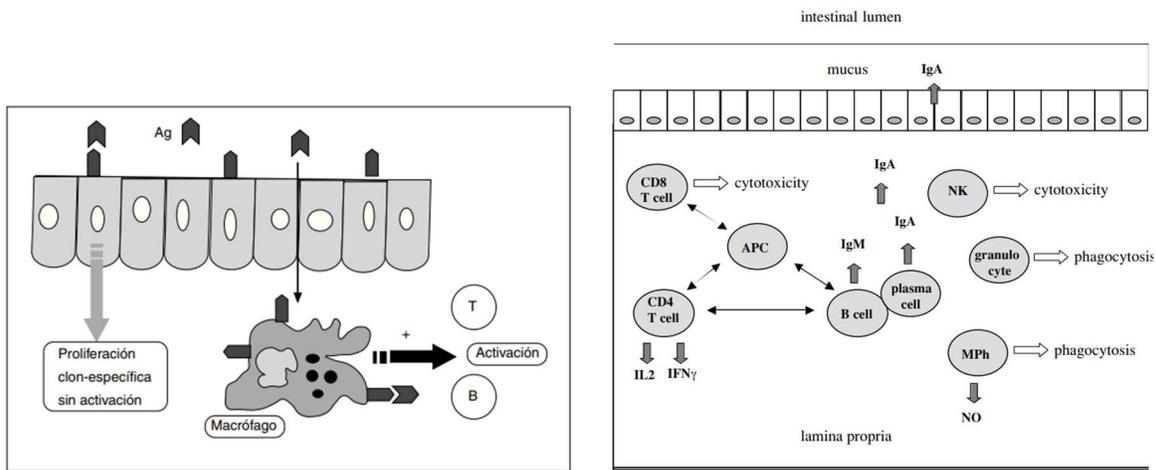
conocidas como gallinacinas. Estos péptidos antimicrobianos poseen actividad antimicrobiana contra bacterias gramnegativas y grampositivas, hongos, virus y protozoarios, como NK-lysina que se ha reportado que juega un rol en la infección por *Eimeria* spp (Wickramasuriya *et al.*, 2022). Finalmente, el mecanismo de regulación de la integridad de la barrera intestinal a nivel de las proteínas de TJ esta mediado por moléculas de señalización múltiple, así como el Factor alfa de Necrosis Tumoral (TNF $\alpha$ ), Interferón-Gamma (IFN- $\gamma$ ) e interleucinas (IL) (Chelakkot *et al.*, 2018).

**Lámina propia.** Dentro de esta capa delgada de tejido conectivo, que descansa debajo de la capa de células epiteliales, se pueden encontrar linfocitos T, células plasmáticas maduras productoras de inmunoglobulina A (IgA), así como CPA, que actúan como células efectoras, a diferencia de las estructuras organizadas que son lugares de inducción (Ensari & Marsh, 2018, Wickramasuriya *et al.*, 2022).

Respecto a los linfocitos, existen 2 compartimientos; los linfocitos intraepiteliales (*intraepithelial lymphocytes*, IEL) y los linfocitos de la lámina propia (*lamina propria lymphocytes*, LPL) (Jeurissen *et al.*, 2002; Wickramasuriya *et al.*, 2022). Los subconjuntos de IEL son NK, heterófilos, células B y células T (CD8+ predominantes sobre CD4+). Los LPL consiste en diferentes células inmunes, incluyendo granulocitos, macrófagos, células dendríticas, células B y T (dominados por CD4+) (Wickramasuriya *et al.*, 2022).

En condiciones normales, la mucosa intestinal contiene pocas células T activadas de fenotipo Th1, y predominan las células T reguladoras (CD4+) (Guarner, 2007). Las mucinas y la IgA secretora (IgAs) son componentes integrales del sistema inmune intestinal, al conformar una barrera contra posibles patógenos antes de que logren alcanzar los enterocitos (Wickramasuriya *et al.*, 2022). Las células Th2 promueven la proliferación de células caliciformes, así como también la metaplasia de células epiteliales a células caliciformes por liberación de interleucinas, seguido por un aumento en la secreción de moco (Zhang y Chenchen, 2020). Por su parte, la IgA y moléculas bioactivas secretadas por células plasmáticas presentes en la lámina propia (Figura 5) y

expulsadas a la superficie de células epiteliales en la capa mucosa interna neutralizan y reducen el número de patógenos que se adhieren al epitelio, limitando la translocación a través de los enterocitos o de las TJ, por lo que juegan un rol en la homeostasis intestinal, incluyendo el establecimiento, mantenimiento y el control de microbios comensales (Jeurissen *et al.*, 2002; Wickramasuriya *et al.*, 2022. A diferencia de la IgA circulante, la IgA secretora (compuesta por 2 moléculas de IgA) es resistente a la proteólisis intraluminal, no activa la vía del complemento, y, por ende, no induce inflamación (Borruel, 2003).



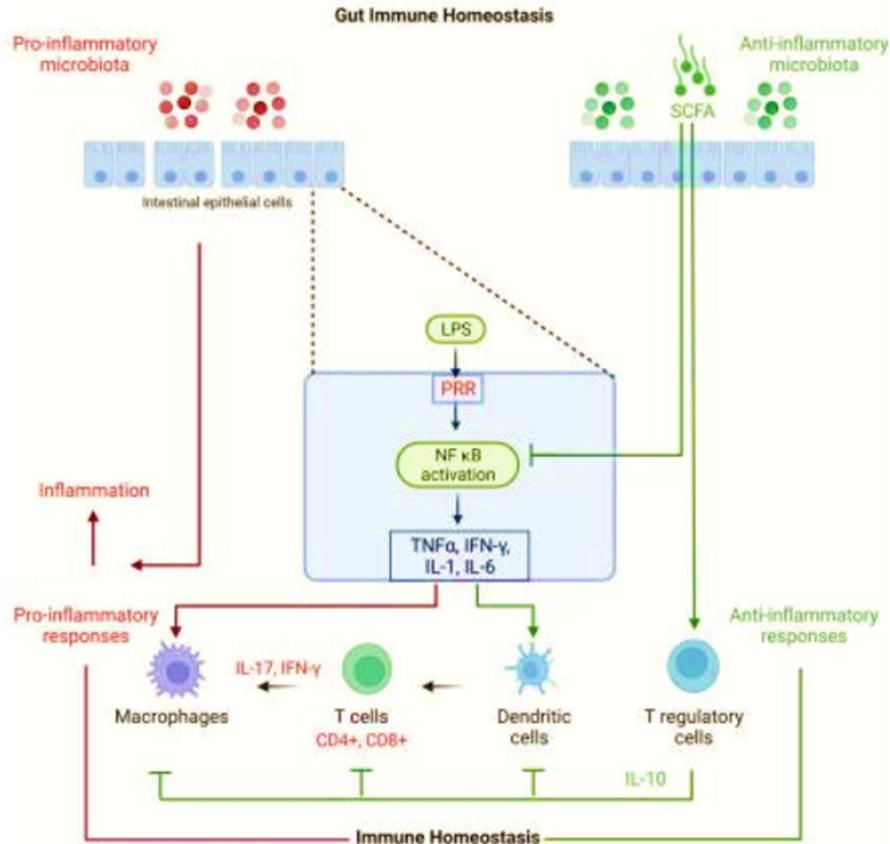
**Figura 5. Representación de la respuesta inmune innata y específica intestinal.** Interacción antígeno-célula IEC (izquierda), Producción de IgAs a partir de células plasmáticas (derecha). Tomado de Jeurissen *et al.*, 2002 y Borruel, 2003.

**Inflamación intestinal.** La inflamación es parte de las respuestas inmunes innata y adaptativa, para proteger al huésped durante situaciones de estrés o disturbio intestinal, causado inicialmente por la dieta (Wickramasuriya *et al.*, 2022). En casos de infección por bacterias, estas proliferan y se adhieren a la mucosa intestinal, causando inflamación y disminución en la absorción de nutrientes, con lo que se retarda el crecimiento y la productividad en las aves (Dhama *et al.*, 2014, Wickramasuriya *et al.*, 2022). En este proceso, la disbiosis, como promotor de la permeabilidad intestinal puede inducir una indeseable inflamación crónica, sino se llega a encontrar un balance entre respuestas pro y antiinflamatorias, lo cual puede ser particularmente difícil en aves jóvenes, que aún

no han alcanzado el desarrollo inmunológico completo, que se presenta alrededor de las 4 o 6 semanas de edad (Kocot *et al.*, 2022; Wickramasuriya *et al.*, 2022).

La respuesta inflamatoria (Figura 6) inicia luego de la detección de un patrón molecular asociado a un patógeno (PAMP, por sus siglas en inglés) por un receptor de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés) de células inmunes residentes (IEC/circulantes). Los PRR, pueden ser del tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés) de la membrana en el medio extracelular, y los receptores tipo NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*) del citosol, en el medio intracelular (Guarner, 2007; Kim y Ho, 2012; Tarradas *et al.*, 2020). La activación de TLR, induce vías de señalización, a través de Kinasas (cascada MAP Kinasa), mismas que pueden activar o suprimir el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y STAT (Tarradas *et al.*, 2020; Cristophori *et al.*, 2021). Los antígenos procesados por CPA se presentan a linfocitos T en estado “naive” (virgen) y se activa la expansión de los clones más afines al antígeno, lo que da lugar a linfocitos “helper” (células Th) de distinto fenotipo: Th1, Th2 o T reguladoras (Treg; Th3, Tr1 o células CD4-CD25). Los Th1 se caracterizan por la secreción de citocinas proinflamatorias, IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF- $\beta$  (linfotóxina), y su función principal es la defensa mediada por fagocitos (NK, macrófagos, TCR $\gamma\delta$  T) contra infecciones intracelulares (virus, bacterias, protozoarios). Los Th2 productores de IL-3, IL-4 e IL-5 actúan como mediadores frente a infecciones por helmintos. Las células Treg en su papel central en inmunotolerancia, segregan citocinas reguladoras, antiinflamatorias (IL-10, TGF- $\beta$ ) y en algunos casos causan inmunosupresión o simplemente subregulan una respuesta inflamatoria excesiva en respuesta a antígenos que se reconocen como “comensales” y no patógenos (Cuadro 4) (Jeurissen *et al.*, 2002; Tarradas *et al.*, 2020; Wickramasuriya *et al.*, 2022).

La microbiota residente en ocasiones incrementa la vascularización inducida por inflamación y el flujo sanguíneo de la mucosa, para aumentar la absorción de nutrientes como se puede apreciar en la Figura 6 (Icaza-Chávez, 2013). Sin embargo, estos nutrientes, dejan de ser destinados a propósitos productivos (Wickramasuriya *et al.*, 2022).



**Figura 6. Respuesta proinflamatoria y antiinflamatoria para alcanzar la homeostasis intestinal.** Tomado de Bilal *et al.*, 2022.

Particularmente con la respuesta innata, el costo de la inmunidad, durante una respuesta de fase aguda en las aves, causa supresión del consumo de alimento, lo cual requiere hasta un 10% del uso de nutrientes, que implica que el costo de nutrientes llegue a ser de hasta 1.3 veces mayor que el de mantenimiento o un costo diario de 0.27 g de proteína ideal/kg de PV (Applegate *et al.*, 2010). Lo anterior con una pérdida del 41% de PV, atribuido a la respuesta inmune (Cardoso *et al.*, 2020). En la evaluación de la enfermedad inflamatoria en humanos, se hace uso de score histológicos (score ISI histológico) para determinar el grado de inflamación, considerándose la celularidad de la lámina propia, cambios epiteliales y daño estructural en criptas. Se ha visto que el TNF- $\alpha$ , sirve como marcador tisular brindando la detección de células inflamatorias como alternativa al score histológico (Bonfiglio *et al.*, 2021). En el cuadro 4, se encuentran algunos factores involucrados en la inflamación como respuesta inmune innata.

**Cuadro 4. Factores involucrados en la inflamación como respuesta inmune innata.**

Factor		Acción	Referencia
PAMPs	Patrón molecular asociado al patógeno	Al unirse a PRRs, induce la activación de la ruta NFκ-β y de péptidos antimicrobianos (1L-1β, β-defensina 3). Indirectamente promueve la producción y secreción de MUC2	Paone y Cani, 2020
NFκ-β	Factor nuclear de transcripción celular	Expresión de citocinas proinflamatorias. Promueve activación de genes para producción de TNF-α, IL6, IL-1, IL-8, IL-12.	Borruel, 2003
Factor MyD88	Proteína adaptadora intracelular	Señalizador que activa factores de transcripción que modulan expresión genética y producción de citocinas proinflamatorias.	Schat <i>et al.</i> , 2014
Citocinas proinflamatorias	IFN-γ	Estimula proliferación GC y producción de moco. Mejora las defensas contra patógenos intracelulares.	Paone y Cani, 2020
	1L-1β, TNF-α	JAK/STAT/MAPK. Ruta NFκ-β. Indirectamente regula la producción y secreción de MUC2.	Paone y Cani, 2020
Citocinas antiinflamatorias	IL-10, 1L-22	JAK/STAT. Ruta NFκ-β. Indirectamente promueve la producción y secreción de MUC2.	Schat <i>et al.</i> , 2014
	IL-13	Estimula proliferación de GC y producción de moco.	Schat <i>et al.</i> , 2014
Linfocitos	Th1	Se caracterizan por la secreción de citocinas proinflamatorias (IL.2, IFN- γ, TNF-β). Activan citocinas (IFN-y) que estimula proliferación GC y producción de moco.	Duangnumsawang et al., 2021 Wickramasuriya et al., 2022
	Th2	Activan citocinas (IL -4, -5, -9, -13) que estimula proliferación GC y producción de moco	Duangnumsawang et al., 2021
	Treg	Segregan citocinas reguladoras, antiinflamatorias (inmunotolerancia/inmunosupresión); IL-10, TGF-β.	Wickramasuriya et al., 2022
IgAs	IgA secretora	Aumenta la capacidad inmune de la mucosa intestinal. No activa la vía del complemento y no induce inflamación. Neutralizan patógenos que se adhieren al epitelio intestinal.	Borruel, 2003 Wickramasuriya et al., 2022

## **MECANISMO DE ACCIÓN SOBRE LA INMUNIDAD INTESTINAL**

**Como actúan los antibióticos.** Una de las principales ventajas de los APC ha sido la reducción en bajo grado, de la inflamación crónica inducida por el alimento, lo cual es detrimental para el crecimiento de los animales, por lo que el retiro de los APC como aditivos puede resultar en un incremento de desórdenes entéricos, infecciones y enfermedades Gao *et al.* (2017). La enramicina, por ejemplo, se ha visto que puede disminuir la infiltración inflamatoria y el grosor de la lámina propia al compararlo con pollos desafiados sin ningún aditivo (Belote *et al.*, 2018).

**Como actúan los eubióticos.** El microbioma intestinal, sujeto de ser alterado o modificado por estos aditivos, actúan como un regulador crítico de la respuesta inmune, influenciando en la diferenciación, función y maduración de las células inmunes tanto del sistema innato como adquirido, de ahí que estos eubióticos se consideren parcialmente inmunomoduladores en su función (Kogut, 2017). Diferentes indicadores se han tomado en cuenta para evaluar la respuesta inmune, como Mountzouris *et al.* (2010) midieron en plasma, la concentración de IgA, IgM, IgG y la concentración total de inmunoglobulinas (Ig) sin encontrar diferencias en ninguno de los tratamientos utilizados (antibiótico y un probiótico multiespecie), no obstante, el probiótico sólo a una concentración ( $10^{10}$  UFC/kg), moduló positivamente la composición de la microbiota, en pollos a los 42 días de edad.

Zhang *et al.* (2011) utilizaron *L. salivarius* B1 por sus propiedades probióticas en lechones, administrado por vía oral a los 0, 7, 11 y 26 d. Reportaron colonización temprana de *L. salivarius* en mucosa duodenal. Lo anterior significó una mejor respuesta inmune innata y barrera mucosal en los lechones, al sobreexpresarse pBD-2 (porcine  $\beta$ -defensin-2) en una manera no inflamatoria, sin cambios en TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  a nivel de mucosa y con cantidades altas de ácido láctico (*in vitro*). En otro experimento, Shanmugasundaram *et al.* (2019) midieron la expresión genética relativa de IL-1, IL-10, TLR-4 e IFN- $\gamma$  en las tonsilas cecales de pollos a los 42 d de edad. Encontraron que la expresión de estas citocinas y el TLR-4 se redujeron con el uso de un antibiótico

(virginiamicina) y un simbiótico (*E. faecium*, *L. reuteri*, *P. acidilactici*, *B. animalis* +FOS). Wu *et al.* (2019) observaron, que usando sólo *E. faecium*, se redujo la traslocación de *C. perfringens* en el hígado, asociado a un mejoramiento de la barrera intestinal por incremento en la expresión de MyD88, NF- $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , IL-4, GLP-2 entre otros, lo cual se reflejó en disminución de la inflamación a 7 días post-infección con *C. perfringens*.

Cho *et al.* (2020) también evaluaron marcadores proinflamatorios y endotoxinas en sangre al utilizar XOS más xilanasas en lechones, lo que permitió reducir TNF- $\alpha$  (plasma) y aumentar la producción de ácido acético a los 35 d de edad, respecto al grupo control, lo cual se asoció a una menor respuesta inflamatoria. Según lo mencionado por Shini y Bryden (2022) los probióticos influyen en la inmunidad intestinal del huésped sin invadir los tejidos de este, y como microorganismos vivos la mucosa intestinal responde a la exposición de estas bacterias, a través de mecanismos innatos y adquiridos del sistema inmune. La producción de AGCC con la subsecuente síntesis de péptidos antimicrobianos (bacteriocinas) les brindan el efecto antiinflamatorio. Al evaluarse la IgA secretora, Gao *et al.* (2017) reportaron un incremento mayor al 10% en su expresión a nivel intestinal a los 14 y a los 42 d, luego de adicionar *L. plantarum* en dietas de pollos frente a lo obtenido en aves con antibiótico y sin aditivo.

**Como actúan los bacteriófagos.** Recientemente, Pantoja-Don Juan *et al.* (2022) evaluaron en pollos de engorda a los 35 d de edad la respuesta inmune sistémica y la producción de anticuerpos IgA (inespecífica) en el epitelio del yeyuno. Se observó un mayor índice morfométrico (49 d) en timo e hígado al utilizar BF frente a enramicina. Para la producción de anticuerpos IgA fue mayor al utilizar BF y  $\beta$ -mannanasas. Los BF, también pueden interferir con la liberación de factores de virulencia, como son los lipopolisacáridos (LPS) e inducir células mononucleares para producir antagonistas de receptores de IL-10, IL-1 y reducir la inflamación, así como regular las funciones de células dendríticas, monocitos y granulocitos e inhibir la ruta de NF- $\kappa$ B estimulado por LPS. Los LPS son receptores comunes para los BF y son factores de virulencia que inducen la producción de citocinas inflamatorias (Shuwen y Kefeng, 2022). Al respecto Sarrami *et al.* (2022) evaluó la expresión de genes involucrados en la inflamación a nivel

de íleon, determinando PPAR $\gamma$  y PGC-1 $\alpha$  que regulan el metabolismo y migración de IEC, así como IL-10 y TLR4. En esta investigación, usando un nivel de inclusión de 1 y 1.5 g de BF/kg, se redujo la expresión de PGC-1 $\alpha$ . La expresión de la citocina IL-10 incrementó al reducir a 0.5 g de BF. La respuesta inmune fue positiva, al determinar incrementos en IgM, IgG y en el peso de timo y bolsa de Fabricio. Algo parecido encontraron Zeng *et al.* (2021), quienes observaron cambios al utilizar BF (400 mg/kg) en lechones destetados, sobre la respuesta inmune: disminución sérica de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ; aumentos en suero de IL-10, TGF- $\alpha$  e ITF; IgA sérica sin cambios, pero IgAs mucosal aumentada. A nivel de mucosa (yeyuno) se encontraron incrementos en TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TLR-2, TLR-4 y TLR-9 al usar los BF, con lo que se confirmó su acción como activador y regulador del sistema inmune.

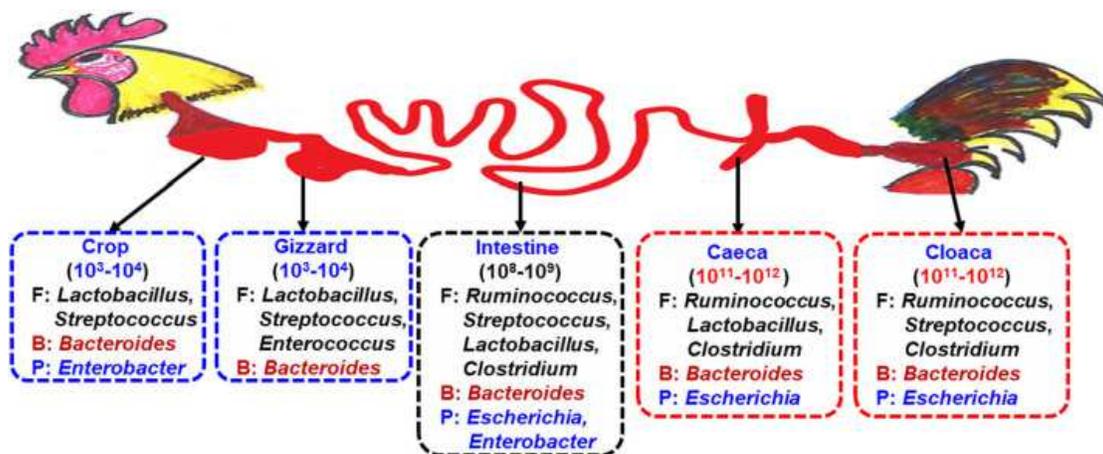
## 2.5. MICROBIOTA INTESTINAL EN EL POLLO DE ENGORDA

La microbiota intestinal comprende los microorganismos vivos que ocupan un nicho ecológico (bacterias, archaea, hongos, protistas, algas, helmintos). También pueden encontrarse BF que pueden ser usados como probióticos en pollos (Kogut, 2019; Berg *et al.*, 2020; Fathima *et al.*, 2022). Si a esta microbiota se agregan sus genes, sus funciones y productos derivados de la microbiota y del huésped, entonces se llama microbioma (Kogut, 2019; Berg *et al.*, 2020). La microbiota representa el elemento más inestable de la barrera intestinal, ya que su composición depende de factores, como son la dieta, condiciones de alojamiento, medicaciones, entre otros (Kocot *et al.*, 2022). La temprana colonización del intestino por microbios es crucial en cuanto a que puede afectar la morfología y la fisiología del intestino y su susceptibilidad a infecciones.

**Sucesión microbiana.** La microbiota intestinal evoluciona con la edad de las aves, aunque se ha visto que puede cambiar en horas (Oviedo-Rondón, 2009). Las primeras especies bacterianas que colonizan el tracto GI del pollito son coliformes y *Streptococci fecal*, los cuales son abundantes al tercer día post-eclosión (Fathima *et al.*, 2022). Para el séptimo día de edad, la microbiota ileal puede estar dominada principalmente por *Lactobacillus*, fam. *Lachnospiraceae* no clasificada y *Enterococcus*. En la fase de

engorde, del día 21 al 42, los organismos más abundantes son *Lactobacillus* (*L. salivarius*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. salivarius*) (Abad-Guaman *et al.*, 2017). De tal manera, que la microbiota del intestino delgado se establece aproximadamente a las 2 semanas de edad, en el ciego se establece entre las 6 y 7 semanas de edad. (Fathima *et al.*, 2022).

**Microbiota por área intestinal.** En cuanto a la variación espacial (Figura 7 y 8), se ha descrito que, en el buche, el proventrículo y la molleja están dominados por bacterias grampositivas tales como *Lactobacillus* spp. y streptococci en cantidades de  $10^3$  a  $10^4$  de UFC/g (Fathima *et al.*, 2022, Wickramasuriya *et al.*, 2022). Otras bacterias que se pueden encontrar en esta parte del intestino, aunque en menor cantidad son *Gallibacterium*, *Veillonella*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*. *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Eubacterium* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, entre otras (Fathima *et al.*, 2022; Wickramasuriya *et al.*, 2022).

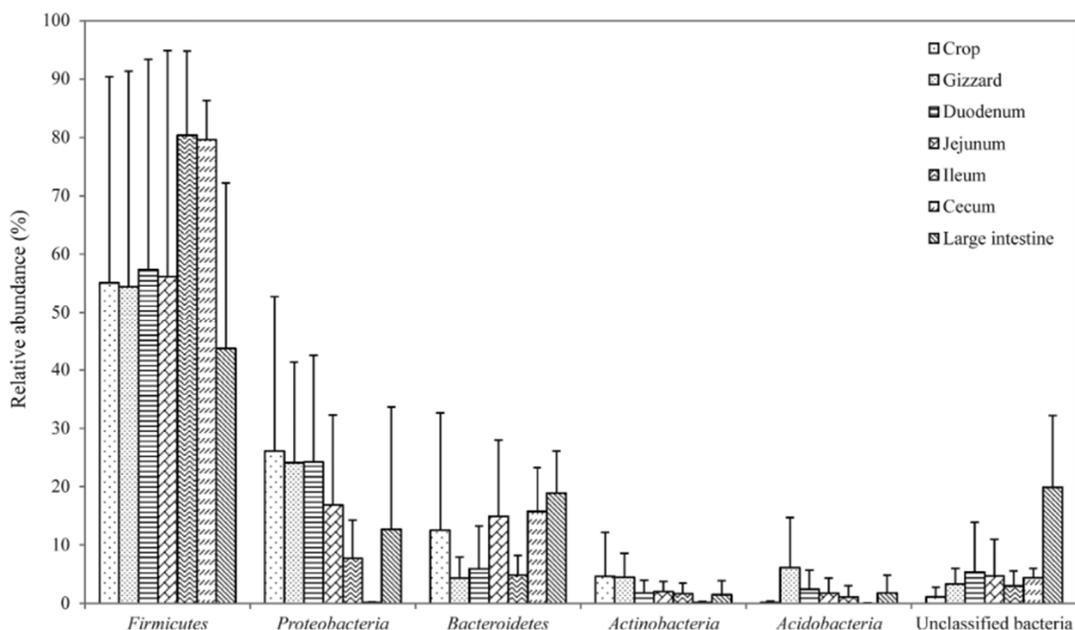


**Figura 7. Filotipos microbianos encontrados en el intestino del pollo de engorda.**

Tomado de Kalia *et al.*, 2022

La microbiota del intestino delgado es escasa en el duodeno ( $10^5$  bacterias/g contenido luminal), debido al pH bajo, enzimas digestivas, sales biliares y alta presión de oxígeno (Yadav y Jha, 2019; Fathima *et al.*, 2022), siendo más abundante en el yeyuno y el íleon ( $10^7-10^9$ /g contenido luminal) (Yegani y Korver, 2008; Fathima *et al.*, 2022; Yadav y Jha, 2019; Wickramasuriya *et al.*, 2022). La mayoría de la microbiota en el duodeno son

*Lactobacilli* y *Bifidobacteria*, en yeyuno el 99 % de las secuencias bacterianas 16S rRNA se relacionaron con *Lactobacilli*, *Enterococci* y *Clostridiaceae* y en íleon el 70 % de las secuencias en íleon están relacionadas a *Lactobacillus*, acompañado de otros géneros minoritarios como *Clostridiaceae*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Turicibacter*, *Escherichia coli*, *Ruminococci* y *Bacteroides* tal como se observa en la figura 7 (Wickramasuriya *et al.*, 2022). En el ciego, las bacterias son un grupo que alcanzan cantidades de  $10^{10}$ - $10^{12}$  por gramo de contenido cecal (Yadav y Jha, 2019). El filotipo Firmicutes predomina en ciego, seguido de Bacteroidetes, 10% de bacterias sin clasificar y con un 2-3% entre Proteobacteria y Actinobacteria. El grupo Archaea es menos abundante ( $10^5$ - $10^7$ /g en ciego). Géneros que se pueden encontrar en ciego son *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp., *E. coli*, *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Eubacterium*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacteroides* spp. (Cisek and Binek, 2014; Yadav y Jha, 2019; Fathima *et al.*, 2022).



**Figura 8. Distribución espacial de la composición de la microbiota por filotipos en el intestino de pollos Ross308 a los 28 d de edad.** Tomado de Choi *et al.*, 2014.

## **MECANISMO ACCIÓN SOBRE LA MICROBIOTA**

**Cuando se usan los antibióticos.** Engberg *et al.* (2000) en su momento demostraron la eficacia de la salinomicina, bacitracina zinc y una combinación de ambos antibióticos. La adición de bacitracina zinc, mostró una reducción en bacterias coliformes en íleon. Por otra parte, el uso de estos APC disminuyó significativamente los conteos de *C. perfringens*, aunque también redujeron al *L. salivarius*, que fue encontrada como LAB dominante en el contenido intestinal. Costa *et al.* (2017) realizaron un estudio para observar los cambios que inducen los APC (bacitracina zinc, enramicina, halquinol virginiamicina, avilamicina) sobre la microbiota cecal de pollos Cobb500. El filo Firmicutes fue el más predominante en todos los tratamientos. La relación Firmicutes:Bacteroidetes no difirió entre los grupos tratados con antibiótico. En la relación Firmicutes:Proteobacteria, los valores fueron menores al utilizar los APC respecto al grupo control. La enramicina mostró una menor diversidad de géneros. En otro experimento, Karimi *et al.* (2022) también estudiaron la participación de los APC, en la modulación de la composición del microbioma, encontrando que la suplementación de la dieta de pollos con BMD (bacitracina), salinomicina y salinomicina+penicilina, disminuyeron la alfa-diversidad (especies y abundancia) de especies bacterianas, comparado a lo obtenido en el grupo de aves control, a los 10 d de edad. Lo anterior fue atribuido al efecto bactericida contra bacterias grampositivas. Al d 35 la diversidad microbiana (especies) se redujo en las aves que se suplementaron con BMD. En cuanto a la beta diversidad, el grupo control tuvo una mayor abundancia relativa de bacterias no clasificadas comparado a los grupos tratados con antibiótico, observándose que el grupo tratado con BMD fue enriquecido con el género *Helicobacter*. Gao *et al.* (2017) observaron que la adición de 2 antibióticos (clortetraciclina+salinomicina) mostró un retraso en la maduración de la microbiota al compararlo con la microbiota de pollos tratados con probiótico y sin aditivo.

**Cuando se usan los eubióticos.** Se ha visto que la modulación en la composición de la microbiota por el uso de probióticos, promueve un incremento en las poblaciones de *Lactobacillus* y *Bifidobacteria* mientras las poblaciones de coliformes, particularmente *E.*

*E. coli* y *Clostridium* spp. disminuyen (Mountzouris *et al.*, 2010; Bajagai *et al.*, 2016), aunque Yun *et al.* (2017) al adicionar un probiótico (*Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp.+*Aspergillus niger*) incluido al 0.2%, combinado con un prebiótico (inulina y arroz integral) al 1% de inclusión, reportaron un aumento de *Lactobacillus* sin disminución de *E. coli* y sin cambios con estos aditivos por separado. Al parecer, no siempre es posible modificar la microbiota intestinal con el uso de probióticos, lo que puede requerir otra concentración o su sinergia con un prebiótico (Mountzouris *et al.*, 2010; Yun *et al.* (2017). Wu *et al.* (2021) por ejemplo, comprobaron efectos individuales con el uso de un prebiótico (XOS), probiótico (*P. acidilactici*) y el simbiótico formado con ambos. El prebiótico favoreció el crecimiento de bacterias productoras de ácido butírico. *P. acidilactici* enriqueció el ecosistema con *Faecalibacterium*, benéfico para el mantenimiento intestinal. El simbiótico redujo el filo Proteobacteria, así como *Campylobacter* en pollos machos de 21 d de edad, además enriqueció al *Lachnospiraceae*.

Danladi *et al.* (2022) por su parte, al trabajar con diferentes paraprobóticos y postbióticos derivados de *L. plantarum*, y hacer un análisis de secuenciación de genes 16SrRNA, encontraron cierto incremento en los índices de alfa diversidad, en muestras de colon de aves. Proteobacteria en la mucosa colónica fue disminuida por el uso de postbióticos, paraprobóticos y el grupo positivo control, que incluía un antibiótico (oxitetraciclina), por lo que estos aditivos afectaron positivamente la microbiota. El uso de bacterias probióticas esporuladoras, también han favorecido el mantenimiento de la homeostasis intestinal, tal como explicaron Song *et al.* (2014) que al emplear *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *L. plantarum* como probióticos en pollos Ross 308, de 22 a 42 d, se registró un aumento de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, con reducción de coliformes y sin cambios para *Clostridium* respecto al grupo de aves que no recibieron aditivo alguno. Lo anterior se vio reflejado en un menor índice de conversión al utilizar la mezcla de bacterias probióticas.

Shini y Bryden (2022), aclararon que los probióticos son considerados una alternativa a los antibióticos, no como tratamiento, sino como sustitutos en términos de modulación de la microbiota intestinal permitiendo con ello mantener o reconstruir el microbioma

intestinal por estimulación del crecimiento de microorganismos benéficos como *Lactobacillus* o *Bifidobacteria*, dado que poseen en muchos casos, una mayor capacidad de adherencia que bacterias patógenas como *E. coli*. Ribeiro *et al.* (2018) reportaron un incremento de bacterias del Género *Solirubrobacter* y *Bifidobacterium*, así como de las familias *Lactobacillaceae* y *Lachnospiraceae*, al comparar dietas de pollos suplementadas con diferentes niveles de XOS (xilo-oligosacáridos) y xilanasa endógena en diferentes experimentos. Por su parte, Cho *et al.* (2020) observaron que la suplementación con estimbiótico en dietas de cerdos, estimuló el incremento de bacterias fibrolíticas y productoras de butirato, de las fam. Clostridiales y Clostridiaceae, promoviendo así un microbioma más benéfico para el huésped.

Ante ciertos desafíos para replicar enfermedad, como enteritis necrótica, se han utilizado probióticos como *B. subtilis*, logrando controlar la proliferación de *C. perfringens*. En estos casos se ha logrado estabilizar la microbiota y se cree es factible prevenir otros desórdenes intestinales causados por patógenos oportunistas como *C. jejuni*, *E. coli* y *Salmonella* spp. (Whelan *et al.*, 2019). Shanmugasundaram *et al.* (2019) compararon el efecto de un antibiótico (virginiamicina) y un simbiótico (*L. reuteri*, *E. faecium*, *B. animalis*, y *P. acidilactici* + FOS) para reducir la colonización intestinal inducida con *Salmonella* Enteritidis en pollos a partir del día 21 de edad. Reportaron cambios positivos desde el tercer día post-inoculación, y aunque hasta el séptimo día el uso del antibiótico disminuyó notablemente la carga de *Salmonella*, para el día 21 ambos productos disminuyeron por igual la colonización de este patógeno, por encima del grupo control.

**Como actúan los bacteriófagos.** Kim *et al.* (2014) en un experimento con cerdos en crecimiento, comprobaron que al recibir un coctel de BF en combinación con probióticos se optimizó la presencia de bacterias benéficas, con mayor conteo de bacterias anaeróbicas, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. y menor conteo de *Clostridium* spp. y coliformes. Al comparar la respuesta individual al utilizar BF y probióticos, BF respondieron mejor que el probiótico. Clavijo *et al.* (2022) evaluaron la diversidad microbiana cecal en aves suplementadas vía oral, con una suspensión conteniendo  $10^8$  BF específicos para *Salmonella*, reportando inesperadamente la ausencia de

*Bifidobacterium*. Se observó además una reducción de *Campylobacter*, que mostró correlación con el aumento de *Helicobacter pullorum*, lo que hizo inferir que existe cierta dinámica competitiva entre estos géneros. Aunque se determinó que los BF no afectaron el desarrollo normal de la microbiota, reportaron bacterias que son clave para su adaptación en la última etapa de producción, y que son degradadoras de complejos polisacararidos.y productores de AGCC, tales como *Eisenbergiella* y *Lachnoclostridium*.

Pantoja-Don Juan (2022), realizaron un análisis de alfa y beta diversidad del microbioma cecal, sin reportar cambios entre tratamientos, que en su mayoría incluían BF. Los filos predominantes en todos los tratamientos fueron Firmicutes (mayor del 65%), seguido de Bacteroidetes, Proteobacteria y Actinobacteria. El filo Proteobacteria disminuyó al combinar BF y  $\beta$ -mananases, frente al uso individual de los 2 aditivos. Se demostró que el uso de un producto comercial con BF, promovió la abundancia de microorganismos benéficos en el ciego, concluyendo que los BF son una alternativa para mejorar el rendimiento productivo de los pollos sin afectar la microbiota cecal. Algo parecido afirmaron Abbas *et al.* (2022), que al reducir el conteo de *Campylobacter jejuni*. en pollos con el uso de BF específicos, no se afectó la microbiota. En otro estudio con pollos de engorda (Ross308), se utilizaron BF anti-SE (*Salmonella enteritidis*) como aditivo alimenticio en tres niveles de inclusión (0.05, 0.1 y 0.2%, con  $10^9$  UFC/g). Los resultados no mostraron cambios en el crecimiento y en la producción de carne, así como en peso relativo de órganos y en perfiles sanguíneos, tal fue el caso del colesterol. La inclusión de BF en todos los niveles, disminuyó el conteo cecal de *S. enteritidis*, pero sin cambios en el conteo de *Lactobacillus* spp. y *E. coli* comprobando con ello la especificidad de los BF utilizados para *Salmonella enteritidis*. Wang *et al.* (2013), emplearon BF contra *Salmonella* spp. y contra *E. coli* en un estudio con pollos. Se usaron 2 niveles de BF (250 y 500 ppm), se comparó su efecto con la adición de un antibiótico (bacitracina, 500 ppm) y finalmente se observó que la suplementación de BF y bacitracina redujeron la concentración de *Salmonella* spp. y *E. coli*, y se incrementó la concentración de *Lactobacillus* spp. con BF (500 ppm). En el cuadro 5, se pueden observar algunos de los mecanismos de acción de los probióticos y prebióticos dentro del microbioma.

**Cuadro 5. Mecanismo de acción de probióticos y prebióticos específicos sobre el microbioma de las aves**

Filotipo/Especie	Actividad intestinal	Referencia
Firmicutes <i>Lactobacillus salivarius</i>	↑ 1L-1β y factor regulatorio de IFN-γ en macrófagos ↑ índice fagocítico en heterófilos ↓ población <i>Clostridium perfringens</i> y <i>Salmonella enteritidis</i> Mejor respuesta inmune innata y barrera mucosal por sobreexpresión de una defensiva.	Zhang et al., 2011 Yu et al., 2021 Yagoob et al., 2022
Firmicute <i>Lactobacillus reuteri</i>	↑ capa de moco ↑ expresión de JAM2 en duodeno ↓ expresión β-defensina-10 aviar en íleon y ciego	Paone y Cani, 2020 Nii et al., 2020
Firmicute <i>Bacillus subtilis</i>	Secretan α-amilasa, arabinasa, celulasa, β-glucanasa, DNAsa ↑ respuesta de defensa en íleon Facilita el crecimiento de <i>L. reuteri</i> ↓ Crecimiento <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> spp. Expresión de genes de mucina	Al-Khalaifah, 2018 Gagliardi et al., 2018 Yagoob et al., 2022 Majidi-Mosleh et al., 2017
Firmicute <i>Enterococcus faecium</i>	Produce ácido láctico y ↓ pH ↑ TLR2, MyD88, NF-κB, TGF-β y reducción de la inflamación. ↑ producción IgA mucosal Sobrerregula CLDN en yeyuno Produce enterocina que inhibe el crecimiento de enterobacterias ( <i>C. perfringens</i> , <i>Campylobacter</i> spp. <i>Salmonella</i> spp.)	Wu et al., 2019 Hernández-González, 2021 Yu et al., 2021 Yaqoob et al., 2022
Firmicute <i>Pediococcus acidolactici</i>	Disminuye pH y viscosidad. Puede incrementar las concentraciones de piridoxina. Promueve el crecimiento de <i>Faecalibacterium</i> , benéfico para el mantenimiento intestinal. Permite modular el microbioma (LAB) y el metaboloma.	Majidi-Mosleh et al., 2017 Wu et al., 2021
Actinobacteria <i>Bifidobacterium animalis</i>	Producen vitaminas, enzimas y AGCC (láctico y acético)	Gagliardi et al., 2018
FOS	↓ proporción de células B en tonsilas cecales ↓ sensibilidad mitógena de linfocitos ↑ <i>Lactobacillus</i> ↓ <i>Helicobacter</i> y <i>Desulfovibrio</i> en mucosa ideal	Yu et al., 2021
MOS	Subregulación de IFN-γ en tonsilas cecales ↑ <i>Butyricimonas</i> y <i>Roseburia</i> en ciego	Yu et al., 2021
XOS	↑ <i>Bifidobacterium</i> en ciego Inducen abundancia de bacterias productoras de ácido butírico. Disminuye pH Puede incrementar las concentraciones de piridoxina Puede modular la microbiota intestinal y el metaboloma	Yu et al., 2021 Wu et al., 2021
Inulina	↑ relación heterófilos:linfocitos Colonización de células TCD8α+ y Tyδ+ en tonsilas cecales	Yu et al., 2021
Paredes celulares de <i>S. cerevisiae</i>	↓ proporción <i>E. coli</i> y <i>S. enterica</i>	Yu et al., 2021
β-glucano	↑ proliferación y actividad fagocítica de macrófagos y heterófilos Inhibición de la colonización intestinal de <i>Salmonella</i> entérica	Yu et al., 2021

## 2.6. INTERACCIÓN DIETA-MICROBIOTA-SISTEMA-INMUNE

Los microorganismos que componen la microbiota pueden ser determinados por las características de la dieta, influyendo en el predominio de unos microorganismos sobre otros (Icaza-Chávez, 2013; Belkaid y Hand, 2014). Dietas de pollos de engorda con maíz o sorgo incrementaron los conteos de *Enterococcus*, dietas a base de cebada incrementaron la cantidad de *Lactobacillus*, la dietas con avena mejoraron el crecimiento de *E. coli* y *Lactococcus*, y las dietas con centeno, incrementaron el género *Streptococcus* (Yegani y Korver, 2008). Haberecht *et al.* (2020) determinaron en diferentes ingredientes alimenticios usados en pollos la presencia de *Actinobacteria* (47.6%), *Proteobacteria* (38.9%), *Firmicutes* (11%) y *Bacteroidetes* (2.5%) distribuidos en 50 géneros bacterianos. Al comparar la composición microbiana del alimento y la constituida en el intestino, encontraron que era similar a la del íleon, variable con la excreta, y más distante con la comunidad cecal. Además, la microbiota intestinal fue más compleja y distinta con la harina de carne-hueso y harina de sangre, que al usar ingredientes como sorgo, maíz, trigo, frijol soya, canola, entre otros.

Se conoce que el consumo de alimento, *per se*, así como los componentes de la dieta, tales como compuestos antinutricionales, micotoxinas, exceso de fibra soluble o proteína, conllevan a la sobrecarga de metabolitos que actúan como patrones asociados al daño (DAMPs, por sus siglas en inglés), que detectadas por PRR (TLR4 y NLRP3) del sistema inmune innato, pueden estimular una respuesta inflamatoria de bajo grado (IL-1 $\beta$  y IL-6), e incluso de tipo crónica en el intestino (Kogut, 2017; Cardoso *et al.*, 2020 y 2021). Esta inflamación puede progresar desde los segmentos proximales (duodeno, yeyuno) hacia distal (íleon) (Cardoso *et al.*, 2020 y 2021). La harina de soya, por ejemplo, contiene  $\beta$ -galactomananos, como PNA, que también son componentes de múltiples patógenos e inmunogénicos y que dan lugar a una respuesta inmune inducida por el alimento (FIIR, por sus siglas en inglés), lo cual puede demandar un 3% de la energía metabolizable consumida por las aves (Kogut, 2017).

Es por ello, que cualquier disturbio en los aspectos físico o fisiológico a nivel de intestino, influyen en la homeostasis o salud intestinal (Sethiya, 2016; Wickramasuriya *et al.*, 2022, Shini y Bryden, 2022) Es aquí donde el sistema inmune de la mucosa debe satisfacer 2 funciones: 1) ser capaz de controlar la microbiota intestinal, previniendo el sobrecrecimiento y translocación a sitios sistémicos; 2) tolerar microbios, distinguir si son patógenos y prevenir la inducción de una respuesta inmune excesiva y dañina (Guarner, 2007; lebba *et al.*, 2016). Al mismo tiempo, la microbiota intestinal ayuda a regular la respuesta inmune hacia la inflamación o la tolerancia (lebba *et al.*, 2016; Wickramasuriya *et al.*, 2022), siempre y cuando exista eubiosis, que implica la presencia de una microbiota que mantenga el equilibrio entre bacterias benéficas y potencialmente patógenas, con preponderancia del filotipo Firmicutes y Bacteroides (Dhama *et al.*, 2014; lebba *et al.*, 2016; Hooks y O'malley, 2017; Gagliardi *et al.*, 2018). Por el contrario, la alteración o desequilibrio microbiano, con baja diversidad, desplazamiento de bacterias benéficas por patógenas, cambios en la capacidad metabólica-digestiva, conocido como disbiosis, tendrá efectos negativos sobre la respuesta inmune mucosal y, por ende, en la productividad (lebba *et al.*, 2016; Hooks y O'malley, 2017; Kogut, 2019; Gagliardi *et al.*, 2018; Fathima *et al.*, 2022). Al final, la influencia de la microbiota intestinal sobre el sistema inmune puede tener implicaciones sobre la salud y productividad, considerando el ahorro de energía, la inmunidad y la inflamación (Díaz carrasco *et al.*, 2019).

## **2.7. USO DE ADITIVOS EUBIÓTICOS Y PRODUCTIVIDAD.**

Desde hace algunas décadas que se ha investigado el uso de alternativas a los APC, tiempo en el cual se han ido resolviendo dudas respecto a sus efectos fisiológicos y microbiológicos *in vivo*, así como la persistencia y el alcance de sus efectos. Esto ha hecho que los eubióticos ganen terreno en el mercado de los aditivos, ofreciendo grandes beneficios basados en la productividad, que se considera el mejor juez para dictar el éxito de cualquier aditivo en nutrición animal (Cho *et al.*, 2020). Los APC mejoran el rendimiento productivo de las aves sustancialmente, tal como Plata *et al.* (2022) reportaron una diferencia del 9 a 14% mayor en ganancia de peso y de 3.8 a

6.2% menor en índice de conversión a favor dietas que incluían antibiótico. Pese a ello, algunos probióticos como el *B. subtilis* se ha utilizado con igual éxito, demostrando que pueden alcanzar los mismos parámetros productivos que con los APC, mejorando el índice de conversión y porcentaje de mortalidad (Whelan *et al.*, 2019). Yun *et al.* (2017), al suplementar la dieta de aves con un probiótico (*Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., *Aspergillus niger*) y 2 prebióticos (inulina de achicoria y salvado de arroz), mejoraron el PV y el IC al compararlo con el grupo control, con tendencia a superar estos resultados cuando se utilizó el efecto simbiótico (probiótico+prebiótico). Khoobani *et al.* (2019) también registraron un mejoramiento del 10% en PV e IC respecto a las aves del grupo control, utilizando un probiótico y un fitobiótico (achicoria al 0.10%). Gurram *et al.* (2021) por su parte, demostraron que el uso de achicoria (>40% de inulina) obtuvo un mismo IC al uso de bacitracina (BMD-500mg/ton), ambos superiores al grupo control. Alkhulaifi *et al.* (2022) al realizar desafíos con *Salmonella typhimurium* ( $3 \times 10^9$  UFC/ml) y *C. perfringens* ( $4 \times 10^8$  UFC/ml) en pollos de engorda, observaron que la suplementación con paredes de levadura de *S. cerevisiae*, ayudó a mejorar el IC, viabilidad y el factor de eficiencia de producción europea, recuperando las pérdidas reportadas en los pollos desafiados.

Ahora con la disponibilidad de productos comerciales con BF, son una promesa en el ámbito de la producción animal y existe información que lo respalda. Como Kim *et al.* (2014) al comparar un probiótico multiespecie, un coctel de BF y su combinación, registraron una óptima colonización de microorganismos benéficos, que se reflejó en una mejor digestibilidad y un mejor IC, en las aves que recibieron BF, superando a los probióticos. Así, en otro estudio, Sarrami *et al.* (2022) utilizaron coctel de BF anti-*Salmonella* y anti-*E. coli* (1 y 1.5 g/kg) a una concentración de  $2.04 \times 10^8$  UFP/g. Reportaron aumentos de GDP, IC y en el índice de eficiencia europea (EPEF, por sus siglas en inglés), al compararlos con lo obtenido en las aves que no recibieron aditivos y las que recibieron colistina como antibiótico. Zeng *et al.* (2021), indicaron que el uso de un coctel de BF (400 mg/kg;  $10^8$  UFP/g) mejoró GP e IC frente al uso de aureomicina, señalando que estos resultados se debieron a la modulación del sistema inmune y de la microbiota intestinal.

## 2.8. IMPACTO DE LOS EUBIÓTICOS EN EL BIENESTAR ANIMAL.

El uso de aditivos eubióticos permitirá un cambio necesario para preservar la eficacia de los antibióticos (Roberts *et al.*, 2015) que, de ser requeridos, estos puedan actuar sin que avance aún más la resistencia bacteriana y sea posible detener una enfermedad, como la colibacilosis, la salmonelosis y la clostridiosis que causan grandes pérdidas en la avicultura (Harada *et al.*, 2018; Abbas *et al.*, 2022). El uso profiláctico de estas alternativas se ha visto promueven la salud intestinal, y la utilización de nutrientes (Applegate *et al.*, 2010; Roberts *et al.*, 2015) con lo que forzosamente mejoran la salud animal y con ello la productividad (Roberts *et al.*, 2015).

Se han registrado otros beneficios en cuanto al uso de eubióticos sobre el bienestar de las aves, tal como Whelan *et al.* (2019), quienes comprobaron la disminución en la presencia de lesiones en los cojinetes plantares y el porcentaje de mortalidad en pollos de engorda, con el uso de aditivos, como los probióticos, así como Al-Sagan y Abudabos (2018) observaron la reducción en la severidad de lesiones a nivel de mucosa en yeyuno e íleon, al utilizar *B. subtilis* y MOS como eubióticos, en pollos de engorda vacunados vs coccidia y desafiados al mismo tiempo con *C. perfringens*. Por otra parte, se sabe que el uso de *Enterococcus faecium*, puede atenuar los efectos perjudiciales de la enteritis necrótica en pollos de engorda, tal como fue descrito por Wu *et al.* (2019).

En cuanto al uso de los BF para controlar infecciones bacterianas en aves, se sabe que su espectro antibacteriano es limitado, tal como fue observado al evaluar la efectividad de un cóctel de BF (9.5-9.9 log UFC/ml por vía IM), en pollos desafiados con *E. coli* inoculada en sacos aéreos torácicos. Esto fue comparado con el uso de enrofloxacin y la combinación de ambos para conocer si es sustituto potencial del antibiótico en casos de colibacilosis en pollos (Cobb500). Los resultados mostraron reducción en la mortalidad de forma significativa, con la adición de BF y enrofloxacin, con 15 y 3% respectivamente, aunque las lesiones de aerosaculitis fueron menores con el antibiótico y con mejores resultados al hacer la sinergia con ambos tratamientos,

con la ventaja adicional de reducir la cantidad de antibiótico (Huff *et al.*, 2004; (Harada *et al.*, 2018; Abbas *et al.*, 2022). En lechones se ha visto que el uso de BF, pueden reducir la incidencia de diarreas (5.06%), incluso con mejores resultados que con el uso de antibióticos (6.51%) (Zeng *et al.*, 2021).

## **2.9. RELACIÓN DE LOS EUBIÓTICOS CON LA INOCUIDAD ALIMENTARIA.**

Aunque los microorganismos usados como probióticos en la alimentación animal son relativamente seguros, se sabe de algunos riesgos asociados con el uso de probióticos (FAO, 2016, Bajagai *et al.*, 2016). Los riesgos más importantes hacen referencia a la transferencia de genes de resistencia a los antibióticos y las infecciones, así como afecciones por la presencia de toxinas en microorganismos probióticos. La información documentada al respecto, sin embargo, es escasa, de tal manera que no es posible declarar ningún grupo de probióticos como 100% seguros (Bajagai *et al.*, 2016). En cuanto al uso de BF, se afirma que no son tóxicos, alérgicos o pirogénicos y que sólo atacan bacterias. Además, una vez que la población bacteriana objetivo es eliminada, el número de BF disminuye en gran proporción (Abbas *et al.*, 2022; Shuwen y Kefeng, 2022). Actualmente el uso de BF en aves ha sido enfocado en reducir conteos bacterianos y controlar las infecciones bacterianas por *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Clostridium* spp. y *Campylobacter* spp., las cuales son causa de enfermedad clínica y subclínica, y que representan un problema sanitario con impacto económico y de riesgo para la salud pública (Wernicki *et al.*, 2017; Johnson *et al.*, 2017; Abbas *et al.*, 2022). Por ello, el uso de BF también se ha estudiado para reducir la contaminación bacteriana de canales de pollo en las salas de procesamiento cárnico (Higgins *et al.*, 2005), como alternativa para el tratamiento contra bacterias que normalmente contaminan las canales como *C. jejuni*, usados con éxito en pollos 24 h previo al sacrificio para reducir sus conteos. (Firlieyanti, *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2017; Abbas *et al.*, 2022).

## 2.10. COSTO BENEFICIO DE LOS EUBIÓTICOS.

De acuerdo con Chan *et al.* (2016), analizaron el retorno de inversión por uso de Bacitracina (BMD) como profiláctico contra enteritis necrótica (EN), considerando una mortalidad de 1 a 20% con pesos objetivo de 4.63 a 7.94 lb. El retorno promedio de BMD/lb de pollo producido fue de 0.8 a 2.1 dólares, dependiendo la morbilidad por EN y el peso objetivo. La conclusión de esto es que resultó positivo el uso de BMD en parvadas con riesgo de EN, lo cual es un desafío en el aspecto económico para su reemplazo por alternativas a los APC. Lo anterior, fue confirmado en un estudio en Brasil, donde realizaron un metaanálisis, encontrando que los pollos con APC obtienen mayores ganancias de peso y menores índices de conversión, además de un impacto económico de no usarlos de 0.03 dólares por ave y un costo anual de 183,560,232 dólares por año (Cardinal *et al.*, 2019). En otro estudio, en un modelo expuesto para reducir el uso de antimicrobianos bajo el supuesto de que esto incrementaría los costos de producción debido a mayor morbilidad/mortalidad, menor peso y mayor consumo de alimento, se concluyó que, ante una enfermedad con un costo de 225 dólares, reducir el uso del antibiótico en un 20%, el costo de la enfermedad sería de 31 dólares. Reducir a un 50 y 100%, el costo sería de 83 y 147 dólares respectivamente. Es decir, un costo del 14, 37 y 65% por arriba del costo actual. Sin embargo, de acuerdo con estos autores, el ahorro de no usar antibiótico es mayor para atender los costos incrementados (Azabo *et al.*, 2022).

En un estudio con aditivos herbales, entre ellos el ajo, mencionaron que el EBI (European Broiler Index, por sus siglas en inglés) fue mayor con el uso de estos aditivos en pollos. Además, en el análisis de eficiencia económica mostraron que el aditivo con el menor costo por ganancia de peso fue el ajo (0.68 €/kg) y la pimienta negra con el más alto costo por ganancia de peso (0.82 €/kg). El incremento en el costo por el uso de estos aditivos fue mínimo comparado al grupo control, con mayores beneficios por oferta de un producto que satisface las demandas del mercado, seguros y sanos, así como mejores parámetros productivos (Peso, IC, Mortalidad) (Puvaca *et al.*, 2020). Respecto al uso de probióticos, prebióticos y simbióticos existe un estudio

que realiza una simulación para el análisis de rentabilidad respecto al beneficio que ofrecen estos aditivos como estrategia de intervención para el controlar el *Campylobacter* en los pollos de engorda y que afecta a la salud humana. Para este caso en particular, analizado en 4 países de Europa, se asumió que el costo-efectividad (costos anuales de implementación de los aditivos dividido por los beneficios anuales en salud pública) de los probióticos, prebióticos y simbióticos, puede ser relativamente viable para *Campylobacter* incluso con niveles bajos de eficacia del 1 al 10% (van Wagenberg *et al.*, 2020). De acuerdo con Al-Khalaifah (2018) el costo de los probióticos o prebióticos hasta hace unos años estaban en un rango de 1 a 20 dólares americanos por kg, dependiendo de la compañía comercial y los ingredientes activos del producto. Lo anterior es sopesado con un aumento en el peso vivo, mejoramiento en el índice de conversión y aumento en la viabilidad. Asimismo, mencionaron que el uso de un simbiótico puede ser más eficiente en términos del Índice de Eficiencia Europea (EPEI) y Retorno sobre el Costo del Alimento (ROFC, por sus siglas en inglés). Para el caso de los BF, no hay datos sobre su costo-beneficio, no obstante, se sabe de las ventajas productivas que ha demostrado su uso, como mejores ganancias de peso e índices de conversión, así como Wernicki *et al.* (2017) que enlistaron diversos estudios con BF, que muestran como reducen la morbilidad, la mortalidad (20-100% dependiendo el agente patógeno), severidad de la enfermedad, así como la contaminación de productos avícolas

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La producción animal, con la prohibición de antibióticos como promotores del crecimiento, fomenta el uso de alternativas comerciales disponibles, que se sabe pueden influir positivamente en la productividad de las aves. Estas alternativas, promueven la homeostasis intestinal y la modulación de la microbiota, característica que les confiere el nombre de eubióticos (probióticos, prebióticos, fitobióticos, entre otros). Algunos aditivos, de reciente uso comercial, como los bacteriófagos, se investigan para conocer si desempeñan funciones, similares a los aditivos mencionados, y si lo hacen, buscar las bases para sustentar su uso como eubióticos, inmunomoduladores o simplemente como biocontroladores de bacterias patógenas. Esto implica sumarse a los trabajos de investigación que permita ir definiendo sus mecanismos de acción a través de los cuales coadyuvan en la salud intestinal y en la productividad. Por ello, el presente estudio se realizó con la finalidad de evaluar la suplementación con un antibiótico, aditivos eubióticos y un coctel de bacteriófagos, en pollos de engorda alimentados con dietas sorgo-soya para discernir si los bacteriófagos replican los efectos del antibiótico y/o de los aditivos eubióticos más utilizados en la alimentación del pollo de engorda, mediante cambios morfológicos, histométricos, histológicos (inflamación como respuesta inmune innata) y en su caso, bacteriológicos a nivel intestinal y su relación con la productividad.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

Evaluar el efecto de aditivos eubióticos y bacteriófagos en dietas sorgo-soya para pollos de engorda sobre características productivas, salud intestinal y cuantificación relativa de enterobacterias específicas.

### **4.2. Objetivos específicos**

- 1) Evaluar características productivas y de la canal en pollos de engorda alimentados con dietas sorgo+soya, adicionadas con eubióticos y bacteriófagos.
- 2) Determinar variables morfométricas intestinales, en pollos de engorda alimentados con dietas sorgo+soya, suplementadas con eubióticos y bacteriófagos.
- 3) Evaluar cambios histológicos intestinales, en pollos de engorda alimentados con dietas sorgo+soya, adicionadas con eubióticos y bacteriófagos.
- 4) Realizar la cuantificación relativa de ADN de bacterias específicas por PCR en tiempo real a partir de contenido ileal y cecal, en pollos de engorda alimentados con dietas sorgo+soya, suplementadas con eubióticos y bacteriófagos.

## 5. HIPÓTESIS

1. La adición de eubióticos y bacteriófagos en dietas para pollos de engorda incrementa los característica productivas y de la canal.
2. La suplementación con eubióticos y bacteriófagos en dietas para pollo de engorda mejoran las variables morfométricas intestinales.
3. Los tratamientos con eubióticos y bacteriófagos en dietas para pollo de engorda están asociados a los cambios histológicos intestinales, relacionados con hiperplasia de células epiteliales, hiperplasia de células caliciformes e infiltración linfocitaria.
4. Los tratamientos con aditivos eubióticos y bacteriófagos en dietas para pollo de engorda muestran cambios positivos en la cuantificación relativa de enterobacterias específicas en íleon y ciegos.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1. ÁREA DE ESTUDIO**

La presente investigación se desarrolló en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPAV) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. El CEIEPAV se localiza en la calle Manuel M. López S/N en la Colonia Santiago Zapotitlán en la Delegación Tláhuac, Ciudad de México; a una altura de 2250 msnm, en el paralelo 19°17' latitud norte y el meridiano 99°02'30" longitud oeste. Bajo condiciones de clima templado subhúmedo (Cw), siendo enero el mes más frío y mayo el más caluroso, con una temperatura promedio anual de 16°C y con una precipitación pluvial anual de 747 mm.

### **6.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO Y MANEJO**

Se emplearon 1000 pollos Ross 308 mixtos, de un día de edad, con un peso promedio de 43 g, vacunados contra la enfermedad de Gumboro y Marek. Las aves fueron distribuidas en 40 lotes; se alojaron durante 7 semanas en una caseta de ambiente natural con corrales de piso de cemento, cama de viruta, con una densidad de 10 aves/m<sup>2</sup> y crianza en túnel. Se mantuvieron bajo un programa de luz natural, con 11 horas diarias de luz en promedio. Las primeras cuatro semanas recibieron calor mediante criadoras catalíticas y terminaron con temperatura ambiente. La ventilación se controló con cortinas laterales y se registraron las temperaturas dentro de la caseta. Al día 10, las aves se vacunaron contra la enfermedad de Newcastle, Cepa La Sota, virus vivo vía ocular y virus muerto vía subcutánea. Todos los cuidados y procedimientos técnicos fueron aprobados por el subcomité institucional para el cuidado y uso de animales experimentales (protocolo DC-2018/2-5) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

### **6.3. DIETAS EXPERIMENTALES**

Se emplearon dietas basales sorgo+soya (Cuadro 1) a la cual se le adicionaron los aditivos en estudio y considerando 3 fases de alimentación; Iniciación (1-21 días de edad), Crecimiento (22-35 días de edad) y Finalización (36-49 días de edad). Los

tratamientos quedaron distribuidos de la siguiente manera: T1 = Dieta basal sorgo-pasta de soya sin promotor de crecimiento; T2 = Como 1 + bacteriófagos 500 g/Tonelada (bacteriophage<sup>1</sup>); T3 = Como 1 + bacitracina 300 g/Tonelada (bacitracina zinc<sup>2</sup>); T4 = Como 1 + *Bacillus subtilis* 100 g/Tonelada (Baymix<sup>3</sup>); T5 = Como 1 + simbiótico 500 g/Tonelada (Poultry star<sup>4</sup>). El agua y alimento se ofrecieron *ad libitum*. La composición de las dietas basales experimentales se muestra en el cuadro 1. Todos los aditivos fueron productos comerciales en forma de polvo y fueron agregados a las dietas en los niveles recomendados por las empresas que los producen: <sup>1</sup>bacteriophage®, con títulos de cada bacteriófago de 10<sup>9</sup> PFU/g de coctel (500 ppm). Este producto fue obtenido de una compañía fabricante de aditivos (CTC Bio Inc., Seúl, República de Corea) que incluye un coctel de bacteriófagos liofilizados específicos para *Salmonella enterica* serovariedades Typhimurium, Enteritidis, Cholerasuis y Derby, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (k88, k99 y f41) y *Clostridium perfringens* tipo A y C. Estos bacteriófagos son aislados de muestras de agua, suelo y desechos de granja y su actividad antibacterial fue confirmada por un ensayo de placa convencional; <sup>2</sup>bacitracina zinc (30 ppm) equivalente a 100 g de bacitracina zinc® por Ton de alimento; <sup>3</sup> Baymix®Grobig™ BS, con concentraciones de *Bacillus subtilis* 1x10<sup>10</sup> cfu/g (100 ppm); <sup>4</sup>Poultry star®Biomim, polvo blanquecino conteniendo un probiótico multiespecie; 1 x 10<sup>9</sup> UFC/g *Lactobacillus salivarius*, 3 x 10<sup>10</sup> UFC/g *Enterococcus faecium*, 5 x 10<sup>9</sup> *Bifidobacterium animalis*, 1.3 x 10<sup>10</sup> *Pediococcus acidolactici*, 1 x 10<sup>9</sup> UFC/g *Lactobacillus reuteri*, incluyendo un prebiótico, la inulina (500 ppm).

#### **6.4. CARACTERÍSTICAS PRODUCTIVAS Y DE LA CANAL**

Se pesaron a los pollos semanalmente, también se llevaron registros de consumo de alimento, conversión alimenticia y porcentaje de mortalidad. A los 49 días de crianza, se seleccionaron 26 aves por tratamiento, se identificaron, se pesaron y se sacrificaron con previo ayuno de 8 h. Cada ave se sometió al protocolo de la sala de sacrificio; 1) Colgado en ganchos de la cadena transportadora; 2) Insensibilización, por medio de un aturdidor comercial bajo los parámetros de 25 V, 0.25 A y 460 Hz de corriente directa del tipo pulsátil; 3) Desangrado por corte unilateral en cuello, durante 2 minutos;

4) Escaldado en tanque con agua a 53°C durante un minuto; 5) Desplume mecánico y 6) Evisceración, para lo cual se realizó manualmente haciendo un corte circular de la cloaca y haciendo un segundo corte perpendicular a dicho corte para facilitar la extracción de las vísceras, de las cuales se obtuvo su peso. Al instante se recolectó y peso también la grasa abdominal, localizada cerca de la cloaca. Enseguida se obtuvieron los pesos de la canal caliente eviscerada (sin cabeza y sin patas) y canal fría. De esta última se obtuvieron cortes primarios, pechuga (*Pectoralis major*) y piernas unidas a los muslos. También se contempló el rendimiento de la grasa abdominal Para cada caso se pesaron 16 piezas por tratamiento, La pigmentación (amarillamiento) de la zona aptérica izquierda de la piel de la pechuga, se determinó en pollo vivo y en canal (caliente y fría) utilizando un fotocolorímetro de reflectancia Minolta CR 400®. El sacrificio de las aves se llevó a cabo en el rastro tipo comercial perteneciente a dicho centro.

## **6.5. MORFOLOGÍA INTESTINAL**

Al día 49, se seleccionaron 10 pollos por tratamiento, que fueron sacrificados, se les retiró el tracto intestinal desde el final del ventrículo hasta el recto de manera aséptica. Se pesó el intestino delgado, así como cada porción de este (duodeno, yeyuno e íleon) y se midieron con una cinta métrica: el duodeno, desde su abertura craneal de la molleja hasta la porción final de su asa ascendente distal; el yeyuno desde el final del asa ascendente duodenal hasta el divertículo de Meckel; y el íleon desde dicho divertículo hasta la abertura (unión) de los ciegos (Alshamy *et al.*, 2018; Riahi *et al.*, 2020). De esta manera, todo el intestino delgado, fue medido desde el sitio donde emerge después de la molleja hasta el inicio de la unión de los ciegos (Zavarize *et al.*, 2012). Se incluyó además el peso y la longitud de ambos ciegos. La masa intestinal por unidad de longitud (g/cm) definida como “densidad intestinal” fue calculada mediante la relación entre el peso absoluto en gramos y la longitud en centímetros del intestino delgado (g/cm) de acuerdo con Alshamy *et al.* (2018) y Riahi *et al.* (2020).

## **6.6. PREPARACIÓN HISTOLÓGICA DEL INTESTINO DELGADO**

Al día 35 y 49, de cada tratamiento se sacrificó un pollo por réplica (8 pollos en total por tratamiento; 4 hembras y 4 machos) y se retiró el tracto intestinal completo desde el final del proventrículo hasta el recto, de manera aséptica. Se obtuvieron muestras de aproximadamente de 2 cm de largo; 1) segmento del asa descendente del duodeno; 2) segmento del yeyuno hasta 1 cm posterior al remanente del divertículo de Meckel; y 3) segmento de íleon, a 1 cm anterior al inicio de los ciegos. Las muestras fueron lavadas con solución salina al 0.9% y se fijaron en formalina amortiguada (phosphate-buffered formalin) al 10% por un periodo mínimo de 24 horas a 4°C en muestras de pollos a los 35 d de edad y usando solución de Bouin en muestras de pollos de 49 d de edad, esto último conforme a lo descrito por Laudadio *et al.*, 2012; posteriormente se procesaron mediante técnicas histológicas de rutina, inclusión en parafina, corte transversal de los segmentos a 5  $\mu\text{m}$  de espesor empleando para ello un microtomo. Posteriormente se emplearon dos tinciones, hematoxilina-eosina (HE) y PAS-AB (Alcian Blue/Periodic Acid-Schiff); la primera tinción fue usada para la evaluación histométrica y parámetros histológicos ISI, mientras que la tinción PAS-AB fue usada en el conteo de células caliciformes de las laminillas de intestino delgado (Setiawan *et al.*, 2018). 10 vellosidades bien orientadas y 10 criptas de Lieberkühn fueron medidas por sección de cada segmento intestinal. Todas las observaciones y mediciones fueron realizadas con un microscopio óptico (LEICA MC170HD®). Las preparaciones y lecturas histológicas se realizaron en el Departamento de Patología de la FMVZ – UNAM.

## **6.7. HISTOMETRÍA INTESTINAL.**

Las observaciones fueron hechas usando un microscopio óptico, con los objetivos 10x y 40x, determinando las siguientes variables: Largo de las vellosidades intestinales (LV en  $\mu\text{m}$ ), Ancho de las vellosidades intestinales (AV en  $\mu\text{m}$ ), Área de las vellosidades intestinales ( $\text{mm}^2$ ), Profundidad de criptas de Lieberkühn (PC en  $\mu\text{m}$ ). La medición del LV se realizó desde la punta (ápice) de la vellosidad a la región de transición de la cripta y la vellosidad (Setiawan, *et al.*, 2018). El AV fue medido como el promedio del ancho en el primer tercio y el segundo tercio de la vellosidad. La medición de la PC se

tomó desde la base de la vellosidad a la submucosa. El área aparente de la vellosidad ( $\text{mm}^2$ ), fue calculada usando la siguiente fórmula:  $\text{Area de vellosidad} = (\text{AV primer tercio} + \text{AV segundo tercio}) \times 2^{-1} \times \text{LV}$ , usada por Laudadio *et al.*, 2012. La relación entre la altura de la vellosidad y la profundidad de la cripta fue calculada mediante la siguiente fórmula:  $\text{V:C} = \text{LV} \times \text{PC}^{-1}$ . Para el conteo de células caliciformes, se obtuvo el promedio y la densidad se calculó por cada 100 células epiteliales (Sun *et al.*, 2013).

## 6.8. CAMBIOS HISTOLÓGICOS INTESTINALES

Se evaluaron 3 parámetros histológicos (hiperplasia epitelial, hiperplasia de células caliciformes e infiltración inflamatoria de la lámina propia por linfocitos) que fueron adaptados a lo descrito por Kraieski *et al.* (2017) y Belote *et al.* (2018), en su metodología ISI (I See Inside).

En esta metodología, un factor de impacto (FI) es definido para cada alteración histológica en intestino, de acuerdo con la reducción en la capacidad funcional considerando 3 características con factor de impacto 1, 2 y 3 según el mismo autor; Proliferación de enterocitos (FI = 1), Proliferación de células caliciformes (FI = 2), Infiltración inflamatoria en la lámina propia (FI = 3). El FI = 3 es el de mayor impacto sobre la función orgánica. Asimismo, se consideró el grado de intensidad o frecuencia observada, designado como “score” de la alteración en cada tejido calificando desde 0 a 3: 0 (ausencia de alteración o frecuencia observada), 1 (alteración hasta del 25% del área o frecuencia observada), 2 (alteración del 25 al 50% del área o frecuencia observada) y 3 (alteración extendida en más del 50% del área o frecuencia observada). Para obtener el valor final del índice ISI, el FI de cada alteración fue multiplicado por el score respectivo, y el resultado de todas las alteraciones son sumados de acuerdo con la fórmula  $\text{ISI} = \sum (\text{FI} \times \text{S})$ , donde FI = factor de impacto y S = Score. Para nuestra escala de evaluación el resultado total va de 0 a 18 según el Cuadro 2.

## 6.9. CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE ENTEROBACTERIAS ESPECÍFICAS

**Obtención de contenido intestinal para PCR.** Al día 49 se sacrificaron 8 pollos por tratamiento, de los cuales se colectaron muestras de contenido ileal y cecal. En cada caso se extrajo el contenido ileal/cecal y se depositó de manera individual en frascos viales estériles, tipo eppendorf de 2 ml para ser refrigerados inmediatamente en hielo seco, previa identificación. Una vez en el laboratorio, las muestras se refrigeraron por un máximo de 1.5 h y se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la extracción del DNA. Las pruebas de bacteriología se realizaron en el Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la FMVZ - UNAM.

**Protocolo de extracción de DNA en contenido ileal y cecal.** El procedimiento realizado fue una adaptación del método de Wilson (1997). Para ello, 200 mg de contenido cecal congelado se suspendió en 1 mL de PBS (phosphate buffered saline), se homogeneizó y centrifugó a 2000 rpm por 10 min a temperatura ambiente (TA). Se desechó el sobrenadante y la pastilla se suspendió en 567  $\mu\text{L}$  de buffer de TE (Tris/EDTA) y se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de lisozima (10 mg/mL) y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 min. Pasado este tiempo se añadieron 30  $\mu\text{L}$  de SDS (sodium dodecyl sulfate) al 10% y 4  $\mu\text{L}$  de proteinasa K (20 mg/mL) y se incubó por 1 h a  $56^{\circ}\text{C}$ . Pasado este tiempo, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de NaCl 5 M y luego 100  $\mu\text{L}$  de una solución de CTAB/NaCl y se incubó por 10 min a  $65^{\circ}\text{C}$ , posteriormente se añadieron 80  $\mu\text{L}$  de cloroformo/alcohol isoamílico y se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min. Se tomó el sobrenadante (600  $\mu\text{L}$ ) sin tocar la interfase. Se igualó el volumen con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (PCIA). Después del centrifugado (14000 rpm por 10 min), se obtuvieron tres fases: fase orgánica (precipitado), interfase (proteínas) y fase acuosa (sobrenadante con el DNA). Únicamente se tomó la fase acuosa (500  $\mu\text{L}$ ). Se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo, se mezcló y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14000 rpm por 15 min y se recuperó el sobrenadante. Luego se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol frío, se mezcló y se incubó en congelación por 24 h. Después se centrifugó a 14000 rpm por 10 min y se decantó el isopropanol. Se hicieron dos lavados con 300

μL de etanol frío al 70% para remover los residuos del fenol, cloroformo y sales, centrifugando a 10000 rpm por 5 min. Se removió el etanol y se dejó secar la pastilla de ADN a temperatura ambiente durante 30 minutos. Por último, se suspendió la pastilla en 100 μL de agua grado biología molecular (libre de DNasa/RNasa) y se congeló hasta cuantificar el DNA por espectrofotometría usando un equipo Nanodrop 2000® (Thermo Scientific).

**Procedimiento PCR tiempo real.** En una Campana de bioseguridad Logic®, se preparó un volumen total de 20 μL de la mezcla de reacción conteniendo: 10 μL de reactivo Kappa Sybr Fast® (enzima FAST DNA polymerase), 0.8 μL de primers liofilizados (forward y reverse) de la bacteria a cuantificar (cuadro 3), 2 μL de DNA de la muestra de contenido (ileal/cecal) y 7.2 μL de agua grado Biología Molecular. Cada muestra de DNA se realizó por triplicado y una vez preparadas todas las muestras de reacción, se trasladaron a un termociclador Rotor Gene Q® con rotor tipo centrifuga para el proceso de amplificación del DNA. Las condiciones de amplificación se establecieron conforme las indicaciones del kit comercial del reactivo Kappa Sybr®: Activación de enzima, 95°C x 3 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización, 95°C x 1-3 seg y Extension, 60°C x 10 seg. Las secuencias de primers fueron obtenidos de artículos científicos relacionados con las bacterias de interés, adquiridos en Sigma Aldrich®, y mostradas en el cuadro 3.

**Método de cuantificación de la expresión genética con PCR en tiempo real.** Los números de ciclos en los cuales la curva de fluorescencia atraviesa el umbral establecido corresponden a los valores Ct que se utilizaron en los cálculos posteriores (Vinueza, 2009). Los valores Ct obtenidos de la amplificación, se utilizaron para analizar la expresión relativa de genes usando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001; Tan 2014), y el valor promedio de  $\Delta Ct$  de la muestra pool sirvió como calibrador de cada muestra. El tratamiento control se designó con un valor = 1 y el resto de los tratamientos se compararon con respecto al grupo control.

## 6.10. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados de los parámetros productivos, variables histométricas y cambios histológicos intestinales, así como la cuantificación relativa de enterobacterias específicas se analizaron mediante un diseño completamente al azar, conforme al siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ik} \quad i = \text{Tratamientos (1, 2, 3, 4, 5)}$$

$$k = \text{Réplicas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)}$$

En donde:

$Y_{ijk}$  = Valor de las variables de respuesta (características productivas y de la canal, morfología intestinal, cambios histológicos).

$\mu$  = Media general.

$\tau_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento (dieta sin aditivos y dieta con aditivos)

$\epsilon_{ik}$  = Error experimental.

Las variables de respuesta fueron analizadas mediante un análisis de varianza de un solo factor (one way ANOVA). En cada caso se realizó previo análisis de los supuestos de normalidad (prueba de Shapiro-Wilk), homocedasticidad (prueba de Levene) e independencia. La comparación de medias fue realizada usando la prueba de Tukey, considerando una significancia del 1% y 5%. Las variables expresadas en porcentaje fueron transformadas a un valor angular para su análisis, usando la fórmula de arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción. Además, los valores de la cuantificación relativa de enterobacterias fueron transformadas a logaritmo base 10 respectivamente, previo al análisis. Se fijó un umbral mínimo de significatividad de incremento en 2 (el nivel de expresión genética es 2 veces más que el grupo control) con  $p < 0.05$ . La prueba estadística Mann-Whitney fue realizada cuando los datos no tuvieron distribución normal. Todos los análisis estadísticos fueron ejecutados usando el software SPSS (versión 17) (Chicago, IL, USA), con la asistencia del software GraphPad Prism (versión 4.00; GraphPad Software, San diego, CA).

## 7. RESULTADOS

**Características productivas y de la canal.** En cuanto a los parámetros productivos no se encontraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) de 0 a 35 d para consumo de alimento, ganancia de peso, índice de conversión y mortalidad. Al día 49, se obtuvo una mayor ganancia de peso ( $P<0.01$ ) y un menor índice de conversión ( $P<0.01$ ) en los pollos que recibieron el antibiótico y los aditivos eubióticos, incluyendo los bacteriófagos (Cuadro 4). Respecto al consumo de alimento, mortalidad total y uniformidad (% CV), no se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $P>0.05$ ) entre tratamientos, tal como se observa en el cuadro 4. En las características de la canal (cuadro 5), los pollos alimentados con dietas sorgo-soya adicionadas con antibiótico (bacitracina) y eubióticos mostraron un mayor peso y rendimiento ( $P<0.05$ ) de la canal, aunque, sin diferencias estadísticas ( $P>0.05$ ) para el rendimiento de pechuga, piernas con muslos y grasa abdominal. El amarillamiento en piel de los pollos, tanto en pollo vivo como en canal, no mostró ( $P>0.05$ ) diferencias estadísticas entre tratamientos (cuadro 6 y 7). También sin diferencias entre tratamientos, para el peso y rendimiento de hígado (Cuadro 8).

**Morfología e histometría intestinal.** No se registraron diferencias estadísticas significativas al día 21 respecto al peso, longitud y densidad intestinal total (g/cm), excepto en íleon que la densidad fue mayor ( $P<0.01$ ) para los pollos que recibieron antibiótico y menor ( $P<0.01$ ) para los del grupo control (Cuadro 9). A los 49 días, se encontró una densidad intestinal mayor ( $P<0.01$ ) en el grupo control y el antibiótico, y menor densidad ( $P<0.05$ ) en los pollos que recibieron *B. subtilis*. (Figura 1). La densidad intestinal reportada en yeyuno e íleon, fueron determinantes en lo encontrado en densidad intestinal total (g/cm) (Cuadro 9). Respecto a la altura de las vellosidades intestinales a los 35 d fue mayor ( $P<0.05$ ) en yeyuno cuando se suplementó con el simbiótico (Cuadro 10). Asimismo, a los 49 d, las vellosidades mostraron una tendencia a mejorar con el uso de los aditivos, siendo el probiótico y el simbiótico los que obtuvieron una mayor ( $P<0.01$ ) altura y ancho de la vellosidad en el duodeno, siendo el grupo control con el menor ( $P<0.01$ ) valor para estas características. Respecto al

área aparente de la vellosidad en duodeno, fue mayor ( $P<0.01$ ) en los pollos tratados con aditivos eubióticos (cuadro 10 y figura 2). Para el yeyuno, la altura de vellosidad, área de la vellosidad y la profundidad de las criptas fueron mayores ( $P<0.05$ ) en los pollos suplementados con el probiótico. En íleon la altura y área de la vellosidad fueron mayores ( $P<0.05$ ) para el grupo control.

Se encontró un mayor ( $P<0.01$ ) número de células caliciformes en duodeno de los pollos alimentados con los bacteriófagos y un menor ( $P<0.01$ ) número de estas células en los pollos suplementados con el antibiótico y el probiótico (cuadro 11). En yeyuno no se registraron cambios y en íleon, nuevamente los pollos que recibieron bacteriófagos y el grupo control resultaron con mayor ( $P<0.01$ ) número de células caliciformes que el resto de los tratamientos. En las figuras 6 y 7 se observan las vellosidades medidas en duodeno, yeyuno e íleon a los 21 y 49 d de edad en pollos tratados con los diferentes tratamientos.

**Cambios histológicos intestinales.** Respecto al score histológico (Cuadro 12), a los 35 días de edad de edad, el grupo control, obtuvo el menor score ( $P<0.01$ ) en los tres segmentos intestinales, en la misma forma que los pollos tratados obtuvieron el mayor ( $P<0.01$ ) score en duodeno, yeyuno e íleon. A los 49 días el grupo control mantuvo su posición con un menor ( $P<0.05$ ) score histológico en duodeno y yeyuno. También a los 49 d, se encontró un mayor ( $P<0.01$ ) score ISI en duodeno cuando se utilizaron los aditivos en las dietas para pollos de engorda con una tendencia a disminuir el score histológico en yeyuno e íleon. Para el caso de los pollos con dietas suplementadas con bacteriófagos mantuvieron un mayor ( $P<0.05$ ) score en cada uno de los segmentos intestinales a los 49 d de edad. El score total ISI de los cambios histológicos en duodeno a los 49 d de edad, fue mayor para los pollos que fueron suplementados con el antibiótico y los eubióticos, incluyendo los bacteriófagos (Figura 3). Este resultado se vio influenciado por el incremento en la hiperplasia de células caliciformes e infiltración de células inflamatorias la lámina propia, en duodeno, mostrado en el cuadro 13, donde se puede observar que, para estas 2 características, el grupo control fue el que obtuvo el menor puntaje. En la figura 8 se muestran los parámetros

histológicos intestinales que fueron considerados en el ISI score histológico de acuerdo con la alteración (hiperplasia epitelial, hiperplasia de células caliciformes e infiltración inflamatoria).

**Expresión relativa de enterobacterias.** Con relación a la expresión relativa de las enterobacterias determinadas por PCR en tiempo real en íleon (figura 4), *E. coli* se incrementó más ( $P < 0.05$ ) de 5 veces al utilizar dietas suplementadas con antibiótico. *L. reuteri* fue incrementado más ( $P < 0.05$ ) de 15 veces al suplementar las dietas con antibiótico y probiótico. Sin cambios ( $P > 0.05$ ) para *B. animalis* entre el grupo control y el resto de los tratamientos. Para el caso de *E. coli*, en ciego (figura 5), no se observó diferencias ( $P > 0.05$ ) entre el grupo control y los demás tratamientos a los 21 d de edad. A los 49 d, se registró un incremento ( $P < 0.05$ ) de 3 (2.9) veces más en su nivel de expresión al usar bacteriófagos y sin diferencias significativas con los otros tratamientos respecto al grupo control. Para *C. perfringens* (gen aflatoxina) se sobreexpresó 7.3 veces más ( $P < 0.05$ ) al adicionar el probiótico *B. subtilis* que el grupo control a los 49 d de edad y sin cambios a los 21 d. En relación con *L. salivarius* el uso del simbiótico permitió un incremento de 2 veces más el valor respecto al grupo control, sin embargo, no hubo diferencias estadística ( $P > 0.05$ ) a los 21 y a los 49 d de edad.

## 8. DISCUSIÓN

**Características productivas y de la canal.** De acuerdo con diferentes investigaciones, el rendimiento productivo de pollos de engorda suplementados con aditivos eubióticos, pueden ser equiparables a lo obtenido con los APC (Pelicano *et al.*, 2005; Mountzouris *et al.*, 2010; Ghazanfari *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2017; Hussein *et al.*, 2020), aunque de acuerdo con otros autores, estos aditivos no cubren los beneficios económicos y productivos de un APC (Pedroso *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2014; Oviedo-Rondón, 2019). En el presente estudio se optimizó en un 5% el índice de conversión al utilizar un antibiótico y aditivos eubióticos, parecido a lo que Gao *et al.* (2017), reportaron al obtener una mejoría del 5.9% en el índice de conversión al

utilizar un probiótico (*L. plantarum*) frente una combinación de antibióticos. En otros planteamientos, en los que se realizaron desafíos con *C. perfringens*, fue posible contrarrestar sus efectos al utilizar esporas de *Bacillus* (géneros *subtilis* y *licheniformis*) y un compuesto fitobiótico en dietas de pollos Ross 308, lo que permitió lograr una GP e IC similar al grupo tratado con un antibiótico (avilamicina) (Hussein *et al.*, 2020). De igual forma Whelan *et al.* (2019), pese al doble desafío con *Eimeria maxima* y *C. perfringens*, obtuvieron el mismo peso que el grupo no desafiado y el que recibió el antibiótico, al utilizar *B. subtilis*. Con este último, el IC fue mejor que el obtenido con el antibiótico. En el tema de los BF, se ha podido corroborar que es posible obtener un mejor IC en las aves que se han suplementado con este aditivo, incluso con un rendimiento productivo mayor al obtenido con un antibiótico (Sarrami *et al.*, 2022) o con un probiótico (Kim *et al.*, 2014).

El rendimiento de la canal mejoró con el uso del antibiótico, y en cierta forma con la adición de los eubióticos, frente al grupo control, parecido a lo reportado por Akhulaifi *et al.* (2022) quienes después desafiar a pollos con *S. typhimurium* y *C. perfringens*, y adicionar paredes celulares de *S. cerevisiae* (ricas en B-glucano y MOS), mejoraron el rendimiento de la canal a los 35 d de edad. En grasa abdominal no hubo diferencia entre tratamientos, a diferencia de Khoobani *et al.* (2019) que reportaron disminución de grasa abdominal (%) y disminución sérica de lipoproteínas de baja y alta densidad (LDL y LHD, por sus siglas en inglés), al adicionar achicoria (0.10, 0.15 y 0.20% de inclusión) en la dieta de pollos Ross308. Respecto a la mortalidad, aunque no disminuyó usando aditivos eubióticos en esta investigación, se sabe que en pollos desafiados con *Salmonella spp.* y *C. perfringens* esta se redujo usando *B. subtilis* como probiótico (Whelan *et al.*, 2019; Alkhulaifi *et al.*, 2022).

**Morfología intestinal.** En la evaluación morfológica intestinal, la densidad del intestino delgado (g/cm), fue mayor en el grupo control, mostrando una disminución con el uso de los eubióticos, sobretodo con *B. subtilis*. El aumento de la densidad o masa intestinal puede estar relacionado a cambios, en la capa mucosa intestinal, que en mamíferos representa un valor cercano al 50% del grosor del intestino (Di Donato *et*

*al.*, 2014) alcanzando un 80% en las aves, dado que sus vellosidades suelen ser más altas que en los mamíferos (Fernandes 2014; Smyth, 2016; Tang *et al.*, 2020). Riahi *et al.* (2020) al utilizar un metabolito de micotoxina en pollos de engorda, observaron una menor densidad intestinal derivado, según sus conclusiones, de una menor altura de las vellosidades. Ravindran y Abdollahi (2021) establecieron que, aunque el tamaño relativo del intestino disminuye con la edad, este es compensado con el incremento de la masa intestinal (g/cm) para mantener el suministro de nutrientes a los tejidos, lo que supondría un aumento en la altura de las vellosidades, por lo mencionado antes. Si fuera el caso, en el presente estudio donde las aves control, obtuvieron una mayor densidad intestinal y una menor altura de vellosidades, la densidad podría estar relacionada con la capa muscular. Wu *et al.* (2021) explicaron que la disminución en pH (ciego) y en viscosidad (yeyuno) al usar un simbiótico, resultó en un menor grosor de la túnica muscular del intestino, y mayor altura de vellosidad, lo cual suena más parecido a lo obtenido con los eubióticos, sin embargo, no se tiene el valor de esos parámetros. Ghazanfari *et al.* (2015) indicaron que un menor grosor epitelial, una menor densidad de células globosas y un menor grosor de la túnica muscular no afecta la altura de las vellosidades para permitir una adecuada funcionalidad intestinal.

En ocasiones, los cambios en el grosor intestinal son debido a la atrofia de vellosidades y adelgazamiento de la túnica muscular, lo que macroscópicamente permite ver más traslúcida la pared intestinal, considerado como parámetro de evaluación en la disbacteriosis, según lo indicado por Teirlynck *et al.* (2011). Esta disbacteriosis debida a una infección aguda o daño tisular se manifiesta como una inflamación patológica, que cuando el sistema inmune del ave responde adecuadamente únicamente prevalece la inflamación fisiológica (Kogut *et al.*, 2018). Al parecer el grosor de las túnicas del intestino guardan una relación con su funcionalidad, aunque no siempre son buenos indicadores. Cardinal *et al.* (2019) al evaluar la suplementación con una proteasa, plantearon que la reducción en el grosor de la lámina propia y el epitelio superficial permitió que los nutrientes sean transportados más fácilmente, mejorando su absorción. Si la absorción de nutrientes se vio favorecida con el uso de los eubióticos, es posible que en el grupo control, existió una mayor cantidad de nutrientes

sin digerir en el lumen intestinal, lo que pudo hacer más viscoso el moco, con ello, más denso el tejido, y producir una mayor densidad intestinal.

**Histometría intestinal.** La medición de las vellosidades intestinales en duodeno arrojó una mayor altura y área de estas, al suplementar las dietas de pollos, con el probiótico y el simbiótico (Apajalahti y Vienola, 2016). Esto permite explicar el mejor rendimiento de la canal observado al suplementar los aditivos eubióticos. Previamente, Markovic *et al.* (2009) reportaron un aumento en la altura y ancho de las vellosidades (duodeno, yeyuno e íleon) al utilizar un probiótico (*L. acidophilus*+*E. faecium*) y un prebiótico (MOS) respecto al grupo control. Observaron, además, una disminución en la profundidad de criptas, lo cual está relacionado a un menor reemplazo de enterocitos, ante una menor demanda de regeneración celular (Hassan *et al.*, 2014; Kogut, 2019). En otro experimento, Hussein *et al.* (2020) registraron incrementos en el largo de vellosidad y su área intestinal en pollos desafiados con *C. perfringens*, al utilizar un antibiótico, un probiótico (*Bacillus* spp) y compuestos fitobióticos, superior a lo encontrado en pollos desafiados y sin aditivos. De forma semejante, Al-Sagan y Abudabos (2018) determinaron la respuesta a la adición de eubióticos (*B. subtilis*, MOS, *Bs*+MOS) sobre la morfología intestinal en pollos Ross308, tras replicar la enteritis necrótica mediante inoculación de *C. perfringens*. No registraron cambios en la densidad intestinal (g/cm), aunque si un incremento en la altura de las vellosidades en yeyuno, y en íleon, aunque en este último sólo al usar el prebiótico. En el presente estudio, la mayor altura de vellosidades para yeyuno e íleon se obtuvo con el probiótico y el grupo control, respectivamente. En el caso de los bacteriófagos, mostró ser superior en ancho y área de la vellosidad a nivel del duodeno que el grupo control. En otros estudios, el largo de vellosidad y la relación V:C, han sido superiores con el uso de BF, frente al grupo de aves sin aditivos (Zeng *et al.*, 2021; Pantoja-Don Juan *et al.*; 2022; Sarrami *et al.*, 2022). De hecho, la relación V:C, al menos en duodeno, fue mayor con el uso de BF. No obstante, el largo de vellosidad puede poseer un mejor coeficiente de variación (12.93 vs 25.60 %) respecto al V:C (Ringenier *et al.*, 2021), lo que significa que el largo de vellosidad es un indicador más confiable para referirnos a funcionalidad intestinal, aunque no siempre se refleja en el peso, como Bogucka *et al.* (2019) que no

registraron un mayor peso vivo pese a lograr una mayor altura de vellosidades en duodeno, yeyuno e íleon al adicionar un probiótico.

**Cambios histológicos intestinales.** Al analizar el score histológico basado en los cambios epiteliales (hiperplasia epitelial y de células caliciformes) e infiltración inflamatoria de la lámina propia, se obtuvo en duodeno un score total que fue mayor al usar el antibiótico y los eubióticos, incluyendo a los BF, como suplementos respecto al grupo control. Para el caso del yeyuno, solo el grupo tratado con BF, mostraron un score mayor y para el íleon, el grupo de aves que fueron suplementados con el simbiótico resultó con un score menor comparado al resto de los tratamientos. Para el caso particular del duodeno, el aumento del score ISI, se debió al incremento en la proliferación de células caliciformes y la infiltración inflamatoria de la lámina propia (IILP). Se sabe que la hiperplasia de células caliciformes puede ser inducida por bacterias benéficas, tal como lo demostraron Hassan *et al.* (2014) que indicaron que el uso de probióticos estimuló una mejora en altura de vellosidad, profundidad y altura de criptas, así como una mayor cantidad de células caliciformes en la capa epitelial de las criptas, asociado a una hiperplasia activa en las vellosidades y criptas de Lieberkühn. Huang *et al.* (2019), reportaron un aumento en la expresión relativa de CLDN y la MUC2 al utilizar *E. faecium* en pollos desafiados con *E. coli*, con una reducción de esta bacteria desde el tercer día post-infección. En el presente estudio, el aumento en la hiperplasia de células caliciformes al utilizar, el antibiótico y los eubióticos, pudo deberse al aumento de bacterias benéficas, como *Lactobacillus* spp., ya que de acuerdo con Paone y Cani (2020), son bacterias que promueven la secreción y producción de MUC2. Esto se puede sustentar, ya que de acuerdo a Gurram *et al.* (2021) al realizar un experimento en pollos, observaron el efecto positivo de un antibiótico y de un aditivo herbal (polvo de achicoria, rico en inulina tipo fructanos, oligofruktosa y carbohidratos indigestibles) sobre el número de células caliciformes en duodeno, yeyuno e íleon, que fue incrementado, a la vez que se registró un aumento de *Lactobacillus*, sobre todo con el 1 y 1.5% del aditivo herbal, y un reducido conteo de UFC/g de *E.coli* y *Salmonella*. Se sabe que la prioridad a nivel del duodeno no es la producción de moco sino la absorción de nutrientes (Duangnumsawang *et al.*, 2021),

sin embargo, debe haber un límite en la proliferación de células caliciformes aún no determinado, y que pueda explicar ese incremento cuando se utilizaron los eubióticos y que finalmente afectó positivamente la productividad.

Ghazanfari *et al.* (2015), reportaron un aumento en la altura de las vellosidades y profundidad de criptas al suplementar dietas con antibiótico y aceite esencial de cilantro, sin embargo, observaron una disminución en el grosor de la capa epitelial y el número de células caliciformes/ $\mu\text{m}^2$  en las vellosidades, respecto al grupo control, lo cual coincide con el conteo de células caliciformes, no así cuando se hace la evaluación histológica de la hiperplasia de células caliciformes en cada tratamiento. Por otro lado, Hussein *et al.* 2020, observaron que el uso de aditivos (antibiótico, dos probióticos y su combinación) en pollos desafiados con *E. coli*, redujeron notablemente el score de las lesiones a nivel de hígado e intestino, observando en este último, hiperplasia epitelial y moderada metaplasia del epitelio intestinal a células caliciformes, registrando regeneración intestinal al utilizar *B. subtilis*. Wu *et al.* (2019) demostraron también, que, bajo cierto desafío intestinal con pérdida de funcionalidad del epitelio intestinal, el uso de *E. faecium*, pudo mejorar la proliferación celular, similar a lo observado por Al-Sagan y Abudabos (2018) que al desafiar pollos de engorda con *C. perfringens*, observaron que el uso de eubióticos redujo la severidad de las lesiones en intestino delgado, describiendo que las aves que no recibieron tratamiento mostraron descamación epitelial, metaplasia a células caliciformes y depleción de leucocitos en el GALT.

Sanches *et al.* (2020) describió la presencia de una enteritis proliferativa microscópica, en pollos infectados y no infectados, con *Eimeria* spp. y *C. perfringens*, evaluando parámetros ISI, sugiriendo con sus resultados que el pollo puede desarrollar en algún momento de su vida, un tipo de enteritis basal microscópica, aun sin un desafío. Esta enteritis, en pollos sanos, fue asociada a lo observado en la expresión de un incremento en CD4+ y aumento en el grosor e inflamación de la capa epitelial y la lámina propia. En los pollos desafiados, el grosor de la capa epitelial y la congestión lo describieron como parte de una inflamación patológica derivado del desafío y, de

hecho, influyó en los parámetros productivos, aun cuando no se desarrollaron todas las lesiones comunes de la enteritis necrótica. En el presente estudio, los resultados apuntaron al desarrollo de cierto grado de inflamación al utilizar los eubióticos, que se presume, fue del tipo fisiológica, o como describe Sanches *et al.* (2022), una enteritis basal microscópica, dado que el rendimiento productivo fue mejor al usar estos aditivos frente al grupo control, que aun cuando se contraponen a la afirmación de que a mayor score ISI intestinal, menor productividad y a menor score ISI mayor productividad, lo cierto es que los resultados de la evaluación del presente estudio sólo fueron basados en 2 categorías (infiltración de células inflamatorias y cambios epiteliales), lo cual puede ser un resultado parcial en la evaluación histopatológica de la inflamación intestinal, que contempla una tercer categoría (arquitectura de la mucosa), que a futuro deberá complementarse para verificar lo mencionado. Del grupo control, podría suponerse un cierto tipo de inflamación, si comparamos los resultados de la primera evaluación ISI a los 21 d con la de los 49 d.

Contrario a lo estudiado, Belote *et al.* (2018) indicaron que el uso de un antibiótico (enramicina) redujo el score ISI histológico en íleon en pollos Cobb500, luego de ser desafiados con *Eimeria spp.* (vacuna) y *C. perfringens*. En este caso, *C. perfringens*, incrementó la infiltración inflamatoria de la lámina propia y la infiltración epitelial. En todo esto, algo importante es que el aumento en la proliferación de células calciformes es un efecto positivo que favorece el mantenimiento y la protección para favorecer una adecuada morfología de las vellosidades intestinales, que implican una mejor absorción y digestión, tal como fue descrito por Izadi *et al.* (2013) al observar cambios positivos inducidos por un prebiótico (polvo raíz achicoria) en yeyuno de pollos. La infiltración linfocitaria de la lámina propia al adicionar los bacteriófagos y los otros aditivos, que fue mayor al grupo control, es un variable que Sanches *et al.* (2022) midieron en el íleon, en pollos desafiados y no desafiados (mencionado previamente), sin embargo, el aumento de la infiltración en la lámina propia y el epitelio, no se vio reflejado en un aumento del grosor de la lámina propia a los 28 d, que por el contrario fue disminuyendo conforme la infiltración aumentaba. Al medir por inmunohistoquímica los macrófagos, TCD4+ y TCD8+, sólo TCD4+ aumentó a los 21 d a nivel de íleon y

TCD8+ e IL-10 a nivel hepático. Esto puede sugerir que los eubióticos modularon la inflamación, puesto que no se observó cambios en la hiperplasia epitelial, recurrente ante desafíos (Sanches *et al.*, 2022), lo que no impidió obtener un buen rendimiento productivo.

**Conteo de enterobacterias en íleon y ciego.** Al evaluar el contenido de enterobacterias en íleon, los pollos que recibieron el antibiótico tuvieron una expresión relativa de *E. coli* mayor al grupo control, así como la expresión de *L. reuteri* fue mayor al utilizar el antibiótico y el probiótico (*B. subtilis*), también, respecto al grupo control. El antibiótico utilizado en este experimento, Bacitracina zinc, tiene dentro de su espectro de acción a bacterias grampositivas como el *C. perfringens*, lo que puede explicar el incremento en *E. coli* (Rahman *et al.*, 2010). En cuanto al uso de *Bacillus subtilis*, Oh *et al.* (2017) determinaron que esta bacteria probiótica cambió la composición y diversidad microbiana en pollos de engorda por incremento de microorganismos benéficos (*Lactobacillus spp.*), y con protección contra la infección por *Salmonella*. Al-Khalaifah (2018) describieron, que *B. subtilis* produce un péptido llamado subtilisina y así como una enzima (catalasa), que facilitan el crecimiento de otros organismos probióticos como *L. reuteri*. Por otra parte, el uso de BF (anti-*Salmonella* y anti-*E. coli*) mostraron que puede aumentar la población de *Lactobacillus* y disminuir bacterias coliformes en íleon, cuando se incrementó su dosis a 1 y 1.5 g BF/kg (Sarrami *et al.*, 2022). En ese aspecto, los BF no mostraron algún cambio a nivel de íleon, en el presente estudio.

En el caso del ciego, la expresión relativa de *E. coli* no mostró cambios a los 21 d de edad, sin embargo, a los 49 d, la *E. coli* mostró mayor expresión en los pollos suplementados con bacteriófagos. Para *Clostridium perfringens* la expresión relativa fue mayor al usar el probiótico respecto al grupo control a los 49 d de edad, así como *Lactobacillus salivarius* fue mayor al utilizar el simbiótico, respecto al grupo control, y aunque en este último caso no fue significativo, la expresión relativa de *L. salivarius* se expresó casi 2 veces más que en el grupo control, a los 21 y a los 49 días. La prueba realizada de PCR en tiempo real no discrimina la presencia de bacterias viables,

muertas o inactivadas, de tal forma, que la expresión relativa de *E. coli* con el uso de BF, pudo indicar la cantidad de bacterias afectadas por el BF específico anti-*E. coli*, dentro del coctel ofrecido. Respecto a *C. perfringens*, algunas bacterias probióticas como *L. Salivarius* y *E. faecium* pueden inhibir su crecimiento (Wu *et al.*, 2019, Yu *et al.*, 2021 y Yaqob *et al.*, 2022), e incrementar la abundancia de géneros bacterianos como, otros *Lactobacillus* y *Butyricicoccus* en el ciego, que ayudan a complicar el crecimiento de bacterias patógenas como *C. perfringens*, causante de enteritis necrótica (Wu *et al.*, 2019). El *B. subtilis* también se ha utilizado en diversos experimentos donde se ha comprobado su eficacia contra esta bacteria, causante de enteritis necrótica (Whelan *et al.*, 2019; Hassan *et al.*, 2020). Lo anterior puede suponer, para el presente estudio, un posible cambio en la microbiota al utilizar el probiótico, el simbiótico y el coctel de bacteriófagos que incluía un fago anti *C. perfringens*, no obstante, sólo el probiótico marco diferencia frente el grupo control. En el caso de la expresión de *L. salivarius*, al observar cierta tendencia a aumentar, a los 21 y 49 d de edad, puede explicarse el resultado, dado que está incluido en el simbiótico utilizado para este experimento, sin embargo, no fue significativo.

El uso de probióticos ha sido visto como una herramienta efectiva para alterar positivamente la microbiota, tal como mencionaron Gao *et al.* (2017), quienes observaron a partir del grupo control, que la maduración de la microbiota se adelantó con el uso de una cepa de *Lactobacillus plantarum*, incrementando la población de *Lactobacillus* spp., mientras que se retrasó el índice de maduración al usar antibióticos, y que se presume este último tuvo que promover el crecimiento de bacterias benéficas para que la productividad fuera mejor al grupo control, aún con dicho retraso. Oh *et al.*, 2017 concluyeron que para el establecimiento de bacterias patógenas como *Salmonella* se requiere del soporte de otros patógenos u oportunistas. Por lo anterior, se consideran de gran valor estudios donde se ha determinado la alfa diversidad (números de especies y abundancia relativa) y la beta diversidad (diferencia entre ecosistemas microbianos), buscando una perspectiva más amplia del contenido de bacterias por familia, género y especies, que permiten reflejar alguna interacción entre filos bacterianos. En esa tarea, se ha visto, que el uso de *B. subtilis*, pudo incrementar

mecanismos de suministro de energía asociado al intestino, para mantener estable a la microbiota y proteger la integridad intestinal. Al respecto, Zeng *et al.* (2021) en un estudio confirmaron ese efecto regulatorio sobre la microbiota cecal en lechones, con la aplicación de los BF, al determinar una mayor alfa-diversidad (riqueza) y mejor abundancia relativa de los géneros Firmicutes, Bacteroidetes y Tenericutes.

Los cambios observados en el score histológico sugieren que la inflamación fisiológica que es definido como una respuesta inflamatoria intestinal controlada (Cardoso *et al.*, 2020), no alcanzó el daño tisular, el cual como se ha visto, se presenta siempre que hay un desafío (ej.: bacteria patógena), por lo que se presume sólo existió una respuesta inmune “baja”, para mantener la homeostasis intestinal que acompañado por aumento de *L. reuteri* (en íleon) por uso del probiótico, aumento de *E. coli* y *C. perfringens* (presumiblemente células no viables) y aumento de *L. salivarius* en ciego, por uso de eubióticos, al final se reflejó en una mejor morfometría intestinal en duodeno e hiperplasia de células caliciformes. Algunos biomarcadores de la inflamación como proteínas de fase aguda y otros, se deben acompañar de estudios histológicos que permitan relacionarlo con alteraciones en la arquitectura intestinal, como fue realizado por Sanches *et al.* (2022). Sumado a esto, Adedokun & Olojede (2019) recomiendan inducir un mínimo de estrés intestinal para poder evaluar el efecto de alternativas a los APC, como Wu *et al.* (2019) que indicaron que mientras no indujo un desafío no hubo cambios positivos en el rendimiento productivo, además de acuerdo con Tarradas *et al.*, 2020 se ha visto que en algunos casos los mecanismos de acción de los probióticos, como *L. salivarius* y *B. animalis* cambian ante la presencia de agentes patógenos, y en situaciones particulares actuarán como proinflamatorios o como antiinflamatorios, denominados por ello inmunomoduladores.

## 9. CONCLUSIONES

El rendimiento productivo fue mejorado en un 5% (mayor PV, menor IC) al adicionar el antibiótico, los bacteriófagos, el probiótico (*B. subtilis*) y el simbiótico (*L. salivarius*, *L. reuteri*, *E. faecium*, *B. animalis* y *P. acidilactici* + Inulina) en pollos Ross308 a los 49 d de edad.

Se mejoró la histometría intestinal, largo y área de las vellosidades en duodeno con la suplementación de los eubióticos, así como en duodeno y yeyuno con el probiótico.

El score ISI histológico del intestino, mostró mayor infiltración inflamatoria de la lámina propia y mayor hiperplasia de células caliciformes en duodeno, con la adición de eubióticos, incluyendo los bacteriófagos, lo que se asoció con una inflamación de tipo fisiológica, mayor integridad intestinal y mejor absorción de nutrientes, que se expresó en mayor productividad.

La expresión relativa de algunas bacterias en íleon (*L. reuteri*) por uso de del probiótico y *Lactobacillus salivarius* en ciegos, por uso del simbiótico, concordaron con los efectos benéficos encontrados a nivel intestinal.

Los bacteriófagos demostraron un efecto benéfico al igual que el antibiótico y los eubióticos, sin embargo, hace falta más investigación sobre sus mecanismo de acción a nivel de eubiosis intestinal y su relación con la productividad.

Se demostró que el uso de los eubióticos, incluyendo los bacteriófagos, pueden sustituir a la bacitracina, como promotores del crecimiento.

## 10. REFERENCIAS

1. Abad-Guamán, R., Capa-Morocho, M., Herrera-Yunga, V., Herrera-Herrera, R., Escudero-Sanchez, G. (2017). Cambios en el microbiota intestinal de las aves y sus implicaciones prácticas. *Centro de Biotecnología*, (6): 98-108.
2. Abbas, R. Z., Alsayeqh, A. F., Aqib, A. I. (2022). Role of bacteriophages for optimized health and production of poultry. *Animals*, 12, 3378: 1-20.
3. Adedokun, S. A., Olojede, O. C. (2019). Optimizing Gastrointestinal Integrity in Poultry: The Role of Nutrients and Feed Additives. *Frontiers in Veterinary Science*, 5 : 348.
4. Ahsan, U., Kuter, E., Raza, I., Koksai, B.H., Cengiz, O., Yildiz, M., Kizanlik, P.K. *et al.* (2018). Dietary supplementation of different levels of phytogetic feed additive in broiler diets: the dynamics of growth performance, caecal microbiota, and intestinal morphometry. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 20 (4): 737-746.
5. Alaeldein, M. (2012). Effect of Primalac or Enramycin supplementation on performance, intestinal morphology and microbi... *Journal of Food Agriculture and Environment*, 10 : 595-599.
6. Al-garadi, M. A., Al-Baadani, H. H., Alqhtani, A. H. (2022). Growth performance, histological changes and functional tests of broiler chickens fed diets supplemented with *Tribulus terrestris* powder. *Animal*, 12 (15), 1930.
7. Al-Khalaifah, H. S. (2018). Benefits of probiotics and/or prebiotics for antibiotic-reduced poultry. *Poultry Science*, 0; 1-9.
8. Alkhulaifi, M. M., Alghtani, A. H., Alharti, A. S., Sulaiman, A. R. y Abudabos, A. M. (2022). Influence of prebiotic yeast cell wall extracts on growth performance, carcass attributes, biochemical metabolites, and intestinal morphology and bacteriology of broiler chickens challenged with *Salmonella typhimurium* and *Clostridium perfringens*, *Italian Journal of Animal Science*, 21 (1): 1190-1199.
9. Al-Sagan, A., Abudabos, A. M. (2018). Effect of eubiotic administration to broiler's feed on intestinal morphology and microbiology under *Clostridium perfringens* challenge. *Indian Journal Animal Research*, 52 (6): 824-828.
10. Alshamy, Z., Richardson, K. C., Hunigen, H., Hafez, H. H., Plendl, J., Al Masri, S. (2018). Comparison of the gastrointestinal tract of a dual-purpose to a broiler chicken line: A qualitative and quantitative macroscopic and microscopic study. *Tokat Gaziosmanpasa University*, 13 (10): 10-13.

11. Apajalahti, J., Kettunen, A., Graham, H. (2004). Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *World Poultry Science Journal*, 60 (2): 223–232.
12. Apajalahti, J., Vienola, K. (2016). Interaction between chicken intestinal microbiota and protein digestion. *Feed Science and Technology*, 1-11.
13. Applegate, T.J., Klose, V., Steiner, T., Ganner, A., Schatzmayr, G. (2010). Probiotics and phytogenics for poultry: myth or reality? *Poultry Science*, 19: 194-210.
14. Atterbury, R. J., Van Bergen, M. A. P., Ortiz, F., Lovell, M. A., Harris, J. A., De Boer, A. *et al.* (2007). Bacteriophage therapy to reduce salmonella colonization of broiler chickens. *Applied Environmental Microbiology*, 73 (14): 4543-4549.
15. Azabo, R. R., George, J. I., Mshana, S. E., Matee, M. I., Kimera, S. I. (2022). Farm costs and benefits of antimicrobial use reduction on broiler farms in Dar es Salaam, Tanzania. *Frontiers in Antibiotics*, 1: 1011929.
16. Bilal, M., Ashraf, S., Zhao, X. (2022). Dietary component-induced inflammation and its amelioration by prebiotics, probiotics, and synbiotics. *Frontiers in Nutrition*, 9, 931458.
17. Bogucka, J., Ribeiro, D. M., Boguslawska-Tryk, M., Dankowiakowska, A., Costa, R. P. R., Bednarczyk, M. (2019). Microstructure of small intestine in broiler chickens fed a diet with probiotic or symbiotic supplementation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 00: 1-7.
18. Bonfiglio, R., Galli, F., Varani, M., Scimeca, M., Borri, F., Fazi, S., et al. (2021). Extensive histopathological characterization of inflamed bowel in the dextran sulfate sodium mouse model with emphasis on clinically relevant biomarkers and targets for drug development. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 2028.
19. Borrueal, N. (2003). Interacciones bacterianas con el sistema inmunológico intestinal: inmunomodulación. *Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 26 (1): 13-22.
20. Brunser, O., Cruchet, S., Gotteland, M. (2013). *Fisiología gastrointestinal y nutrición*. Nestlé Chile, 331 pp.
21. Calik, A., Omara, II, White, M. B., Evans, N. P., Karnezos, T. P., Dalloul, R. A. (2019). Dietary non-drug feed additive as an alternative for antibiotic growth promoters for broilers during a necrotic enteritis challenge. *Microorganisms*, 7 (257): 1-9.
22. Caly, D. L., D’Inca, R., Auclair, E., Drider, D. (2015). Alternatives to antibiotics to prevent necrotic enteritis in broiler chickens: A microbiologist’s perspective. *Frontier in Microbiology*, 6: 1-12.
23. Cardinal, K. M., Lemos, de M. M., Andretta, I., Schirmann, G. D., Belote, B. L., Barrios, M. A., Santin, E., Leal, R. A. M. (2019). Growth performance and intestinal health of broilers

- fed a standar or low-protein diet with the addition of a protease. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 48.
24. Cardoso, D. P. G., Farnell, M., Farnell, Y., Kogut, M. H. (2020). Dietary factors as triggers of low-grade chronic intestinal inflammation in poultry. *Microorganisms*, 8 (139): 1-10.
  25. Cardoso, D. P. G., Belote, B. L., Lee, A., Bortoluzzi, C., Eyng, C., Sevastiyanova, M., Khadem, A. *et al.* (2021). Novel models form chronic intestinal inflammation in chickens: intestinal inflammation pattern and biomarkers. *Frontiers in immunology*, 12: 676628.
  26. Chávez, L. A., López, A., Parra, J. E. (2016). Crecimiento y desarrollo intestinal de aves de engorde alimentadas con cepas probióticas. *Archivos de Zootecnia*, 65 (249): 51-58.
  27. Cheesbrough, M. (2000). *Medical laboratory manual for tropical countries*. Vol. 11, first edition. Printed in Great Britain by the University press, Cambridge, pp: 372-391.
  28. Chelakkot, C., Ghim, J., Ryu, S. (2018). Mechanism regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Experimental & Molecualr Medicine*, 50 (103): 1-9.
  29. Chen, J., Tellez, G., Richards, J. D., Escobar, J. (2015). Identification of potential biomarkers for gut barrier failure in broiler chickens. *Frontiers in Veterinary Science*, 2: 14.
  30. Cho, H. M., González-Ortiz, G., Melo-Duran, D., Heo, J. M., Cordero, G., Bedford, M. R. *et al.* (2020). Stimbiotic supplementation improved performance and reduced inflammatory response via stimulating fiber fermenting microbiome in weaner pigs housed in a poor sanitary environment and fed an antibiotic-free low zinc oxide diet. *PLoS ONE*, 15 (11): e0240264.
  31. Choct, M., Sinlae, M., Al-Jassim, R., Pettersson, D. (2006). Effects of xylanase supplementation on between-bird variation in energy metabolism and the number of *Clostridium perfringens* in broilers fed a wheat-based diet. *Australian Journal of Agricultural Research*, 57: 1017-1021.
  32. Choi, J. H., Kim, G. B., Cha, C. J. (2014). Spatial heterogeneity of bacterial community in the gastrointestinal tracts of broiler chickens. *Poultry Science*, 93: 1942-1950.
  33. Cisek, A. A., Binek, M. (2014). Chicken intestinal microbiota function with a special emphasis on the role of probiotic bacteria. *Polish Journal of Veterinary Science*, 2 (17): 385-394.
  34. Clavijo, V., Vives, F. M. J. (2018). The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: A review. *Poultry Science*; 97: 1006-1021.
  35. Collier, C. T., van der Klis, J. D., Deplancke, B., Anderson D. B., Gaskins, H. R. (2003). Effects of tylosin on bacterial mucolysis, *Clostridium perfringens* colonization, and intestinal barrier function in a chick model of necrotic enteritis. *Antimicrob. Agents Chemotherapy*, 47:3311–3317.

36. Costa, M. C., Bessegato, J. A., Alfieri, A. A., Weese, J. S., Filho, J. A., Oba, A. (2017). Different antibiotic growth promoters induce specific changes in the cecal microbiota membership of broiler chicken. *Plos One*, 12 (2): 1-13.
37. Danladi, Y., Loh, T. C., Foo, H. L., Akit, H., Tamrin, N. A. M., Naeem, A. M. (2022). *Lactiplantibacillus plantarum* on colon mucosa microbiota in broiler chickens. *Frontiers in Veterinary Science*, 9: 859284.
38. De Paepe, M., Leclerc, M., Tinsley, C. R., Petit, M. (2014). Bacteriophages: an underestimated role in human and animal health? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4 (39): 1-11.
39. Dhama, K., Tiwari, R., Ullah Khan, R., Chackraborty, S., Gopi, M., Karthik, K. *et al.* (2014). Growth Promoters and Novel Feed Additives Improving Poultry Production and Health, Bioactive Principles and Beneficials Applications: The Trends and Advances- A Review. *International Journal of Pharmacology*, 10 (3): 129-159.
40. Di Donato, P., Pennink, D., Pietra, M., Cipone, M., Diana, A. 2014 Ultrasonographic measurement of the relative thickness of intestinal wall layers in clinically healthy cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 16 (4): 333-339.
41. Diaz, C. J. M., Casanova, N. A., Fernandez, M. M. E. (2019). Microbiota, gut health and chicken productivity: ¿what is the connection? *Microorganisms*, 7, 374: 1-15.
42. Dominguez-Navarrete, N. (2020). Bacteriofagos. *Revista Facultad de Medicina Humana*, 20 (1): 164-165.
43. Duangnumswang, Y., Zentek, J., Goodarzi Boroojeni, F. (2021). Development and Functional Properties of Intestinal Mucus Layer in Poultry. *Frontiers in Immunology*, 12 (745849).
44. Elhassan, M. M. O., Ali, A. M., Blanch, A., Kehlet, A. B., Madekurozwa, M. C. (2018) Morphological responses of the small intestine of broiler chicks to dietary supplementation with a probiotic, acidifiers, and their combination. *Journal Applied Poultry Research*, 28: 108-117.
45. Engberg, R. M., Hedemann, M. S., Leser, T. D., Jensen. B. B. (2000). Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers. *Poultry Science*, 79: 1311-1319.
46. Ensari, A., Marsh, M. N. (2018). Exploring the villus. *Gastroenterology & Hepatology from Bed to Bench*, 11 (3): 181-190.
47. Erben, U., Loddenkemper, C., Doerfel, K., Spieckermann, S., Haller, D., Heimesaat, M. M. *et al.* (2014). A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. *International Journal Clinical and Experimental Pathology*, 7 (8): 4557-4576.

48. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2016). Probiotics in animal nutrition; Production, impact, and regulation by Bajagai YS, Klieve AV, Dart PJ, Bryden WL. *Animal Production and Health*, 179.
49. Fathima, S., Shanmugasundaram, R., Adams, D., Selvaraj, R. K. (2022). Gastrointestinal microbiota and their manipulation for improved growth and performance in chickens. *Foods*, 11 (10) 1401.
50. Fernandes, B. C. S., Martins, M. R. F. B., Mendes, A. A., Milbradt, E. L., Sanfelice, C., Martins, B. B., Aguilar, E. F., Bresne, C. (2014). Intestinal Integrity and Performance of Broiler Chickens Fed a Probiotic, a Prebiotic, or an Organic Acid. *Revista Brasileira de Ciencia Avicola*, 4 (16): 417-424.
51. Firlieyanti, A. S., Connerton, P. L., Connerton, I. F. (2016). Campylobacters and their bacteriophages from chicken liver: The prospect for phage biocontrol. *International Journal of Food Microbiology*, 237: 121-127.
52. Flesch, A. G. T., Poziomyck, A. K., Damin, D. C. (2014). The therapeutic use of symbiotics. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva: ABCD*, 27 (3): 206-209.
53. Fonseca, B. B., Beletti, M. E., Silva, M. S. da, Silva, P. L. da, Duarte, I. N., Rossi, D. A. (2010). Microbiota of the cecum, ileum morphometry, pH of the crop and performance of broiler chickens supplemented with probiotics (en línea). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39 (8): 1756-1760.
54. Gagliardi, A., Totino, V., Cacciotti, F., Iebba, V., Neroni, B., Bonfoglio, G. *et al.* (2018). Rebuilding the gut Microbiota Ecosystem. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15: 1679.
55. Gao, P., Ma, C., Sun, Z., Wang, L., Huang, S., Su, S. *et al.* (2017). Free-additive probiotics accelerate yet antibiotic delay intestinal microbiota maturation in broiler chicken. *Microbiome*, 5: 91.
56. Gava, M. S., Moraes, L. B., Carvalho, D., Chitolina, G. Z., Fallavena, L. C. B., Herpich, J. *et al.* (2015). Determining the Best Sectioning Method and Intestinal for Morphometric Analysis in Broilers. *Revista Brasileira de Ciencia Avicola*, 2 (17): 145-150.
57. Ghazanfari, S. I., Mohammadi, Z. I., Adib Moradi MII. Effects of Coriander Essential Oil on the Performance, Blood Characteristics, Intestinal Microbiota and Histological of Broilers. *Brazilian Journal of Poultry Science* 2015, 17 (4): 419- 426.
58. Gheisar MM., Kim, I. H. (2017). Phytobiotics in poultry and swine nutrition – a review. *Italian Journal of Animal Science*, 17 (1): 92-99.
59. Gibson-Corley, N., Oliver, K., Meyerholz, K. (2013). Principles for valid histopathologic scoring in research. *Veterinary Pathology*, 50 (6): 2-21.

60. Giannenas, I., Tsalie, E., Triantafillou, E., Hessenberger, S., Teichmann, K., Mohnl, M., Tontis, D. (2014). Assessment of probiotics supplementation via feed or water on the growth performance, intestinal morphology, and microbiota of chickens after experimental infection with *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* y *Eimeria tenella*. *Avian Pathology*, 43 (3): 209-216.
61. Gonzalez-Ortiz, G., Gomes, G. A., Dos Santos, T. T., Bedford, M. R. (2019). New strategies influencing gut functionality and animal performance. In: Gonzalez-Ortiz G, Bedford MR, Bach Knudsen KE, Courtin CM, Classen HL editors. *The value of fibre—Engaging the second brain for animal nutrition*, The Netherlands: Wageningen Academic Press; 233–254.
62. Gómez, V. G. G. (2009). *Modulación nutricional de la inmunidad en pollo de engorda mediante el empleo de un estimulante (paredes de levaduras de Saccharomyces cerevisiae)* [Tesis de Doctorado] Distrito Federal, México. Universidad Nacional Autónoma de México.
63. Goto, Y., Ivanov, I. (2013). Intestinal epithelial cells as mediators of the commensal-host immune crosstalk. *Immunology and Cell Biology*, 91 (3): 204-214.
64. Guarner, F. (2007). Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. *Nutrición Hospitalaria*, 22 (2): 14-19.
65. Gurram, S., Preetam, V. C., Laksshmi, K, V., Raju, M. V. L. N., Venkateshwarlu, M., Bora, S. (2021). Bora S. Supplementation of chicory root powder as an alternative to antibiotic growth promoter on gut pH, gut microflora and gut histomorphometry of male broilers. *PLoS ONE*, 16(12): e0260923.
66. Haberecht, S., Bajagai, Y. S., Moore, R. J., Hao Van, T. T., Stanley, D. (2020). Poultry feeds carry diverse microbial communities that influence chicken intestinal microbiota colonization and maturation. *AMB Express*, 10; 143.
67. Hassan, H. M. A., Youssef, A. W., El-Daly, E. F., Abd El-Azeem, N. A., Hassan, E. R., Mohamed, M. A. (2014). Performance, Caecum Bacterial Count, and Ileum Histology of Broilers Fed Different Direct-Fed Microbials. *Asian Journal of Poultry Science*, 8 (4): 106-114.
68. Hernández, C. R. E, Castellanos, G. L. (2014). Uso de los bacteriófagos en el sector agropecuario. *Agrosistemas*, 2 (2): 361-371.
69. Hernández-González, J. C., Martínez-Tapia, A., Lazcano-Hernández, G., García-Pérez, B. E., Castrejón-Jiménez, N. S. (2021). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. A Powerful Alternative as Antimicrobials, Probiotics, and Immunomodulators in Veterinary Medicine. *Animals*, 11, 979.

70. Hessissen, N. (2016). Prebióticos, Probióticos y Sistema Inmune. Facultad de Farmacia Universidad Complutense, Tesis de Doctorado: 1-23.
71. Higgins, J. P., Higgins, S. E., Guenther, K. L., Huff, W., Donoghue, A. M., Donoghue, D. J., Hargis, B. M. (2005). Use of a specific bacteriophage treatment to reduce salmonella in poultry products. *Poultry Science*, 84: 1141-1145.
72. Hooks, K. B., O'Malley, M. A. (2017). Dysbiosis and its discontents. *American Society for Microbiology, mBio* 8 (5): 1-21.
73. Houshmand, M., Azhar, K., Zulkifli, I., Bejo, M. H., Kamyab, A. (2011). Effects of Nonantibiotic Feed Additives on Performance, Nutrient Retention, Gut pH and Intestinal Morphology of Broilers Fed Different Levels of Energy. *Journal Applied Poultry Research* (20): 121-128.
74. Huang, L., Luo, L., Zhang, Y., Wang, Z., Xia, Z. (2019). Effects of the dietary probiotic, *Enterococcus faecium* NCIMB11181, on the intestinal barrier and system immune status in *Escherichia coli* O78-challenged broiler chickens. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11 (3): 946-956.
75. Huff, W. E., Huff, G. R., Rath, N. C., Balog, J. M., Donoghue, A. M. (2003). Bacteriophage treatment of a severe *E. coli* respiratory infection in broiler chickens. *Avian Disease*, 47 (4): 1399-405.
76. Huff, W. E., Huff, G. R., Rath, N. C., Balog, J. M., Donoghue, A. M. (2004). Therapeutic efficacy of bacteriophage and baytril (enrofloxacin) individually and in combination to treat colibacillosis in broilers. *Poultry Science*, 83: 1944-1947.
77. Huesca-Espitia, LC., Sánchez- Salas, J. L., Bandala, E. R. (2014). Métodos para la inactivación de esporas en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8 (1): 48-67.
78. Hussein, E. O. S., Ahmed, S. H., Abudabos, A. M., Aljumaah, M. R., Alkhulaifi, M. M., Nassan, M. A. (2020). Effect of antibiotic, phytobiotic and probiotic supplementation on growth, blood indices and intestine health in broiler chicks challenged with *Clostridium perfringens*. *Animals*, 10 (507): 1-18.
79. Icaza-Chávez, M. E. (2013). Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de Gastroenterología de México*, 78 (4): 241-248.
80. Iebba, V., Totino, V., Gagliardi, A., Santangelo, F., Cacciotti, F., Trancassini, M. *et al.* (2016). Eubiosis and dysbiosis the two sides of the microbiota. *New Microbiologica*, 39: 1-12.
81. Inchaoren, T., Yamauchi, K., Erikawa, T., Gotoh, H. (2010). Histology of Intestinal Villi and Epithelial Cells and Chickens Fed Low-Crude Protein or Low-Crude Fat Diets. *Italian Journal of Animal Science*, 82 (9): 429-434.

82. Jassim, S. A. A., Limoges, R. G. (2014). Natural solution to antibiotic resistance: bacteriophages “The living Drugs”. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30: 2153-2170.
83. Jeurissen, H. M., Lewis, F., Dirk van der Klis, J., Mroz, Z., Rebel, M. J., Ter Huurne, A. H. M. (2002). Parameters and Techniques to Determine Intestinal Health of Poultry as Constituted by Immunity, Integrity, and Functionality. *Current Issues in Intestinal Microbiology* (3): 1-14.
84. Johnson, T. J., Shank, J. M., Johnson, J. G. (2017). Current, and potential treatments for reducing *Campylobacter* colonization in animal hosts and disease in humans. *Frontiers in Microbiology*, 8 (487): 1-14.
85. Julendra, H., Sofyan, A., Istiqomah, L., Karimy, M. F., Abinawanto A., Yasman, Y. (2021). Intestinal morphology, energy availability, and growth performance of broilers treated with the combination of probiotic and inulin. *Tropical Animal Science Journal*, 44 (1): 39-47.
86. Juul-Madsen, H.R., Viertlböck, B., Härtle, S., Smith, A.L., Göbel, T.W. (2014). Innate immune responses. In: Schat K.A., Kaspers B., Kaiser P., editors. *Avian Immunology*. 2nd ed. Elsevier, Academic Press; San Diego, CA: 121–147.
87. Kalender, H., Ertas, H. B. (2005). Isolation of *Clostridium perfringens* from Chickens and detection of the alpha toxin gene by polymerase chain reaction (PCR). *Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences*, 29: 847-851.
88. Kalia, V. C., Shim, W. Y., Patel, S. K. S., Gong, C., Lee, J. (2022). Recent developments in antimicrobial growth promoters in chicken health: Opportunities and challenges. *Science of The Total Environment*, 834 (15).
89. Karimi, S. H., Taha-Abdelaziz, K., Yitbarek, A., Sargolzaei, M., Spahany, H., Astill, J., Shojadoost, B., Alizadeh, M., Kulkarni, R. R., Parkinson, J., Sharif, S. (2022). Effects of therapeutic of dietary antibiotics on the cecal microbiome composition of broiler chickens. *Poultry Science*, 101: 101864.
90. Khoobani, M., Hasheminezhad, S., Javandel, F., Nosrati, M., Seidavi, A., Kadim, I. *et al.* (2020). Effects of dietary chicory (*Chicorium intybus* L.) and probiotic blend as natural feed additives on performance traits, blood biochemistry, and Gut Microbiota of broiler chickens. *Antibiotics*, 9 (5): 1-9.
91. Kiczorowska, B., Samolinska, W., Al-Yasiry, A. R. M., Kiczorowski, P., Winiarska-Mieczan, A. (2017). The natural feed additives as immunostimulants in monogastric animal nutrition – A Review. *Ann animal Science*, 17 (3): 605-625.
92. Kim, J. H., Kim, J. W., Lee, B. B., Lee, G. I., Kim, G. B. and Kim, D. Y. (2014). Effect of dietary supplementation of bacteriophage on growth performance and cecal bacterial

- populations in broiler chickens raised in different housing systems. *Livestock Science*, 170: 137-141.
93. Kim, K. H., Lee, G. Y., Jang, J. C., Kim, J. E., Kim, Y. Y. (2013). Evaluation of anti-SE bacteriophage as feed additives to prevent *S. enteritidis* in broiler. *Asia-Australas Journal of Animal Science*, 26 (3): 386-393.
  94. Kim, Y. S., Ho, S. B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease. Recent insights and progress. *Current gastroenterology reports*, 12 (5): 319-330.
  95. Kocot, A. M., Jarocka-Cyrta, E., Drabinska, N. Overview of the importance of probiotics in gut barrier integrity. *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (5): 2896.
  96. Kogut, M. H., Arsenault, R. J. (2016). Editorial: Gut health: The new paradigm in food animal production. *Frontiers in Veterinary*, 3; 71: 1-4.
  97. Kogut, M. H. (2017). Issues and consequences of using nutrition to modulate the avian immune response. *Journal of Applied Poultry Research*, 26: 605-612.
  98. Kogut, M. H. (2019). The effect of microbiome modulation on the intestinal health of poultry. *Animal Feed Science and Technology*, 250: 32-40.
  99. Kogut, M. H., Genovese, K. J., Swaggerty, C. L., He, H., Broom, L. (2018). Inflammatory phenotypes in the intestine of poultry: not all inflammation is created equal. *Poultry Science*, 0: 1-8.
  100. Kraieski, A. L., Hayashi, R. M., Sanches, A., Almeida, G. C., Santin, E. (2017). Effect of aflatoxin experimental ingestion and Eimeria vaccine challenges on intestinal histopathology and immune cellular dynamic of broilers: applying an Intestinal Health Index. *Poultry Science*, (96): 1078-1087.
  101. Kurtböke, I. (2012). Bacteriophages. 1a ed. Croatia, InTech Open, 256 pp.
  102. Laudadio, V., Passantino, L., Perillo, A., Lopresti, G., Passantino, A. (2012). Productive performance and histological features of intestinal mucosa of broiler chickens fed different dietary protein levels. *Poultry Science*, 91: 265-270.
  103. Lavin, S. R., Karasov, W. H., Ives, A. R., Middleton, K. M., Garland, T. (2008). Morphometrics of the avian small intestine compared with that of nonflying mammals, A phylogenetic approach. *Physiological and Biochemical Zoology*, 81 (5): 526-550.
  104. Lourenco, M. C., Kuritza, L. N., Hayashi, R. M., Miglino, L. B., Durau, J. F., Pickler, L., Santin, E. (2015). Effect of a Mannan oligosaccharide-supplemented diet on intestinal mucosa T lymphocyte populations in chickens challenged with *Salmonella Enteritidis*. *Journal Applied Poultry Research*, (24): 15-22.
  105. Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methods 2001, 402–408.

106. Łusiak-Szelachowska, M., Weber-Dąbrowska, B., Jończyk-Matysiak, E., Wojciechowska, R., Górski, A. (2017). Bacteriophages in the gastrointestinal tract and their implications. *Gut Pathogens*, 10 (9): 44.
107. Madhupriya, V., Shamsudeen, P., Manohar, G. R., Senthilkumar, S., Soundarapandiyan, V., Moorthy, M. (2018). Phyto Feed Additives in Poultry Nutrition – A Review. *International Journal of Science Environment and Technology*, 3 (7): 815-822.
108. Majidi-Mosleh, A., Sadeghi, A. A., Mousavi, S. N., Chamani, M., Zarei, A. (2017). Effects of in ovo infusion of probiotic strains on performance parameter, jejunal bacterial population and mucin gene expression in broiler chicken. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 19: 97-102.
109. Marcovik, R., Sefer, D., Krstic, M., Petrujkic, B. (2009). Effect of different growth promoters on broiler performance and gut morphology. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 41: 163-169.
110. Medhi, Y., Létourneau-Montminy, M., Gaucher, M., Chorfi, Y., Suresh, G., Rouissi, T. *et al.* (2018). Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. *Animal Nutrition*, 4: 170-178.
111. Miniello, V. L., Diaferio, L., Lassandro, C., Verducci, E. (2017). La importancia de ser eubiótico. *Journal Probiotics and Health*, 5: 1-9.
112. Hayashi, R. M., Lourenco, M. C., Kraieski, A. L., Araujo, R. B., Gonzales- Esquerria R., Leonardecz E., da Cunha, A. F., Carazzolle, M. F., Monzani, P. S., Santin E. (2018). Effect of Feeding *Bacillus subtilis* Spores enterica serovar Heidelberg Brazilian Strain UFPR1 on Performance, Immune Response, and Gut Health. *Frontiers in Veterinary Science*, (5): 13.
113. Molina, A. (2019). Probióticos y su mecanismo de acción en alimentación animal. *Agronomía Mesoamericana*, 30 (2): 600-611.
114. Mountzouris, K. C., Tsitsrikos, P., Palamidi, I., Arvaniti, A., Mohnl, M., Schatzmayr, G. y Fegeros, K. (2010). Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. *Poultry Science*, 89: 58-67.
115. Oh, J. K., Pajarillo, E. A. B., Chae, J. P., Kim, I. H., Yang, D. S., Dae-Kyung, K. (2017). Effects of *Bacillus subtilis* CSL2 on the composition and functional diversity of the faecal microbiota of broiler chickens challenged with *Salmonella Gallinarum*. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8 (1): 1-9.
116. Oliveira, H., Sillankorva, S., Merabishvili, M., Kluskens, L. D., Azeredo, J. (2015). Unexploited for phage therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 6 (180): 1-4.

117. Olynk, N. J. (2012). Assessing changing consumer preferences for livestock production processes. Department of Agricultural Economics, Purdue University, West Lafayette, 3 (2): 33-38.
118. Oviedo-Rondon, E. O. (2009). Molecular methods to evaluate effects of feed additives and nutrients in poultry gut microflora. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38 (supl especial): 209-225.
119. Paone, P., Cani, P. D. (2020). Mucus barrier, mucins and gut microbiota; the expected slimy partners? *Gut*, 69: 2232-2243.
120. Pantoja-Don Juan, C. A, Gómez-Verduzco, G., Márquez-Mota, C. C., Téllez-Isaías, G., Kwon, Y. M., Cortés-Cuevas, A. *et al.* (2022). Productive performance and cecum microbiota analysis of broiler chickens supplemented with  $\beta$ -mannanases and bacteriophages – A pilot study. *Animals*, 12 (169): 1-15.
121. Panwar, S., Tripathi, P. (2021). Role of barrier integrity and dysfunctions in maintaining the healthy gut and their health outcomes. *Frontiers in Physiology*, 12, 715611.
122. Parisien, A., Allain, B., Zhang, J., Mandeville, R., Lan, C. Q. (2007). Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *Journal Applied Microbiology*, 104: 1-13.
123. Pedroso, A. A., Menten, J. F. M., Racanicci, A. M. C., Longo, F. A., Sorbara, J. O. B., Gaiotto, J. B. (2003). Performance and Organ Morphology of Broilers Fed Microbial or Antimicrobial Additives and Raised in Batteries or Floor Pens. *Revista Brasileira de Ciencia Avícola*, 2 (5): 1806-9061.
124. Pelicano, E. R. L., Souza, P. A de, Souza, H. B. A de, Leonel, F. R., Zeola, N. M. B. L., Boiago, M. M. (2004). Productive traits of broiler chickens fed diets containing different growth promoters. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 6 (3): 177-182.
125. Plata, G., Baxter, N. T., Susanti, D., Volland-Munson, A., Gangaiah, D., Nagireddy, A., Mane, S. P., Balakuntla, J., Hawkins, T. B., Mahajan, A. K. (2022). Growth promotion and antibiotic induced metabolic shifts in the chicken gut microbiome. *Communications biology*, 5: 293.
126. Ponziani, F. R., Zocco, M. A., D'Aversa, F., Pompili, M. y Gasbarrini, A. (2017). Eubiotic properties of rifaximina: Disruption of the traditional concepts in gut microbiota modulation. *World Journal of Gastroenterology*, 23 (25): 4491-4499.
127. Puvaca, N., Brkic, I., Jahic, M., Nikolic, S. R., Radovic, G., Ivanisevic, D., Dokic, M., Boskovic, D., Llic, D., Brkanlic, S., Prodanovic, R. (2020). The effect of using natural or biotic dietary supplements in poultry nutrition on the effectiveness of meat production. *Sustainability*, 12 (11), 4373.

128. Rahman, M. R. T., Fliss, I., Biron, E. (2022). Insights in the Development and Uses of Alternatives to Antibiotic Growth Promoters in Poultry and Swine Production. *Antibiotics*, 11, 766: 1-29.
129. Rafiq, K., Hossain, M. T., Ahmed, R., Hassan, M. M., Islam, R., Hossen, M. I. *et al.* (2022). Role of different growth enhancers as alternative to in-feed antibiotics in poultry industry. *Frontiers in Veterinary Science*, 8:794588.
130. Ravindran, V., Abdollahi, M. R. (2021). Nutrition, and digestive physiology of the broiler chick; State of the Art and Outlook. *Animals*, 11 (2795): 1-23.
131. Riahi, I., Marquis, V., Ramos, A. J., Brufau, J., Esteve-Garcia, E., Pérez-Vendrell, V. A. M. (2020). Effects of Deoxynivalenol-Contaminated Diets on Productive, Morphological, and Physiological Indicators in Broiler Chickens. *Animals*, 9 (301): 1-11.
132. Ribeiro, T., Cardoso, V., Ferreira, L. M. A., Lordelo, M. M. S., Coelho, E., Moreira, A. S. P. *et al.* (2018). Xylo-oligosaccharides display a prebiotic activity when used supplement wheat or corn-based diets for broilers. *Poultry Science*, 97: 4330-4341.
133. Ringenier, M., Caekebeke, N., De Meyer, F., Van, L. T., Eeckhaut, V., Ducatelle, R. *et al.* (2021). A field study on correlations between macroscopic gut health scoring, histological measurements, and performance parameters in broilers. *Avian Pathology*, (5) 6: 500-506.
134. Roberts, T., Wilson, J., Guthrie, A., Cookson, K., Vancraeynest, D., Schaeffer, J., Moody, R., Clark, S. (2015). New issues and science in broiler chicken intestinal health: Emerging technology and alternative interventions. *Journal Applied Poultry Research*, (24): 257-266.
135. Robles-Alonso, V., Guarner, F. (2013). Progreso en el conocimiento de la microbiota intestinal humana. *Nutrición Hospitalaria*, 28 (3): 553-557.
136. Rosen, G. D. (1996). Feed additive nomenclature. *World's Poultry Science Journal*, 52: 53-57.
137. Rubio, G. M. (2005). Procesamiento, industrialización y comercialización del pollo productor de carne. *Sistema de producción Animal I. FMVZ-UNAM*. 2ª ed. México, D.F.: 195-203.
138. Samsudin, A. A., Al-Hassani, H. D. (2014). The bacterial community of the chicken's intestinal tract: Impact of Xylanase supplement. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 37 (1): 109-120.
139. Sanches, A. W. D., Belote, B. L., Hümmelgen, P., Heemann, A. C. W., Soares, I., Tujimoto-Silva, A., Tirado, A. G. C., Cunha, A. F., Santin, E. (2020). Basal and Infectious Enteritis in Broilers Under the I See Inside Methodology: A Chronological Evaluation. *Frontiers Veterinary Science*, 6:512.

140. Santibañez, P. F. I. (2008). Probiótico y bacteriófagos como biocontroladores de la colonización de *Salmonella* Enteritidis en pollos experimentalmente infectados. Tesis de Licenciatura. Fac Ciencias Vet. y Pec., Universidad de Chile.
141. Sarrami, Z., Sedghi, M., Mohammadi, I., Kim, W. K., Mahdavi, A. H. (2022). Effects of bacteriophage supplement on the growth performance, microbial population, and PGC-1 $\alpha$  y TLR4 gene expressions of broiler chickens. *Scientific Reports*, 12: 14391.
142. Sattler, V. A., Mohnl, M., Klose, V. (2014). Development of a strain-specific real-time PCR assay for enumeration of a probiotic *Lactobacillus reuteri* in chicken feed and intestine. *PLoS ONE* 9(2): e90208.
143. Segundo, A. N., Hernández, B. E., López, V. O., Torres, A. O. (2010). Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas (fagoterapia). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41 (3): 17-26.
144. Sethiya, N. J. (2016). Review on natural growth promoters available for improving gut health of poultry: An alternative to antibiotic growth promoter. *Asian Journal Poultry Science*, 10 (1): 1-29.
145. Setiawan, H., Jingga, M. E., Saragih, H. T. (2018). The effect of cashew leaf extract on small intestine morphology and growth performance of Jawa Super Chicken. *Veterinary World*, 11(8): 1047-1054.
146. Schat, K. A, Kaspers, B., Kaiser, P. (2014). *Avian immunology*. Segunda Edición. Academic Press, San Diego, 440 pp.
147. Shanmugasundaram, R., Mortada, M., Cosby, D. E., Sinhg, M., Applegate, T. J., Syed, B., Pender, C. M., Curry, S., Murugesan, G. R., Selvaraj, R. K. (2019). Synbiotic supplementation to decrease *Salmonella* colonization in the intestine and carcass contamination in broilers birds. *PLoS ONE*, 14 (10): 1-12.
148. Sharmila, A., Kasim, A., Noor, H. M., Jahromi, M. F., Samsudin, A. A. (2015). Quantitative real-time PCR analysis of the caecal bacteria population of broiler chickens fed with corn-soy diet containing 20% of palm kernel meal with or without enzyme supplementation. *Journal of Animal and Poultry Sciences*, 4 (1): 1-9.
149. Shini, S., and Bryden, W. L. 2022. Probiotics and gut health: linking gut homeostasis and poultry productivity. *Animal Prod. Sci.* 62: 1090-1112.
150. Shuwen, H., Kefeng, D. (2022). Intestinal phages interact with bacteria and are involved in human diseases. *Gut microbes*, 14: 1, 2113717.
151. Smyth, J. A. (2016). Pathology and diagnosis of necrotic enteritis: is it clear-cut? *Avian Pathology*, 45 (3): 282-287.

152. Song, J., Xiao, K., Ke, Y. L., Jiao, L. F., Hu, C. H., Diao, Q. Y. *et al.* (2014). Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress. *Poultry Science*, 93: 581-588.
153. SPSS, IBM Corp. Released 2021. IBM SPSS Statistics for Windows, Versión 28. Armonk, NY: IBM, Corp.
154. Sumano, H. S., Gutiérrez, L. (2010). *Farmacología clínica en aves comerciales*. 4a edición México: McGraw-Hill Interamericana. 703 p.
155. Sun, Q., Shang, Y., She, R., Jiang, T., Wang, D., Ding, Y., Yin, J. (2013). Detection of intestinal intraepithelial lymphocytes, goblet cells and secretory IgA in the intestinal mucosa during Newcastle disease virus infection. *Avian Pathology*, 42 (6): 541-545.
156. Sun, B., Hou, L., Yang, Y. (2021). Effects of Adding Eubiotic Lignocellulose on the Growth Performance, Laying Performance, Gut Microbiota, and Short-Chain Fatty Acids of Two Breeds of Hens. *Frontiers in Veterinary*, 8: 668003.
157. Tan, J., Applegate, T. J., Liu, S., Guo, Y., Eicher, S. D. (2014). Supplemental dietary L-arginine attenuates intestinal mucosal disruption during a coccidial vaccine challenge in broiler chickens. *British Journal of Nutrition*, 112: 1098-1109.
158. Tang, D., Li, Z., Mahmood, T., Liu, D., Hu, Y., Guo, Y. (2020). The association between microbial community and ileal gene expression on intestinal wall thickness alterations in chickens. *Poultry Science*, 99: 1847-1861.
159. Tambini, A. A., Alba, C. M., Perales, C. R., Falcón, P. N. (2010). Evaluación anatómo-histopatológica de bursa, timo y bazo de pollos de carne criados sobre cama reutilizada vs cama nueva. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 21 (2): 180-186.
160. Tarradas, J., Tous, N., Esteve-Garcia, E., Brufau, A. J. (2020). The control of intestinal inflammation: A major objective in the research of probiotic strains as alternatives to antibiotic growth promoter in poultry. *Microorganisms*, 8 (2): 148-164.
161. Teirlynk, E., Gussem, M. D. E., Dewulf, J., Haesebrouk, F., Ducatelle, R., Van, I. F. (2011). Morphometric evaluation of “dysbacteriosis” in broilers. *Avian Pathology*, 40 (2): 139-144.
162. Tekce, E., Bayratar, B., Aksakal, V., Dertli, E., Kamiloglu, A., Cinar, K. *et al.* (2021). Effects of *Lactobacillus reuteri* E81 added into rations under heat stress conditions on fattening performance and meat quality. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 22 (2): 1-10.
163. Thacker, P. A. (2013). Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 4: 35.
164. Torok, A., Ophel-Keller, K., Loo, M., Hughes, J. (2008). Application of Methods for Identifying Broiler Chicken Gut Bacterial Species Linked with Increased Energy Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 3 (74): 783-791.

165. Torok, V. A., Dyson, C., McKay, A., Ophel-Keller, K. (2013). Quantitative molecular assays for evaluating changes in broiler gut microbiota linked with diet and performance. *Animal Production Science*, 53: 1260-1268.
166. van Wagenberg, C. P. A, van Horne, P. L. M., van Asseldonk, M. A. P. M. (2020). Cost-effectiveness analysis of using probiotics, prebiotics, or synbiotics to control *Campylobacter* in broilers. *Poultry Science*, 99: 4077-4084.
167. Vinueza-Burgos, C. (2009). PCR en tiempo real: la nueva era de la información genética celular. *Revista Electrónica Veterinaria*, 10 (2): 1-13.
168. Wang, J. P., Yan, L., Lee, J. H., Kim, I. H. (2013). Evaluation of bacteriophage supplementation on growth performance, blood characteristics, relative organ weight, breast muscle characteristics and excreta microbial shedding in broilers. *Asian-Australasian Journal Animal Science*, 26 (4): 573-578. 2014
169. Wells, J. M., Brummer, R. J., Derrien, M., MacDonald, T. T., Troost, F., Cani, P. D. *et al.* (2016). Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. *American Journal Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 312: G171-193.
170. Wernicki, A., Nowaczek, A., Urban-Chmiel, R. (2017). Bacteriophage therapy to combat bacterial infections in poultry. *Virology Journal*, 14 (179): 1-13.
171. Whelan, R. A., Doranalli, K., Rinttilä, T., Vienola, K., Jurgens, G., Apajalahti, J. (2019). The impact of *Bacillus subtilis* DSM 32315 on the pathology, performance, and intestinal microbiome of broiler chickens in a necrotic enteritis challenge. *Poultry Science*, 98: 3450-3463.
172. Wickramasuriya, S. S., Park, I., Lee, K., Lee, Y., Kim, W. H., Nam, H., Lillehoj, H. S. (2022). Role of Physiology, Immunity, Microbiota, and Infectious Diseases in the Gut Health of Poultry. *Vaccines*, 10 (2): 172.
173. Wilson, K. (1997). Preparation of genomic DNA from Bacteria. In *Current Protocols in Molecular Biology* 2.4.1-2.4.5, Supplement 27 (Eds. F.M. Ausubel et al; Wiley InterScience).
174. Wu, Q. J., Zhou, Y. M., Wu, Y. N., Wang, T. (2013). Intestinal development, and function of broiler chickens on diets supplemented with clinoptilolite. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 26 (7): 987-994.
175. Wu, Y., Lei, Z., Wang, Y., Yin, D., Aggrey, S. E., Guo, Y., Yuan, J. (2021). Metabolome and microbiota analysis reveals the conducive effect of *Pediococcus acidilactici* BCC-1 and Xylan Oligosaccharides on broiler chickens. *Frontiers in Microbiology*, 12: 683905.
176. Wu, Y., Zhen, W., Geng, Y., Wang, Z., Guo, Y. (2019). Pretreatment with probiotic *Enterococcus faecium* NCIMB 11181 ameliorates necrotic enteritis-induced intestinal barrier injury in broiler chickens. *Scientific Reports*, 9: 10256.

177. Yadav, S., Jha, R. (2019). Strategies to modulate the intestinal microbiota and their effects on nutrient utilization, performance, and health of poultry. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, (10) 2: 1-11.
178. Yamauchi, K. (2002). Review on chicken intestinal villus histological alterations related with intestinal function. *Journal of Poultry Science*, 39: 229-242.
179. Yaqoob, M. U., Wang, G., Wang, M. (2022). An updated review on probiotics as an alternative of antibiotics in poultry – A review. *Animal Bioscience*, 35 (8): 1109-1120.
180. Yasar, S., Okutan, I., Tosun, R. (2017). Testing Novel Eubiotic Additives: Its Health and Performance Effects in Commercially Raised Farm Animals. *Journal of the institute of Science and Technology*, 7 (4): 297-308.
181. Yegani, M., Korver, D. R. (2008). Factors affecting health in Poultry. *Poultry Science*, 87: 2052-2063.
182. Yu, K., Choi, I., Yun, C. (2021). Immunosecurity: immunomodulants enhance immune responses in chickens. *Animal Bioscience*, 34 (3): 321-337.
183. Yun, W., Lee, D. H., Choi, Y. I., Kim, I. H., Cho, J. H. (2017). Effects of supplementation of probiotics and prebiotics on growth performance, nutrient digestibility, organ weight, fecal microbiota, blood profile, and excreta noxious gas emissions in broilers. *Journal Applied Poultry Research*, 26: 584-592.
184. Zavarize, K. C., Sartori, J. R., González, E., Pezzato, A. C. (2012). Morphological changes of the intestinal mucosa of broilers and layers as affected by fasting before sample collection. *Revista Brasileira de Ciencia Avícola*, 14 (1): 21-25.
185. Zhang, M., Chenchen, W. (2020). The relations between intestinal goblet cells and the immune response. *Bioscience Reports*, 40: 1-11.
186. Zhang, J., Deng, J., Li, Y., Qian, Y. (2011). The effect of *Lactobacillus* on the expression of porcine  $\beta$ -defensin-2 in the digestive tract of piglets. *Livestock Science*, 138: 259-265.
187. Zhang, Z., Akhtar, M., Chen, Y., Ma, Z., Liang, Y., Shi, D., Cheng, R., Cui, L., Hu, Y., Nafady, A. A., Ansari, A. R., Abdel-Kafy, E. M., Liu, H. (2022). Chicken jejunal microbiota improves growth performance by mitigating intestinal inflammation. *Microbiome*, 10: 107.
188. Zeng, Y., Wang, Z., Zou, T., Chen, J., Li, G., Zheng, L., Li, S., You, J. (2021). Bacteriophage as an alternative to antibiotics promotes growth performance by regulating intestinal inflammation, intestinal barrier function and gut microbiota in weaned piglets. *Frontiers in Veterinary*, 8: 623899.

**Cuadro 1. Composición de las dietas basales para pollos de engorda de 1-49 d.**

	Iniciación 1 - 21 d	Crecimiento 22 - 35 d	Finalización 36 - 49 d
<b>Ingredientes</b>	<b>21%</b>	<b>19%</b>	<b>17%</b>
Sorgo	583.0	624.15	675.31
Pasta de soya	328.7	277.50	226.80
Aceite vegetal	35.08	45.71	48.23
Ortofosfato 1820	18.79	16.61	15.41
Carb. de Ca	16.79	14.01	13.47
Sal (NaCl)	4.350	3.84	3.86
DL-Metionina 80%	4.130	4.005	3.61
L-Lisina HCL 78%	4.110	3.460	2.94
L-Treonina	1.900	1.560	.1.22
Cloruro colina60 + premezcla	2.500	2.500	2.500
Nicarbacina	0.500	0	0
Salinomicina	0	0.500	0.500
Antioxidante	0.150	0.150	0.150
Pigmento	0	6.00	6.00
<b>Total (kg)</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>
<i>Composición calculada</i>			
EM, Kcal/kg	2988	3176	3176
Proteína %	21.00	18.00	17.00
Lisina tot %	1.22	1.04	0.99
Lisina dig. %	1.08	0.95	0.89
Metionina tot %	0.57	0.55	0.51
Metionina dig. %	0.45	0.42	0.39
Met+Cis tot %	0.91	0.82	0.78
Met+Cis dig. %	0.80	0.74	0.69
Treonina tot. %	0.93	0.72	0.71
Treonina dig. %	0.79	0.62	0.60
Triptofano %	0.27	0.23	0.22
Triptofano dig. %	0.23	0.20	0.19
Arginina %	1.34	1.13	1.03
Arginina dig. %	1.20	0.99	0.92
Ca %	1.05	0.90	0.85
P disponible %	0.50	0.45	0.42
Na %	0.22	0.19	0.18
Cl %	0.20	0.20	0.20

<sup>1</sup>Vitamina A (12,000,000 UI), vitamina D3 (2,500,000 UI), vitamina E (15,000 UI), vitamina K (2.0g), vitamina B1 (2.25g), vitamina B2 (7.5g), vitamina B6 (3.5g), vitamina B12 (20mg), ácido fólico (1.5g), biotina (125mg), ácido pantoténico (12.5g), niacina (45g); <sup>2</sup>Hierro (50g), zinc (50g), manganeso (110g), cobre (12g), yodo (0.30g), selenio (0.20g), Cobalto (0.20g). Cantidades adicionadas de vitaminas y minerales por tonelada de alimento.

**Cuadro 2. Score ISI de cambios histológicos intestinales.**

Órgano	Alteración	Factor de impacto	Score	Score final*	Maximum score
Duodeno	Hiperplasia epitelial	1	3	3	
	Hiperplasia de células caliciformes	2	3	6	
	Infiltración inflamatoria de lámina propia	3	3	9	18
Yeyuno	Hiperplasia epitelial	1	3	3	
	Hiperplasia de células caliciformes	2	3	6	
	Infiltración inflamatoria de lámina propia	3	3	9	18
Íleon	Hiperplasia epitelial	1	3	3	
	Hiperplasia de células caliciformes	2	3	6	
	Infiltración inflamatoria de lámina propia	3	3	9	18

\* Score final = Factor de impacto x Score. Adaptado de Kraieski *et al.*, 2017; Belote *et al.*, 2018.

**Cuadro 3. Primers usados en el análisis de PCR en tiempo real.**

Bacteria o gen	Secuencia 5'-3'	Referencia
Aflatoxina <sup>1</sup> de <i>C. perfringens</i>	F-TTACCTTTGCTGCATAATCCC	Kalender y Ertas, 2005
	R-ATAGATACTCCATATCATCCTGCT	
<i>E. coli</i>	F-GTGTGATATCTACCCGCTTCGC	Sharmila <i>et al.</i> , 2015
	R-AGAACGCTTTGTGGTTAATCAGGA	
<i>Lactobacillus reuteri</i>	F-CAGGATCGGTAATTGATG	Sattler <i>et al.</i> , 2014
	R-TGGATATGGAAGTTCGTC	
<i>Lactobacillus salivarius</i>	F-GATCGCATGATCCTTAGATGAA	Torok <i>et al.</i> , 2013
	R-GCCGATCAACCTCTCAGTTC	

<sup>1</sup>gen para toxina hemolítica y necrótica.

**Cuadro 4. Rendimiento productivo por semana, en pollos de engorda de 1 a 49 d, alimentados con dietas sorgo-soya suplementadas con eubióticos.**

Tratamientos	Consumo de alimento (g)	Ganancia de peso (g)	Índice de Conversión (g/g)	Mortalidad (%)	CV (%)
<i>0 a 7 días</i>					
Control	111	93.4	1.19	0	
Bacteriófagos	112	93.1	1.21	0.5	
Antibiótico	112	92.2	1.22	0	
Probiótico	112	94.5	1.19	0	
Simbiótico	110	90.4	1.22	0	
P	.864	.376	.782	.421	
EEM		2.1		0.1±.10	
<i>0 a 21 días</i>					
Control	897	660	1.35	2.0	12
Bacteriófagos	896	656	1.36	2.0	13
Antibiótico	908	662	1.37	2.0	12
Probiótico	898	659	1.36	2.0	11
Simbiótico	899	661	1.35	2.5	12
P	.912	.984	.970	.913	.703
EEM				2.1±.42	12±.48
<i>0 a 35 días</i>					
Control	2642	1706	1.54	3.5	
Bacteriófagos	2660	1713	1.55	3.0	
Antibiótico	2775	1794	1.54	4.5	
Probiótico	2707	1739	1.55	6.3	
Simbiótico	2715	1762	1.54	4.0	
P	.181	.081	.966	.875	
EEM				4.2±.65	
<i>0 a 49 días</i>					
Control	5352	2902b	1.84b	5.5	13
Bacteriófagos	5199	2993ab	1.73a	4.0	14
Antibióticos	5318	3054a	1.74a	7.0	14
Probiótico	5303	3059a	1.73a	9.8	12
Simbiótico	5273	3005a	1.75a	4.5	14
P	.387	.001	.0001	.762	.067
EEM	5281±25	3003±14	1.75±.01	6.1±.92	13±.32

Peso promedio inicial de 43 g con un C.V. <2%. Literales distintas (a, b, c) en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas con  $p < 0.05$ .

**Cuadro 5. Características de la canal en pollos de engorda a los 49 d, alimentados con dietas sorgo-soya suplementadas con eubióticos.**

Tratamientos	CC <sup>1</sup>	CF <sup>2</sup>	Pechuga <sup>3</sup>	Piernas con muslos <sup>4</sup>	Grasa Abdominal
Peso (g) de la canal y de los cortes primarios					
Control	2135b	2173	568	665b	17
Bacteriófagos	2222a	2256	582	671ab	14
Antibiótico	2292a	2304	588	709a	18
Probiótico	2280a	2323	595	707a	14
Simbiótico	2219a	2279	572	694ab	20
P	.005	.665	.411	.048	.167
Media±EE	3081±35	2267±27	581±10	689±9	17±.9
Rendimiento (%) de la canal y de los cortes primarios					
Control	72.5b	73.8	19.3	22.6	0.52
Bacteriófagos	73.2ab	74.3	19.2	22.1	0.45
Antibiótico	74.0a	74.4	19.0	22.9	0.51
Probiótico	73.5ab	74.9	19.2	22.8	0.44
Simbiótico	72.8ab	74.8	18.8	22.8	0.64
P	.020	.272	.371	.916	0.168
Media±EE	73.2±.15	74.4±.17	19.1±.1	22.7±.1	0.51±.02

<sup>1</sup> Canal caliente; <sup>2</sup> Canal fría; <sup>3</sup> *Pectoralis major*; <sup>4</sup> Piernas con muslos, incluyendo piel y hueso. Literales distintas (a, b, c) en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas con p<0.05

**Cuadro 6. Amarillamiento de la piel en pollos alimentados con dietas sorgo-soya suplementadas con eubióticos.**

Tratamientos	Sem 5	Sem 6	Sem 7
	<i>Lectura de amarillamiento (b) en unidades delta</i>		
Control	17.0	18.3	20.3
Bacteriófagos	16.7	19.3	19.6
Antibiótico	17.6	18.7	21.2
Probiótico	17.4	19.5	20.2
Simbiótico	16.6	19.0	21.3
P	.865	.884	.489
Media±EE	17.0±.3	19.0±.3	20.5±.3

Literales distintas (a, b, c) en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas con  $p < 0.05$ .

**Cuadro 7. Amarillamiento de la piel medido en rastro de pollos de engorda alimentados con dietas sorgo-soya suplementadas con eubióticos.**

Tratamientos	<i>In vivo</i>	Canal caliente	Canal fría
	<i>Lectura de amarillamiento (b) en unidades delta</i>		
Control	20.9	43.6	44.1
Bacteriófagos	19.7	43.1	45.4
Antibiótico	20.9	43.1	44.3
Probiótico	19.6	42.3	44.6
Simbiótico	19.7	42.1	45.2
P	.620	.540	.656
Media±EE	20.2±.3	42.8±.3	44.7±.3

Literales distintas (a, b, c) en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas con  $p < 0.05$ .

**Cuadro 8. Rendimiento de hígado en pollos de engorda a los 21, 35 y 49 d, alimentados con dietas sorgo-soya suplementadas con eubióticos.**

Tratamientos	21 d	35 d	49 d
Control	3.1	2.2	1.7
Bacteriófagos	3.2	2.2	1.7
Antibiótico	3.0	2.2	1.8
Probiótico	3.2	2.2	1.8
Simbiótico	3.2	2.2	1.9
P	.409	.972	.174
Media±EE	3.1±.04	2.2±.03	1.8±.02

Literales distintas (a, b, c) en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas con  $p < 0.05$ .

**Cuadro 9. Morfología intestinal en pollos de engorda alimentados con dietas sorgo-soya suplementadas con eubióticos.**

Tratamientos	DUODENO			YEYUNO			ÍLEON			INTESTINO DELGADO				
	g	cm	g/cm	g	cm	g/cm	g	cm	g/cm	G	cm	g/cm	%PV	g/100 g PV
A los 21 d														
Control	6.4	23.8	0.27	12.0	56.9	0.21	7.8	53.6	0.14b	26.2	134.3	0.19	4.1	21.2
Bacteriófagos	6.4	22.0	0.30	11.9	54.6	0.21	9.1	50.9	0.18ab	27.4	127.5	0.22	4.2	20.0
Antibiótico	7.2	23.2	0.30	12.8	55.2	0.23	9.9	48.1	0.20a	29.9	126.5	0.23	4.3	18.4
Probiótico	6.6	22.5	0.29	10.5	53.0	0.20	8.5	51.0	0.17ab	25.7	126.4	0.21	4.0	19.9
Simbiótico	7.6	23.9	0.32	12.4	59.4	0.21	9.6	53.9	0.18ab	29.6	137.1	0.22	4.2	19.6
P	.425	.593	.527	.382	.391	.837	.190	.347	.021	.307	.294	.267	.712	.201
Media±EE	6.8±.23	23.1±.43	0.30±0.01	11.9±.37	55.8±1.06	0.21±0.01	9.0±.30	51.5±.99	0.18±0.01	27.8±.07	130.4	0.21±0.01	4.1±.07	19.8±.036
A los 49 d														
Control	23.6a	27.0ab	0.89	40.9ab	68.3	0.61a	37.4a	73.4	0.51a	101.9a	168.8	0.60a	2.96	4.9
Bacteriófagos	22.0ab	25.4b	.88	36.5ab	65.5	0.56ab	32.4bc	72.9	0.45abc	91.0ab	164.0	0.56ab	2.8	5.0
Antibiótico	22.1ab	26.5ab	.84	42.6a	73.4	0.58ab	36.8ab	76.1	0.50ab	101.5a	175.9	0.58a	2.9	5.0
Probiótico	20.5b	26.4ab	.78	35.1b	70.8	0.50b	29.4b	70.3	0.42b	85.0b	167.5	0.51b	2.7	5.3
Simbiótico	23.5a	29.6a	.80	38.2ab	70.7	0.54ab	30.7b	71.3	0.43bc	92.4ab	171.6	0.54ab	2.9	5.4
P	0.051*	0.020	.130	.016	.220	.031	.000	.512	.001	.000	.420	.003	.078	.188
Media±EE	22.4±0.4	27.0±0.4	.84±.02	38.5±0.8	69.6±1.1	0.55±0.01	33.1	72.7	0.46±0.01	94.0±1.5	169.3	0.56±0.01	2.8±.04	5.1±0.08
	24%	16%		41%	41%		35%	43%		100%	100%			

Literales distintas (a, b, c) en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas con  $p < 0.05$ .

**Cuadro 10. Histometría intestinal en pollos de engorda a los 49 d de edad, alimentados con dietas sorgo-soya suplementadas con eubióticos.**

Tratamiento	DUODENO					YEYUNO					ILEON				
	LV	AV	PC	Área	V:C <sup>1</sup>	LV	AV	PC	Área	V:C	LV	AV	PC	Área	V:C
A los 35 días de edad															
Control	2145	198	332	.421	6.5	1158b	160	213ab	.187	5.6ab	879	146	180	.128	5.1
Bacteriófagos	1936	184	333	.362	6.0	1236ab	159	235ab	.198	5.4ab	864	156	171	.135	5.1
Antibiótico	1959	192	290	.378	6.8	1186ab	186	248a	.222	4.8b	831	148	178	.124	4.9
Probiótico	1932	188	291	.366	6.8	1157b	160	190b	.183	6.1 <sup>a</sup>	801	153	164	.123	4.9
SImbiótico	2051	188	290	.383	7.3	1344a	150	230ab	.201	5.9ab	828	153	174	.128	4.8
P	.282	.930	.189	.652	.138	.013	.180	.010	.443	.035	.579	.846	.852	.869	.950
Media±EE	2004±36	190±5	307±8	.382±.013	6.7±.18	1217±20	163±4.8	223±5	.198±.007	5.6±.14	841±16	151±3.2	173±4.8	.128±.003	5.0±.15
A los 49 días de edad															
Control	1965c	209b	266ab	.410c	7.6b	1533ab	184	190ab	.282b	8.2	1158a	170ab	160ab	.197a	7.3a
Bacteriófagos	2122bc	255a	234b	.536b	9.1a	1501b	209	197ab	.313ab	7.7	1095ab	145b	184a	.157b	6.0b
Antibiótico	2032bc	267a	260b	.545b	7.9ab	1448b	191	180b	.275b	8.2	940b	171ab	180ab	.162ab	5.4b
Probiótico	2166b	275a	264ab	.596ab	8.3ab	1705a	201	214a	.347a	8.0	964b	193a	154b	.185ab	6.3ab
SImbiótico	2441a	274a	303a	.677a	8.1ab	1510b	194	188ab	.293ab	8.3	1076ab	172ab	171ab	.183ab	6.3ab
P	.000	.000	.001	.000	.021	.004	.149	.048	.012	.756	.002	.001	.023	.030	.000
Media±EE	2145±28	256±5.7	266±5	.553±.016	8.2±.1	1540±22	196±3	194±3.8	.302±.007	8.0±.1	1047±20	170±3.7	170±3.4	.177±.004	6.3±.1

<sup>1</sup>Relación V:C = relación largo de vellosidad y profundidad de cripta. Literales distintas (a, b, c) en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas con p<0.05

**Cuadro 11. Conteo de células caliciformes en pollos de engorda a los 49 d, alimentados con dietas sorgo-soya suplementadas con eubióticos.**

Tratamiento	DUODENO		YEYUNO		ILEON	
	E: G <sup>2</sup>	G:100 E <sup>3</sup>	E: G	G:100 E	E: G	G:100 E
Control	5.0abc	21.2ab	3.7	28.9	3.3cd	31.9ab
Bacteriófagos	4.3c	24.3a	3.4	30.8	2.9d	36.7 <sup>a</sup>
Antibiótico	5.3ab	19.5b	3.5	29.8	3.9bc	26.8bc
Probiótico	5.5a	19.1b	4.1	25.8	4.8a	22.8c
Simbiótico	4.6bc	22.8ab	3.9	26.9	4.3ab	25.3c
P	.001	.001	.070	.136	.000	.000
Media±EE	4.9±.11		3.7±.08	28.5±.69	3.9±.12	28.7±.89

<sup>1</sup>Relación entre el número de células epiteliales por cada célula caliciforme. <sup>2</sup>Relación número de células caliciformes por cada 100 células epiteliales. Literales distintas (a, b, c) en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas con p<0.01.

**Cuadro 12. Suma total del score de cambios histológicos en el duodeno, yeyuno e íleon, de pollos tratados con eubióticos, a los 35 y 49 d de edad.**

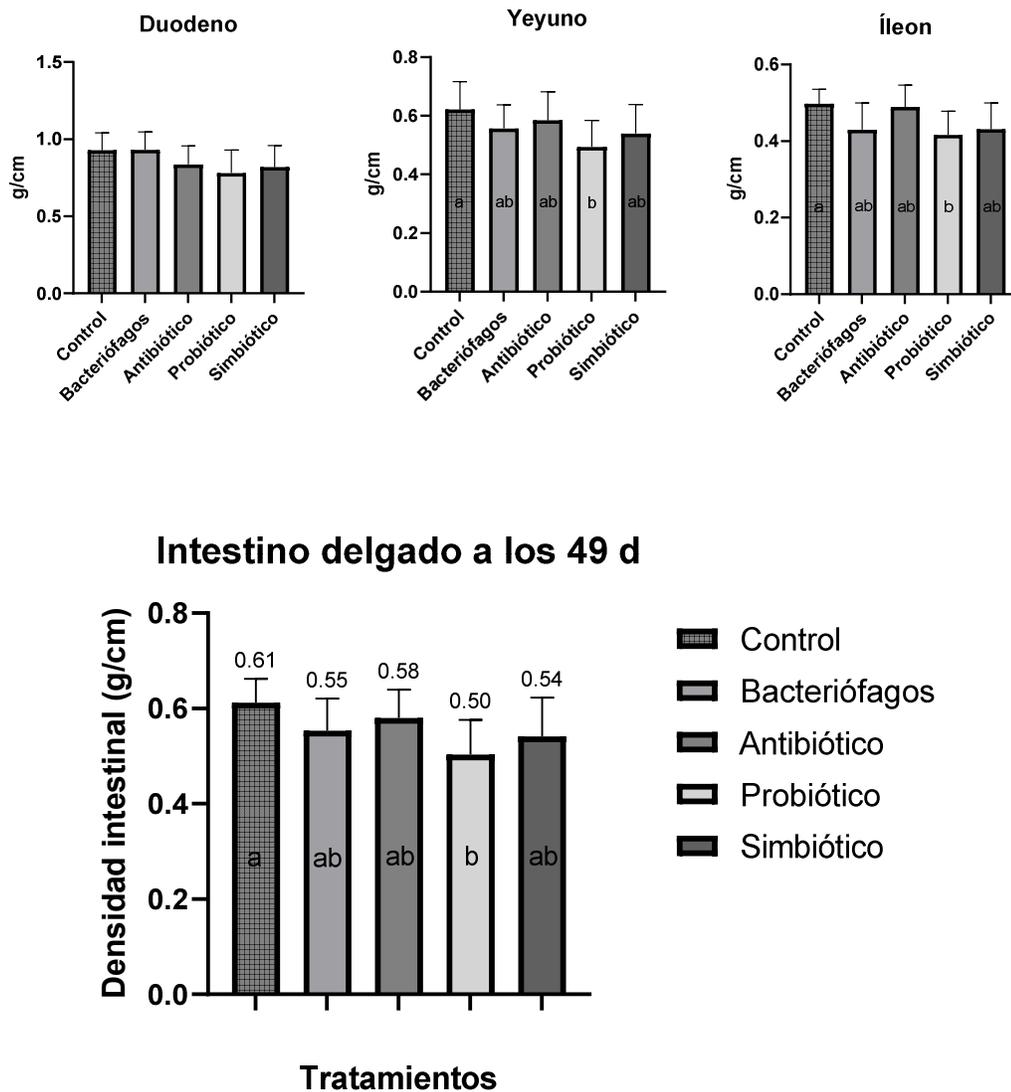
Tratamientos	Duodeno	Yeyuno	Íleon
A los 35 días			
Control	3.9b	1.5c	5.2b
Bacteriófagos	9.4a	6.5 <sup>a</sup>	9.5 <sup>a</sup>
Antibiótico	5.1ab	5.6ab	9.4 <sup>a</sup>
Probiótico	7.9a	4.5b	6.3b
Simbiótico	5.9b	5.9ab	8.8 <sup>a</sup>
P	.000	.000	.000
Media±EE	6.7±0.2	4.5±0.2	7.5±0.02
A los 49 días			
Control	6.4b	7.2b	8.7 <sup>a</sup>
Bacteriófagos	10.8a	9.4 <sup>a</sup>	8.0a
Antibiótico	9.2a	7.3b	7.4ab
Probiótico	9.9a	7.9ab	7.7ab
Simbiótico	9.7a	7.4b	5.8b
P	.000	.019	.002
Media±EE	8.9±0.2	7.7±0.2	7.6±0.2

Metodología adoptada de Kraiesky et al., 2017 y Belote et al., 2018. Literales distintas (a, b, c) indican diferencias estadísticas (P<0.01).

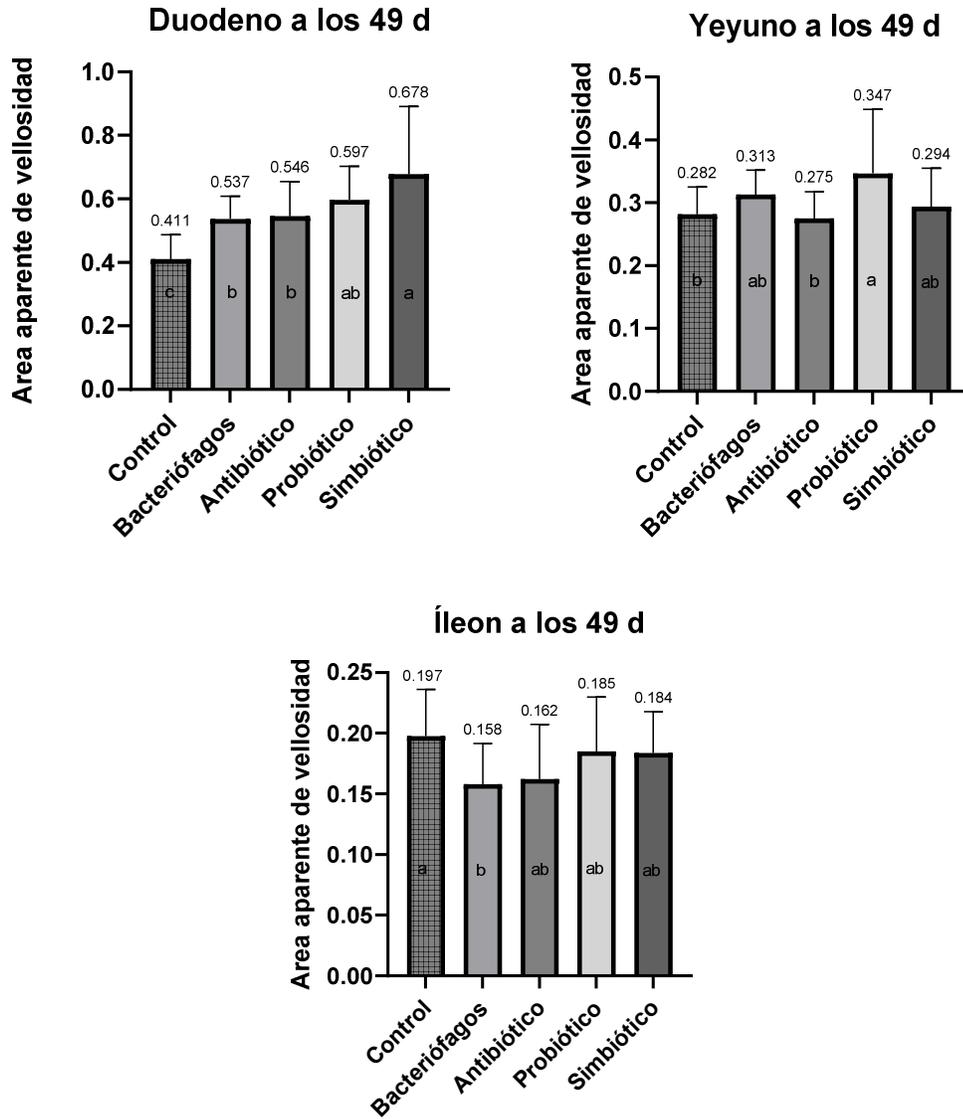
**Cuadro 13. Cambios histológicos en duodeno, de pollos tratados con eubióticos a los 49 d de edad.**

Tratamientos	HE <sup>1</sup>	HCC <sup>2</sup>	IILP <sup>3</sup>	Score total
Control	1.14b	0.42b	4.9b	6.4b
Bacteriófagos	1.91a	1.76 <sup>a</sup>	7.15 <sup>a</sup>	10.8 <sup>a</sup>
Antibiótico	1.41b	1.72 <sup>a</sup>	6.05ab	9.2 <sup>a</sup>
Probiótico	1.50b	1.54 <sup>a</sup>	6.81 <sup>a</sup>	9.9 <sup>a</sup>
Simbiótico	1.49b	1.75 <sup>a</sup>	6.47 <sup>a</sup>	9.7 <sup>a</sup>
P	.000	.000	.000	.000
Media±EE	1.5±0.2	1.1±0.2	6.2±0.02	9.2

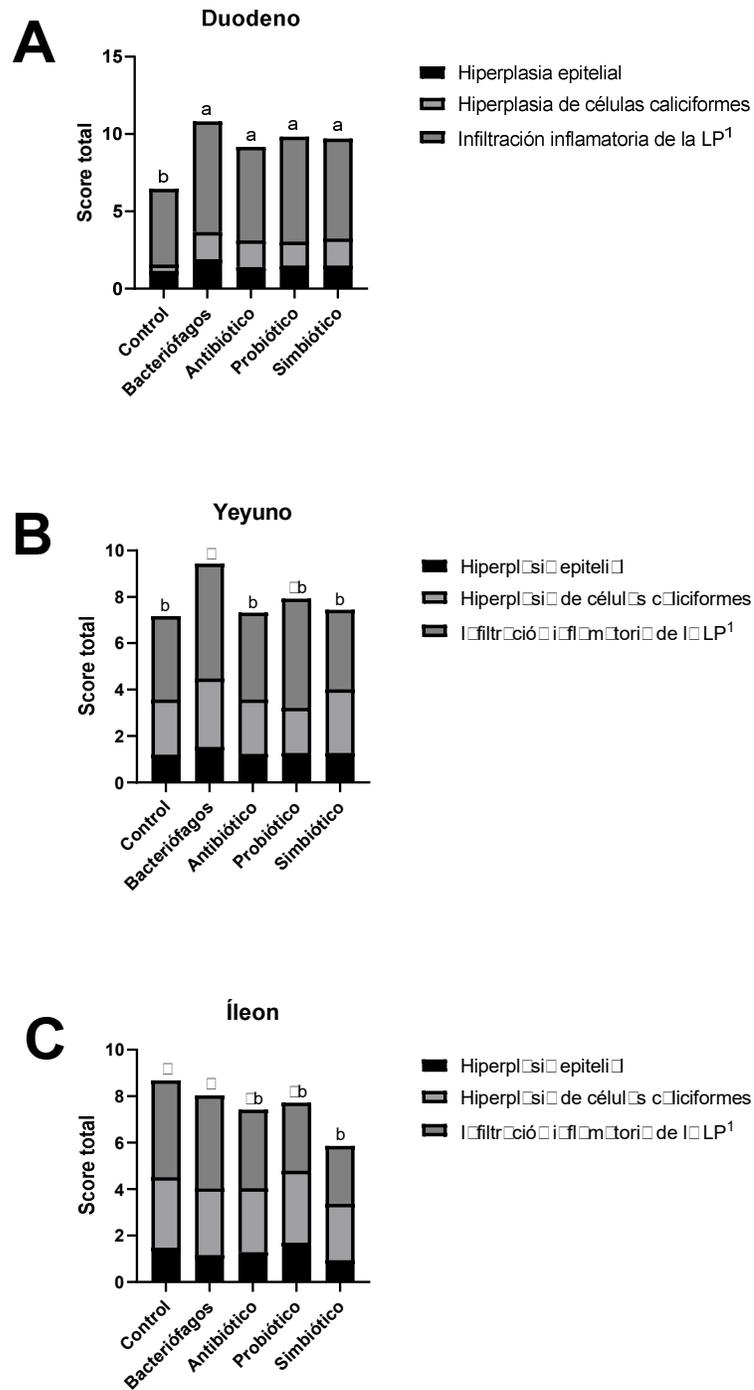
<sup>1</sup>Hiperplasia epitelial, <sup>2</sup>Hiperplasia de células calciformes, <sup>3</sup>Infiltración inflamatoria de la lámina propia. Metodología adoptada de Kraiesky et al., 2017 y Belote et al., 2018. Literales distintas (a, b, c) indican diferencias estadísticas (P<0.01).



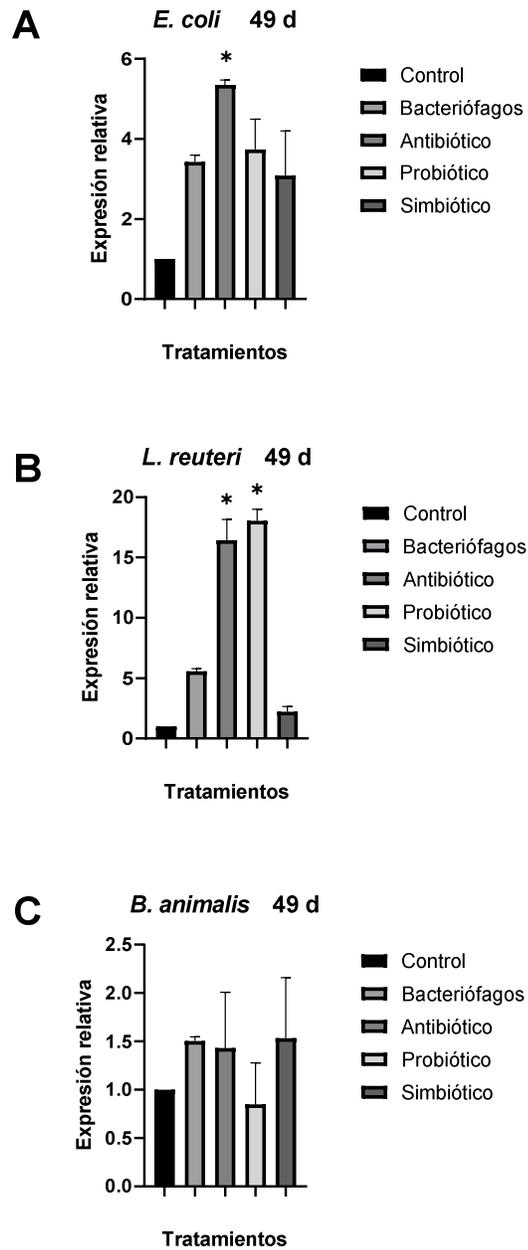
**Figura 1** – Densidad intestinal (g/cm) en pollos de engorda a los 49 días de edad alimentados con dietas sorgo-soya suplementadas con aditivos eubióticos. Líneas verticales asociadas con barras del histograma representan el error estándar de la media para el score histológico total. Literales distintas (a, b) indican diferencias significativas ( $P < 0.01$ ).



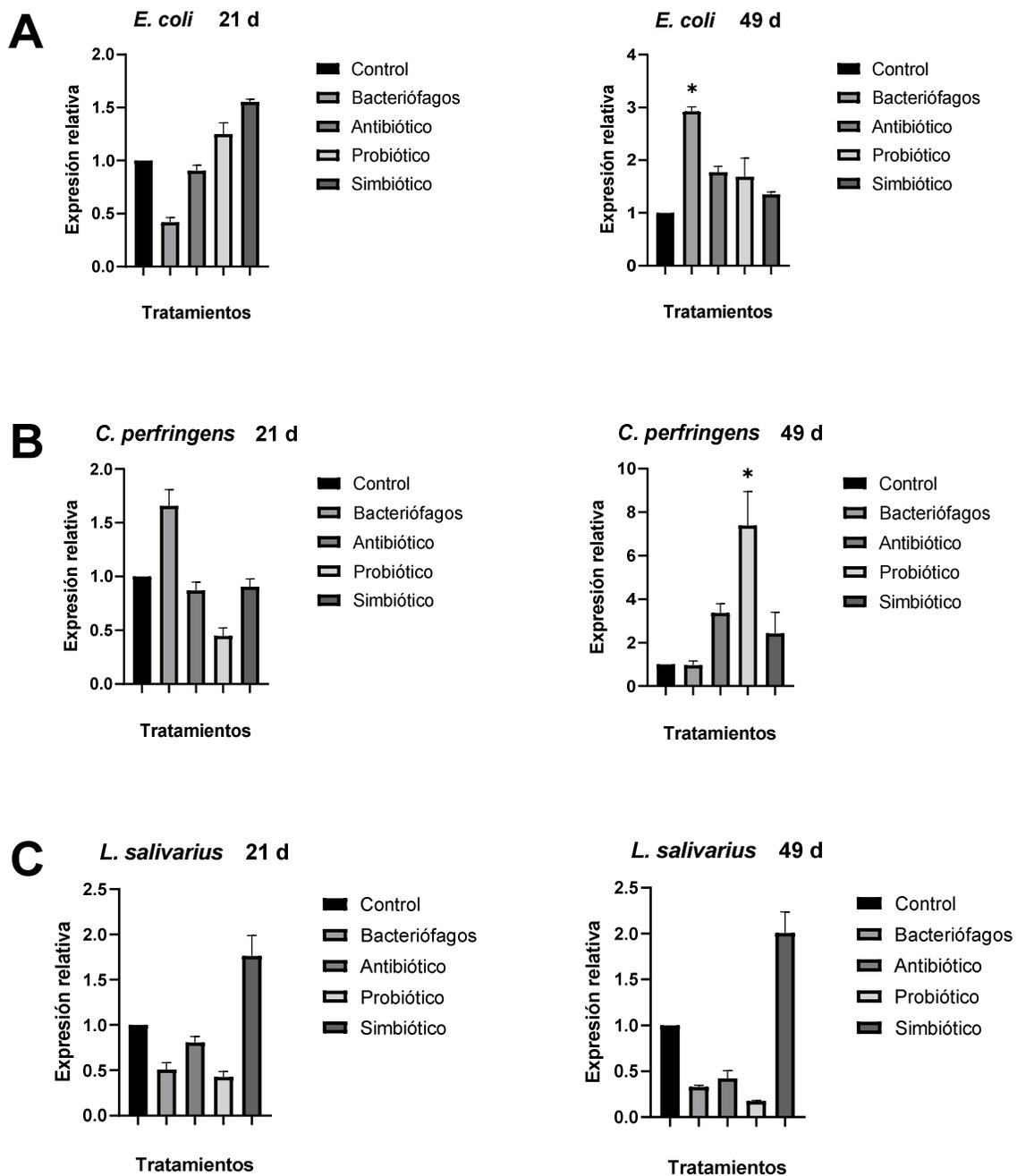
**Figura 2.** Área de vellosidad (mm<sup>2</sup>) en duodeno, yeyuno e íleon de pollos de 49 d, alimentados con dietas sorgo-soya suplementadas con aditivos eubióticos. Literales distintas (a, b, c) indican diferencias estadísticas con  $p < 0.01$ .



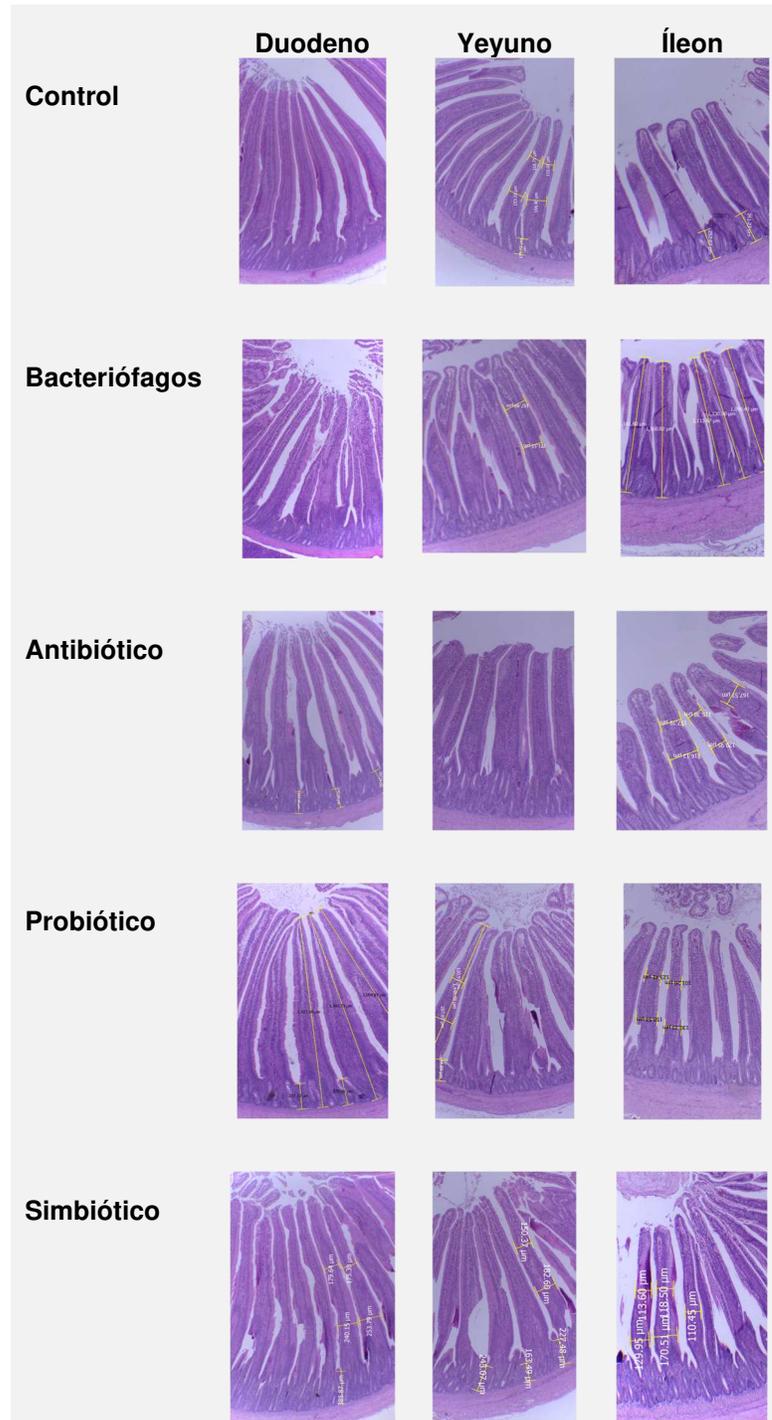
**Figura 3.** Suma total del score de cambios histológicos en: A) Duodeno, B) Yeyuno e C) Íleon, de pollos alimentados con dietas sorgo-soya suplementadas con eubióticos a los 49 días de edad. Literales distintas (a, b) indican diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ ).



**Figura 4.** Efecto de los aditivos eubióticos sobre la expresión relativa mRNA de: A) *E. coli*; B) *L. reuteri* y C) *B. animalis* en íleon de pollos alimentados con dietas sorgo-soya suplementadas con aditivos eubióticos, a los 49 d de edad.

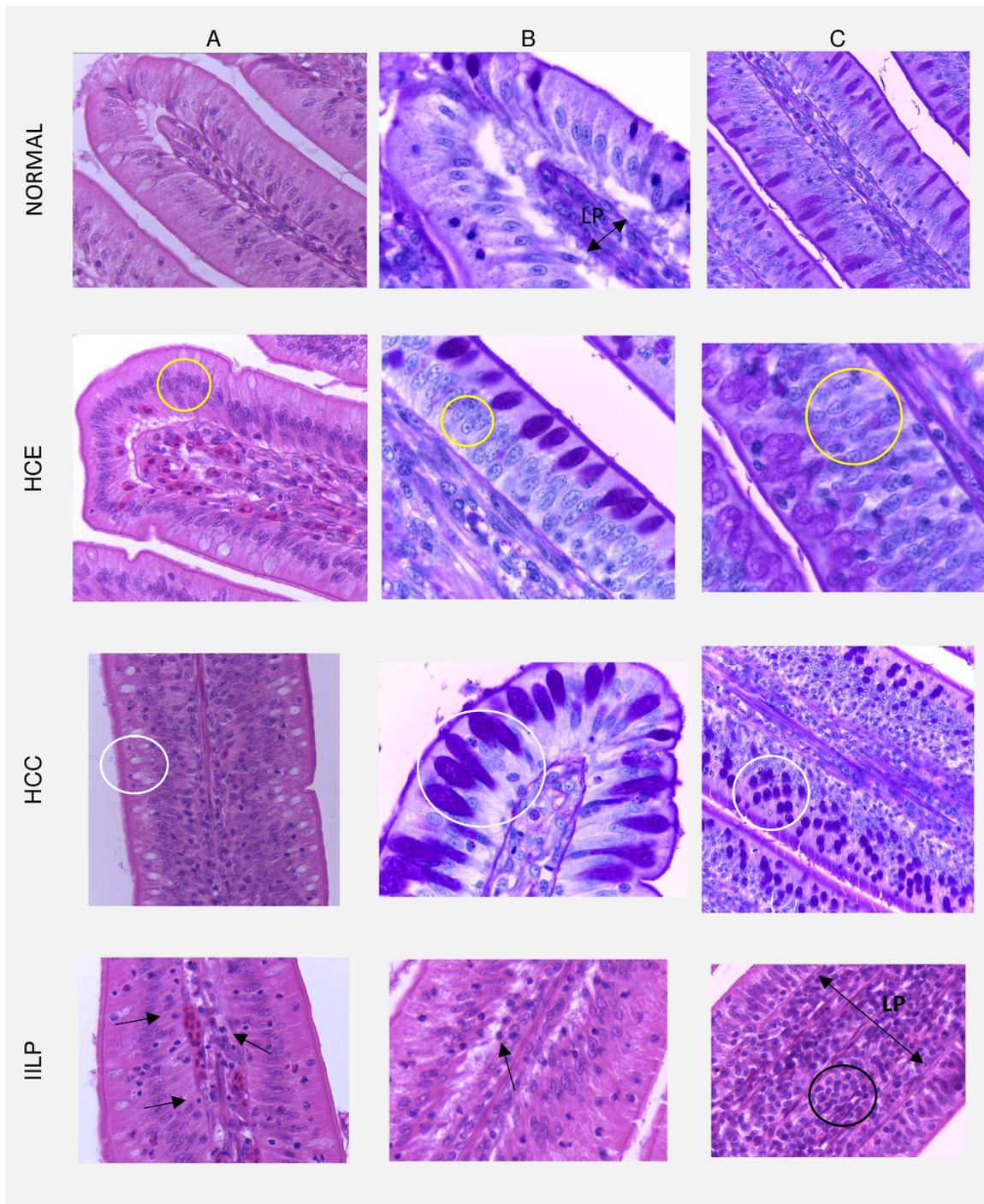


**Figura 5.** Efecto de los aditivos eubióticos sobre la expresión relativa mRNA de: A) *E. coli*; B) *C. perfringens*; C) *L. salivarius* en ciegos de pollos alimentados con dietas sorgo-soya suplementadas con aditivos eubióticos, a los 21 y 49 días de edad. Líneas verticales asociadas a las barras del histograma representa el error estándar de las medias. Los asteriscos indican diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ ).



**Figura 6.** Vellosidades de pollos alimentados con dietas sorgo-soya suplementadas con eubióticos, a los 21 días de edad (H&E; 100x).





**Figura 8.** Fotomicrografía de secciones histológicas de duodeno (400x). Alcian Blue fue usado para teñir las células caliciformes. Estructura histológica normal (primera fila) de la vellosidad, mostrado en A, B y C; HCE= Hiperplasia de células epiteliales (círculo amarillo) mostrado en A, B y C; HCC= Hiperplasia de células caliciformes (círculo blanco) en el epitelio de la vellosidad, mostrado en A, B y C; IILP= Infiltración inflamatoria de la lámina propia (LP) mostrado en A y B (flechas negras) e indicado en C (círculo), así como ancho de la lámina propia.

# 11. ARTÍCULO I Aceptado para su publicación en Brazilian Journal of Poultry Science.



Brazilian Journal of Poultry Science

Revista Brasileira de Ciência Avícola

ISSN 1516-635X/2023 / v.25 / n.1 / 001-010

<http://dx.doi.org/10.1590/1806-9061-2021-1608>

Original Article

## Performance, Gut Integrity, Enterobacteria Content in Ceca of Broiler Fed Different Eubiotic Additives

### ■ Author(s)

García-Reyna A<sup>1</sup>  <https://orcid.org/0000-0001-7049-4243>  
Cortés-Cuevas A<sup>1</sup>  <https://orcid.org/0000-0002-9509-3750>  
Juárez-Ramírez M<sup>2</sup>  <https://orcid.org/0000-0002-1440-2479>  
Márquez-Mota CC<sup>3</sup>  <https://orcid.org/0000-0002-4311-381X>  
Gómez-Verduzco G<sup>4</sup>  <https://orcid.org/0000-0002-7630-5316>  
Arce-Menasal P<sup>5</sup>  <https://orcid.org/0000-0002-0917-9524>  
Avila-González E<sup>6</sup>  <https://orcid.org/0000-0002-6036-1321>

<sup>1</sup> Centro de Enseñanza, Investigación, Extensión y Producción Avícola, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, CdMx.  
<sup>2</sup> Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, CdMx.  
<sup>3</sup> Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, CdMx.  
<sup>4</sup> Departamento de Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, CdMx.  
<sup>5</sup> Departamento de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, CdMx.  
<sup>6</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

### ■ Mail Address

Corresponding author e-mail address  
Arturo Cortés-Cuevas  
Manuel M. López s/n, Santa Ana Poniente,  
Tláhuac, 13300 CDMX, México, Zip code:  
04510 (CEIEPAV-FMVZ-UNAM).  
Phone: (52) 58-63-42-39  
Email: [cortescuevasarturo@yahoo.com](mailto:cortescuevasarturo@yahoo.com)

### ■ Keywords

Antibiotics, Bacteriophages, Probiotic, Symbiotic, Poultry Nutrition.



Submitted: 06/December/2021  
Approved: 01/November/2022

### ABSTRACT

An experiment was carried out to study the effect of different eubiotics on productive characteristics, intestinal integrity, as well as the content of enterobacteria in the cecum of broiler chickens. A completely randomized design with five treatments and 8 replicates of 25 birds each was used. In total 1000 mixed broiler chickens from Ross308 strain, one day old were obtained from a commercial hatchery. The birds were housed on concrete floors in a conventional house. A sorghum+soybean meal control diet was used, to which the additives under study were added. The treatments were distributed as follows: T1 = Control diet without antibiotic or eubiotic; T2 = T1 + bacteriophages; T3 = T1 + antibiotic; T4 = T1 + probiotic; T5 = T1 + symbiotic. The results obtained at 49 days of age for weight gain and feed conversion rate improved ( $p < 0.05$ ) with the addition of the antibiotic and eubiotics. A lower ( $p < 0.05$ ) intestinal density was observed with the probiotic. The height, width, and area of villi in duodenum was higher ( $p < 0.05$ ) when antibiotic and eubiotics were included. In the histological score, in duodenum, the antibiotic and eubiotics resulted with a higher score ( $p < 0.05$ ), associated to a physiological and controlled inflammation response that allowed improving productivity. Finally, the relative expression of enterobacteria, such as *Lactobacillus salivarius*, allowed associating positive changes in the microbiome and better productive parameters when including the symbiotic, with comparable results to the antibiotic when including the eubiotics.

### INTRODUCTION

Currently, the development of feed additives as alternatives to the use of antibiotic growth promoters (AGP) in broiler diets and other productive species is still under investigation. Although several studies show that it is complicated to match the productive and economic results obtained with the use of antibiotics, the implications of continuing to use them are also known; environmental contamination, risks to aquatic organisms and, of course, antimicrobial resistance, which implies a global challenge in the control of infectious diseases (Sethiya, 2016; Al-Khalaifah, 2018; Oviedo-Rondón, 2019; Selaledi *et al.*, 2020). The topic of intestinal health has maintained interest in those additives classified as biomodulators of the intestinal microbiota or also called eubiotics, derived from eubiosis, understood as a balance of the intestinal microbial ecosystem (Iebba *et al.*, 2016; Oviedo-Rondón, 2019) and that their use promotes among other things animal welfare and food safety (Sethiya, 2016; Oviedo-Rondón, 2019). Some of these additives have been known for several decades, such as probiotics, prebiotics, organic acids, phytobiotics, enzymes (Caly *et al.*, 2015; Sethiya, 2016) and recently the use of new commercial alternatives, such as bacteriophages. Among them, probiotics and symbiotics (probiotic+prebiotic), are



widely used as AGP alternatives in poultry production, for its low production cost (Oviedo-Rondón, 2019). These additives promote the proliferation of desirable bacteria in the gut by competitive exclusion, competing for nutrients, immunomodulation, production of antimicrobial compounds and of course, growth of the probiotic organism, by providing a substrate available to the probiotic fermentation in case of the prebiotic (Roberts *et al.*, 2015; Sethiya, 2016; Bajagai *et al.*, 2016; Oviedo-Rondón, 2019). As for bacteriophages, models have already been used to investigate the dynamics of the phage-bacteria ecosystem (killing, lysogenization, passage of the bacteriophage from one strain to another), as described by De Paep (2014). However, despite the research done on these alternatives there is much to be understood and tested regarding their effects on intestinal health and integrity, by reduction of the inflammatory response and better immune response against pathogenic bacteria, without affecting productive performance (M'Sadeq *et al.*, 2015; Sethiya, 2016; Tarradas *et al.*, 2020). Therefore, within eubiotic nutrition, what is sought is the combination of additives for each circumstance, which allows promoting the presence of a balanced and "healthy" intestinal microbiome (Yasar *et al.*, 2017) as well as the integrity of the mucosal barrier, optimization of gut morphology and digestibility, reduction in nutrient excretion and intestinal immunomodulation that help control inflammation (Oviedo-Rondón, 2019; Tarradas *et al.*, 2020) and prevent the transition from physiological to pathological inflammation, which normally reduces productivity. Therefore, the present study was conducted to evaluate the effect of adding eubiotics to the diet of broilers on productive performance, carcass characteristics, intestinal integrity, and the count of some enterobacteria in ceca.

## MATERIALS AND METHODS

The research was carried out at the Center for Teaching, Research, Extension and Poultry Production of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics of the UNAM. In total 1000 mixed broiler chickens from Ross308 strain, one day old were obtained from a commercial hatchery. All chicks were received with an average initial weight of 43 g, vaccinated against Gumboro-Marek's disease and later against Newcastle disease at 10 days of age. The birds were randomly distributed in 40 compartments; they were housed for 7 weeks in a natural environment house with cement floor pens, wood-shavings litter, with a density of 10 birds/m<sup>2</sup> and tunnel breeding. They were kept under a

natural light program, with an average of 11 hours of light per day. All animal care and technical procedures were approved by the Institutional Subcommittee for the Care and Use of Experimental Animals (protocol DC-2018/2-5) of the faculty mentioned above.

### Experimental design and diets

A completely randomized design was used with five treatments with 8 replicates of 25 birds each. A sorghum+soybean meal control diet was used to which the additives under study were added, considering 3 feeding phases: Initiation (1-21 days of age), Growing (22-35 days of age) and Finishing (36-49 days of age). The treatments were distributed as follows: T1 = control diet without antibiotic or eubiotic; T2 = T1 + bacteriophage (500 g/Ton); T3 = T1 + antibiotic (300 g/Ton); T4 = T1 + probiotic (100 g/Ton); T5 = T1 + symbiotic (500 g/Ton). The composition of the experimental control diet is shown in Table 1.

**Table 1** – Composition of the control diet used in the experiment.

Ingredient	Initiation	Growing	Finishing
	1 - 21 d	22 - 35 d	36 - 49 d
Sorghum	583.0	624.15	675.31
Soybeanmeal	328.7	277.50	226.80
Vegetable oil	35.08	45.71	48.23
Ortophosphate	18.79	16.61	15.41
Calcium carbonate	16.79	14.01	13.47
Salt	4.350	3.840	3.860
DL-Methionine 80%	4.130	4.005	3.610
L-Lysine HCl 78%	4.110	3.460	2.940
L-Threonine	1.900	1.560	1.220
Cholinechloride + vit*/min**	2.500	2.500	2.500
Nicarbazin	0.500	0	0
Salinomycin	0	0.500	0.500
Antioxidant	0.150	0.150	0.150
Pigment	0	6.00	6.00
Total (kg)	1000	1000	1000
Nutrientcomposition			
ME, Kcal/kg	2988	3176	3176
Protein %	21.00	18.00	17.00
Lysine %	1.22	1.04	0.99
Met+Cis %	0.91	0.82	0.78
Threonine %	0.93	0.72	0.71
Tryptophan %	0.27	0.23	0.22
Arginine %	1.34	1.13	1.03
Calcium %	1.05	0.90	0.85
Phosphorus disp. %	0.50	0.45	0.42
Na %	0.22	0.19	0.18
Cl %	0.20	0.20	0.20

\*Vitamin A (12,000,000 IU), vitamin D3 (2,500,000 UIP), vitamin E (15,000 IU), vitamin K (2.0g), vitamin B1 (2.25g), vitamin B2 (7.5g), vitamin B6 (3.5g), vitamin B12 (20mg), folicacid (1.5g), biotin (125mg), pantothenicacid (12.5g), niacin (45g); \*\*Iron (50g), zinc (50g), manganese (110g), copper (12g), iodine (0.30g), selenium (0.20g), cobalt (0.20g).



Water and feed were supplied *ad libitum*. All additives were commercial products in powder form and were added to the diets at the levels recommended by the manufacturers. The bacteriophage-containing product was obtained from an additive manufacturing company (CTC Bio Inc.) that includes a cocktail of lyophilized bacteriophages specific for *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, Cholerasuis and Derby, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (k88, k99 and f41) and *Clostridium perfringens* type A and C. The titers of each bacteriophage in the bacteriophage cocktail are  $10^9$  pfu/g cocktail. The antimicrobial product was bacitracin-zinc and was added at 30 ppm. The probiotic contained  $10^7$  CFU/g of *Bacillus Subtilis* (BaymixGrobig®). The symbiotic product (PoultryStar® ME, BIOMIN), consisted of the sum of multispecies probiotic ( $1.3 \times 10^{11}$  CFU/g *Enterococcus faecium*,  $5.0 \times 10^{10}$  CFU/g *Pediococcus acidilactici*,  $2.1 \times 10^{10}$  CFU/g *Bifidobacterium animalis*,  $5.0 \times 10^9$  CFU/g *Lactobacillus reuteri*,  $5.0 \times 10^9$  CFU/g *Lactobacillus salivarius*) and a prebiotic (Inulin).

#### Performance and Carcass parameters

At the end of each week, the body weight gain (WG) and feed intake (FI) of the birds of each treatment was obtained, as well as the feed conversion ratio (FCR) and percentage of general mortality. At 49 days of age, 26 birds per treatment were selected, identified, weighed, and slaughtered after an 8-hour fast. Each bird was subjected to the slaughter protocol of the processing plant of the aforementioned center: 1) hanging and electrically stunned, under the parameters of 25 V, 0.25 A and 460 Hz of direct current, pulsed type; 2) the slaughter was performed by unilateral neck cutting in order to be bled out for 2 minutes; 3) scalded in water at 53°C for one minute; 4) mechanical plucking and manual evisceration. The weights of the carcass, abdominal fat, breast muscle (*Pectoralis major*) and legs (thighs and drumsticks) were obtained. For each case, the yields of carcass, abdominal fat and primal cuts were determined on a live weight basis. Skin pigmentation (yellowness) was measured in the lateral apterium region, in the live chicken and in the carcass, using a Minolta CR-400 reflectance colorimeter.

#### Histological preparation

At 49 days, from each treatment, one chicken per replicate (8 birds per treatment) was selected and the intestine was dissected entirely. Intestinal segment samples approximately 2 cm long were obtained from the duodenum (the midpoint of the pancreatic loop).

All samples were washed with 0.9% saline and fixed in 10% neutral-buffered formalin solution for a minimum period of 24 hours at 4°C; they were subsequently processed by routine histological techniques (Laudadio *et al.*, 2012); paraffin embedding and cross-sectioning of the segments at 5  $\mu$ m thickness. Subsequently, two stains were used; hematoxylin-eosin (HE) and Alcianblue (AB)/periodic acid-Schiff (PAS); HE staining was used for gut morphological measurements and ISI histological analysis, while PAS-AB staining was used in the goblet cell counts of duodenum in accordance to Setiawan *et al.* (2018). Ten well-oriented villi and 10 crypts of Lieberkühn were measured per cross-section of each intestinal segment. All the observations and measurements were performed with an optical microscope (LEICA MC170HD®).

#### Intestinal morphometry measurement

The small intestine (from the end of the gizzard to 1 cm above the ileocecal junction) of each bird was excised and weighed. The length of the small intestine was obtained with a tape measure. Intestinal mass per unit of length defined as “intestinal density” was calculated as the ratio between absolute weight in grams and length in centimeters of the small intestine (g/cm) according to Alshamy *et al.* (2018) and Riahi *et al.* (2020). In the duodenum, the following morphometric variables were determined: height ( $\mu$ m) and width ( $\mu$ m) of intestinal villi, crypt depth ( $\mu$ m) and goblet cell count. Villus height (LV) was measured as the distance from the tip of the villus to the transition region of the crypt and villus. Measurement of intestinal crypt depth was taken from the base of the villus to the submucosa. The apparent villus surface area ( $\text{mm}^2$ ) was calculated using the following formula: [(villus width at one-third + villus width at two-thirds)  $\times$  2<sup>-1</sup>  $\times$  villus height] used by Laudadio *et al.* (2012). Villus: crypt ratio was calculated dividing villus height by crypt depth. The number of goblet cells per 100 intestinal epithelial cells in intestinal sections was determined (Sun *et al.*, 2013).

#### Intestinal histological changes

Three histological parameters were evaluated (epithelial hyperplasia, goblet cell hyperplasia and inflammatory cell infiltration of the lamina propria by lymphocytes) that were adapted to that described by Kraieski *et al.* (2017), in their ISI methodology (I See Inside). In this methodology, an impact factor (IF) is defined for each histological alteration in the intestine, according to the reduction in functional capacity, considering 3 features with impact factor 1,



2 and 3: Epithelial cell hyperplasia (IF = 1), Goblet cell hyperplasia (IF = 2), Inflammatory cell infiltration (IF = 3). IF = 3 has the greatest impact on organ function. Likewise, the degree of intensity or frequency observed was considered, designated as score of the alteration in each tissue qualifying from 0 to 3: 0 (absence of alteration or frequency observed), 1 (alteration up to 25% of the area or frequency observed), 2 (alteration from 25 to 50% of the area or frequency observed) and 3 (alteration extended in more than 50% of the area or frequency observed). To obtain the final value of the ISI index, the IF of each alteration is multiplied by the respective score number, and the result of all alterations are summed according to the formula  $ISI = \sum (IF \times S)$ , where IF = impact factor and S = Score. For our evaluation scale the total score ranges from 0 to 18.

#### Protocol for DNA extraction in cecal content

At day 49, 8 chickens per treatment were sacrificed and cecal content samples were collected from each chicken. The samples were placed in sterile 2 ml eppendorf vials and refrigerated for a maximum of 1.5 h. then, were frozen at -80°C until DNA extraction, whose procedure was an adaptation of the method of Wilson (1997). For this, 200 mg of frozen cecal contents were suspended in 1 mL of PBS (phosphate buffered saline), homogenized, and centrifuged at 389 × g for 10 min at room temperature. The supernatant was discarded, and the pellet was suspended in 567 µL of TE (Tris/EDTA) buffer and 50 µL of lysozyme (10 mg/mL) was added and incubated at 37°C for 30 min. After this time, 30 µL of 10% SDS (sodium dodecyl sulfate) and 4 µL of proteinase K (20 mg/mL) were added and incubated for 1 h at 56°C. After this time, 100 µL of 5 M NaCl was added followed by 100 µL of CTAB/NaCl solution and incubated for 10 min at 65°C, then 80 µL of chloroform/isoamyl alcohol was added and centrifuged at 19064 × g for 10 min. The supernatant was taken, leaving the interphase behind. The volume was equalized with phenol/chloroform/isoamyl alcohol (PCIA). After centrifugation (19064 × g for 10 min), three phases were obtained: organic phase, interphase and aqueous phase (supernatant with DNA). Only the aqueous phase was taken. 200 µL of chloroform was added, mixed and incubated for 10 min at room temperature. Centrifuged at 19064 × g for 15 min and the supernatant was recovered. Then 500 µL of cold isopropanol was added, mixed and

incubated in freezing for 24 h. It was then centrifuged at 19064 × g for 10 min and the isopropanol was decanted. Two washes were made with 300 µL of cold 70% ethanol to remove residual CTAB, centrifuging at 9726 × g for 5 min. All centrifugations were performed on Thermo Scientific Heraeus Primo R. The ethanol was removed, and the DNA pellet was allowed to dry at room temperature for 30 min. Finally, the pellet was suspended in 100 µL of DNase/RNase-Free Water and frozen until DNA concentration was quantified using a spectrophotometer (NanoDrop2000, Thermo Scientific).

#### Real-time PCR procedure

A total volume of 20 µL of reaction mixture was prepared containing 10 µL of reagent (Kappa Sybr® Fast DNA polymerase), 0.8 µL of lyophilized primers (forward and reverse), 2 µL of DNA and 7.2 µL of DNase/RNase-Free Water. Each DNA sample was performed in triplicate and once all the reaction samples were prepared, they were tested using a Rotor Gene Q® thermal cycler for the DNA amplification process. The amplification conditions were set according to the instructions of the KappaSybr® reagent commercial kit: Enzyme activation, 95°C × 3 min, followed by 40 cycles of denaturation, 95°C × 1-3 sec and Extension, 60°C × 10 sec. Primer sequences are presented in Table 2. Ct values obtained from amplification, were used to analyze relative gene expression using the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method (Livak & Schmittgen, 2001; Tan, 2014).

#### Statistical analysis

From the information collected, productive performance, carcass characteristics and histological examination were statistically analyzed by one-way ANOVA. Comparison of means was performed using Tukey's test, considering a significance level of 1% and 5%. Variables expressed as percentage, were transformed to arcsine before the analysis. The Mann-Whitney statistical test was used when the data were not normally distributed. All the statistical analysis was performed using SPSS software (version 17.0, Chicago, IL, USA) with assistance from GraphPad Prism software (version 4.00; GraphPad Software, San Diego, CA).

Table 2 – Primer used in bacterial quantification.

Microorganism	Primer sequence 5'-3'	Reference
<i>Clostridium perfringens</i>	F-TTACCTTTGCTGCATAATCCC	Whelan et al., 2019
	R-ATAGATACTCCATATCATCCTGCT	
<i>Escherichia coli</i>	F-GTGTGATATCTACCCGCTTCGC	Faseleh et al, 2017
	R-AGAACGCTTTGGTTAATCAGGA	
<i>Lactobacillus salivarius</i>	F-GATCGCATGATCCTTAGATGAA	Torok et al., 2013
	R-GCCGATCAACCTCTCAGTTC	



## RESULTS

### Productive performance and carcass characteristics

Regarding productive data at 49 days of age, a higher BWG and a lower FCR ( $p < 0.01$ ) were obtained in the chickens that received eubiotics and the antibiotic. Analyzing FI and percentage of mortality (Table 3), no significant differences ( $p > 0.05$ ) were found between treatments. In carcass characteristics (Table 4), broiler chickens fed the antibiotic showed a higher ( $p < 0.05$ ) carcass yield than control diet and the others were similar. No statistical differences ( $p > 0.05$ ) were found in the yield of breast muscle, thighs+drumsticks, and yellowness between treatments.

**Table 3** - Effect of eubiotics on productive performance in broiler chickens at 49 days of age.

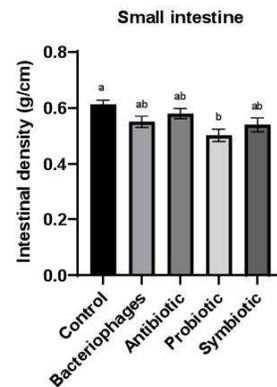
Treatment	Feed intake (g)	Weight gain (g)	FCR <sup>3</sup> (g/g)	Mortality (%)
Control	5352	2902b	1.844b	5.5
Bacteriophages	5199	2993ab	1.737a	4.0
Antibiotic	5318	3054a	1.742a	7.0
Probiotic	5303	3059a	1.734a	9.8
Symbiotic	5273	3005a	1.755a	4.5
P <sup>1</sup>	0.387	0.001	0.0001	0.762
SEM <sup>2</sup>	5289±25	3003±14	1.762±0.01	6.1±0.92

Values with different letters (a, b) in the same row are statistically different (see probability). <sup>1</sup>probability; <sup>2</sup>Average and standar error of means; <sup>3</sup>feed conversion ratio.

### Intestinal morphology and histometry

In total intestinal density (g/cm), it was observed (Figure 1) that treatment with the control diet had

higher intestinal density ( $p < 0.01$ ) compared to the diet containing probiotic, and the other groups presented similar results. The measurements of intestinal villi (Table 5) in duodenum improved ( $p < 0.01$ ) with the use of eubiotics and antibiotic.



**Figure 1** – Effect of eubiotics on intestinal density (g/cm) in broiler chickens at 49 d. Vertical lines associated with histogram bars represent standard error of the mean for the total histologic score. Asterisks indicate significant differences ( $p < 0.01$ ).

### Intestinal histological changes

Using the histological ISI evaluation in duodenum (Figure 2), a higher ( $p < 0.01$ ) total ISI score considering epithelial changes and inflammatory changes was found when using the antibiotic and eubiotics when compared with the control group. The changes that

**Table 4** – Effect of eubiotics on carcass characteristics in broiler chickens at 49 days of age.

Treatment	Carcass %	Breast muscle <sup>3</sup> %	Thighs+Drumsticks %	Liver %	Abdominal fat %	Yellowness <sup>4</sup>
Control	72.5b	19.3	22.6	1.7	0.52	44.1
Bacteriophages	73.2ab	19.2	22.1	1.7	0.45	45.4
Antibiotic	74.0a	19.0	22.9	1.8	0.51	44.3
Probiotic	73.5ab	19.2	22.8	1.8	0.44	44.6
Symbiotic	72.8ab	18.8	22.8	1.9	0.64	45.2
P <sup>1</sup>	0.020	0.371	0.916	0.174	0.168	0.656
SEM <sup>2</sup>	73.2±0.15	19.1±0.1	22.7±0.1	1.8±0.02	0.51±0.02	44.7±0.3

Values with different letters (a, b) in the same row are statistically different (see probability). <sup>1</sup>probability; <sup>2</sup>standar error of means; <sup>3</sup>only *Pectoralis major*; <sup>4</sup>Skin b\* values (yellowness).

**Table 5** – Effect of eubiotics on histological measurements (duodenum) in broiler chickens at 49 days of age.

	Control	Bacteriophages	Antibiotic	Probiotic	Symbiotic	P <sup>3</sup>	SEM <sup>4</sup>
Villus height, $\mu$ m	1965c	2122bc	2032bc	2166b	2441a	0.001	2145±28
Villus width, $\mu$ m	209b	255a	267a	275a	274a	0.001	256±5.7
Crypt depth, $\mu$ m	266ab	234b	260b	264ab	303a	0.001	266±5
Villus Surface Area, mm <sup>2</sup>	0.410c	0.536b	0.545b	0.596ab	0.677a	0.001	.553±.016
Villus: Crypt ratio <sup>1</sup>	7.6b	9.1a	7.9ab	8.3ab	8.1ab	0.021	8.2±0.1
GC <sup>2</sup> :100 epithelial cells ratio	21.2ab	24.3a	19.5b	19.1b	22.8ab	0.001	21.3±0.5

Values with different letters (a, b, c) in the same row are statistically different (see probability). <sup>1</sup>Villus height: crypt depth ratio; <sup>2</sup>number of goblet cells; <sup>3</sup>probability; <sup>4</sup>standar error of means.



avored this higher total score, were in accordance with the obtained in goblet cell hyperplasia and inflammatory cell infiltration.

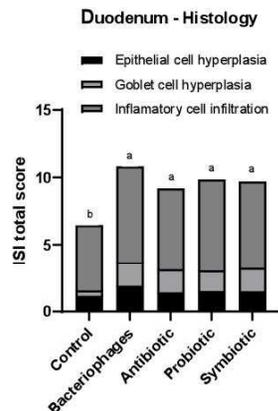


Figure 2 – Total sum of the histologic alteration score in the duodenum of broiler chickens supplemented with eubiotics. Epithelial hyperplasia (IF=1), Goblet cell hyperplasia (IF=2), Inflammatory infiltration in the lamina propria (IF=3). Asterisks indicate significant differences ( $p < 0.01$ ).

### Relative expression of enterobacteria

In relation to the fold change of relative quantification of enterobacteria determined by real time PCR can be found in Figure 3. In ceca, in the case of *E. coli*, an increase ( $p < 0.05$ ) of 2.9 times more in its expression level was obtained when using bacteriophages than the control group at 49 days of age. For *C. perfringens*, it was overexpressed 7.3 times ( $p < 0.05$ ) more when the probiotic *B. subtilis* was added than the control group in chickens at 49 days of age. Regarding *L. salivarius*, the use of the symbiotic allowed a 2-fold increase in its expression level compared to the control treatment; however, there was no significant difference ( $p > 0.05$ ).

### DISCUSSION

Different studies support that the broiler performance with the use of eubiotics is comparable to that obtained with AGP (Mountzouris *et al.*, 2010; Ghazanfari *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2017; Hussein *et al.*, 2020), although according to other authors, these additives do not cover the economic and productive benefits of an antibiotic (Al-Khalaifah, 2018; Oviedo-Rondón, 2019). In the present study, FCR was optimized by 5% when including the antibiotic and eubiotics in the diet, also obtaining a higher carcass yield when the antibiotic was used with respect to the control group

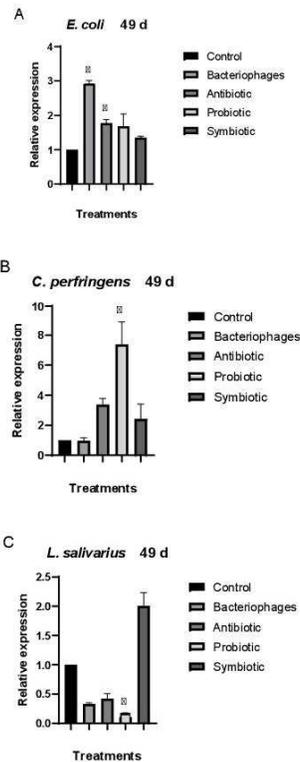


Figure 3 – Effects of eubiotics in broiler chickens on the relative expression in cecum of A) *E. coli*, B) *C. perfringens* and C) *L. salivarius*. Error bars represent the standard error of the mean of the relative expressions. Asterisks indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

(74% vs. 72.5%). Gao *et al.* (2017) reported a similar improvement (5.9%) in FCR when using a probiotic (*Lactobacillus plantarum*) compared with a combination of antibiotics, just like Hussein *et al.* (2020) who, using *Bacillus* spores (genera *subtilis* and *licheniformis*) and a phytobiotic compound to supplement diets of broiler chickens infected with *C. perfringens*, obtained a BWG, FCR and mortality comparable to the group treated with antibiotic (avilamycin). A study performed with bacteriophages (0.5 and 1 g/kg), showed a higher BWG than the control group, without effect in FCR (Upadhaya *et al.*, 2021). In the gut morphological evaluation, the intestinal density (g/cm) was higher in the broiler chickens of the control group, with respect to the chickens fed *B. subtilis*-added diet. An increase in intestinal density may be related to changes in the



intestinal mucosa, which in some mammals represents more than 50% of the thickness of the intestine, in duodenum and jejunum (Di Donato *et al.*, 2013), and is possibly even greater in birds where the villi are usually higher than that of mammals (Smyth, 2016). On the other hand, it is known that, although intestinal weight and length in chickens decrease after the first week of age, this is compensated by an increase in intestinal density to maintain nutrient delivery function (Ravindran *et al.*, 2006), which may indicate that birds with higher intestinal mass have better nutrient utilization. However, Cardinal *et al.* (2019) when evaluating a reduced protein diet in broilers, observed that supplementation of a protease reduced the thickness of the lamina propria and epithelial surface, which was associated with improved nutrients transport and absorption, and thus higher productivity. In another study, when using a mycotoxin metabolite in broilers, it was observed a lower intestinal density derived, according to their conclusions, from a lower villi height (Riahi *et al.*, 2020). When changes in intestinal thickness result in villi atrophy and thinning of the tunica muscularis, macroscopically, the intestinal wall becomes more translucent, which can be used as an evaluation parameter for dysbacteriosis (Teirlynck *et al.*, 2011). This dysbacteriosis due to acute infection or tissue damage manifests as pathological inflammation, but when the immune response of the chickens is appropriate, the inflammation is of a physiological type (Kogut *et al.*, 2018). To this extent, it can be explained why the tendency to a lower intestinal density implied a better productive response, as obtained in this study. In the histometry of intestinal villi, a greater height and area of villi in duodenum was recorded, in chickens supplemented with the antibiotic and eubiotics, being this intestinal segment, important in the digestion and absorption of nutrients (Apajalahti & Vienola, 2016). Something similar was reported in other experiments, where using probiotics, prebiotics and phytobiotics, improved characteristics of the villi (Markovic *et al.*, 2009; Giannenas *et al.*, 2014; Hussein *et al.*, 2020). Elhassan *et al.*, (2018) found that the use of *B. subtilis* in chickens improved mucosal integrity in the duodenum, reporting an increase in villi height, as well as in the percentage of intact villi and a reduction of somatostatin immunoreactive cells. When compared with the use of an acidifier, it showed better results for jejunum and ileum. For the specific case of bacteriophages, there are data confirming that an increase in villi height is possible, in duodenum and jejunum, as shown by Kim *et al.* (2017) in weaned piglets and that it was possible to verify it in the present

investigation, at least for duodenum. When analyzing the histological score based on epithelial changes and inflammatory cell infiltration of the lamina propria, the results of the research may be associated with a low-grade inflammation status, since from a total score of 18, maximum values of 10 were reached in the duodenum, with a higher score in the broiler chicken fed additives. The above, because of an increase in epithelial changes and inflammatory cell infiltration, which positively affected intestinal integrity, obtaining a better histometry of intestinal villi, which contributed to intestinal health. In contrast, Ghazanfari *et al.* (2015), when supplementing broiler diets with antibiotic and coriander essential oil, reported an increase in villus height and crypt depth, but at the same time, a decrease in epithelial layer thickness and number of goblet cells in the villi, which shows that epithelial cell hyperplasia plays a dynamic role in intestinal integrity and functionality. Cardinal *et al.* (2019) in their evaluation of intestinal health, recorded the best productive performance associated with a lower histological score, although the differences were only observed in three histological measurements; decrease in lamina propria thickness, epithelial thickness and enterocyte proliferation, without changes in goblet cells and inflammatory infiltration. Intestinal changes of this type were also reported by Hassan *et al.* (2014) who indicated that the use of probiotics favored a better performance due to the increase in villi height and size and depth of the crypts, as well as an increased amount of goblet cells in the epithelial layer of the crypts, revealing an active hyperplasia in the villi and crypts of Lieberkühn, which is comparable to what was obtained in the present investigation. In some cases, there are reports that the use of *B. subtilis* can induce epithelial hyperplasia and moderate metaplasia of the intestinal epithelium into goblet cells, registering intestinal epithelium regeneration (Hussein *et al.*, 2020), which can be compared with the results of current experiment suggesting that the goblet cell hyperplasia and histometry of the villi in the gut, favored intestinal functionality and performance, as well as the treatment with bacteriophages with a higher ratio of goblet cells per 100 epithelial cells also improved productive performance. It is known that this hyperplasia of goblet cells and mucus production can be induced by beneficial bacteria, as demonstrated by Huang *et al.* (2019), who reported an improvement in the relative mRNA expression of proteins that compose tight junctions, claudin and mucin 2 when using *E. faecium* in chickens challenged with *E. coli*, whereas a reduction



in *E. coli* counts was obtained from the third day post-infection. In the evaluation of the content of enterobacteria in the ceca, chickens that received diets supplemented with bacteriophages and bacitracin showed an increase in *E. coli* without changes in the expression of the other bacteria at 49 days of age. Engberg *et al.* (2000) indicated that bacitracin can decrease the population of *C. perfringens* and *L. salivarius*, although it didn't happen in this study. Respecting bacteriophages, Kim *et al.* (2017), observed that when they were added to piglets, a decrease in colonization by coliforms and *Clostridium* spp. was observed, as well as an increase in the population of *Lactobacillus* spp., different from what was observed in this study. *Lactobacillus salivarius* was found higher than the control group, this occurred when symbiotic was added to the diet, although no statistical difference was recorded. It is noteworthy that this symbiotic does contain *L. salivarius* as probiotic bacteria, and it was the only one in which a clear tendency was found in its increase. Something that is important to mention is that there was an under expression of *L. salivarius* in the ceca of the chickens treated with *B. subtilis*, and that according to previous studies it is known that this probiotic bacterium usually stimulates the presence of bacteria of the genus *Lactobacillus*, especially *L. reuteri*, because it produces subtilisin and catalase that facilitate its growth (Al-Khalaifah *et al.*, 2018), and therefore can stimulate a change in microbial composition and diversity in broilers by increasing beneficial microorganisms, contributing to protection against *Salmonella* infection (Oh *et al.*, 2017). The relationship between *B. subtilis* and *L. reuteri* could not be ascertained, so it is suggested to look for *L. reuteri* in the ceca in a next experiment. Also, the addition of probiotics such as *L. reuteri* and *Bifidobacterium* is related to the stimulation in the production of MUC2 and the increase in the thickness of the mucus layer (Paone & Cani, 2020) which may explain what was obtained in the present study, that, although a greater expression of *L. salivarius* was not demonstrated, there was an increase in the hyperplasia of goblet cells in the duodenum with the use of eubiotics. In general, what has been seen so far has shown that the use of multiespecie probiotics or symbiotics help to increase the population of *Lactobacillus* spp. in ileum or ceca, as well as to decrease the population of bacteria such as *E. coli* and sometimes *C. perfringens* (Mountzouris *et al.*, 2010; Giannenas *et al.*, 2014; Dibaji *et al.*, 2014). The genus *Lactobacillus* are an effective tool to positively alter the microbiome, as quoted verbatim by Gao *et al.* (2017), who proved, that the maturation of

the gut microbiome, was greatly accelerated with the use of a strain of *L. plantarum*, increasing the population of *Lactobacillus* spp., while the maturation was delayed when antibiotic were used, however, the productivity using the antibiotic was still possible, certainly because the antibiotic promoted the growth of beneficial bacteria. According to Tarradas *et al.* (2020), it has been seen that in some cases, the mechanisms of action of probiotics, such as *L. salivarius* and *B. animalis*, change in the presence of pathogens, which implies that the same changes may not always be observed, so in particular situations they will act as pro-inflammatory or as anti-inflammatory, being considered immunomodulators, that is why Adedokun & Olojede (2019) do not recommend the use of these products in healthy birds, without a minimum of intestinal stress or challenge. In the case of bacteriophages, some authors claim that they can also modify the microbiome, even with the presence of temperate bacteriophages that do not lyse bacteria (De Paepe *et al.*, 2014). Upadhaya *et al.* (2021) using bacteriophages as alternative additives to APCs, indicated that the relative abundance of *L. salivarius* increased from 18.86 % (control group) to 37.80 and 40.13% with bacteriophages at 0.5 and 1% respectively in ileal mucosa of broilers at 35 days of age. It should be added that the use of bacteriophages, as commercial additives, requires more information to prove their mode of action and their effectiveness in the productive scale (Clavijo & Vives, 2018). Finally, the findings observed in the present study suggest that there was a physiological inflammation, which according to Cardoso *et al.* (2020), can be defined as a controlled intestinal inflammatory response, in which only positive intestinal histological changes were observed, evident in the duodenum by the use of the antibiotic and eubiotics, together with the optimal growth of intestinal villi, which can be interpreted as described by Kim & Ho (2010), as a balance and dynamic interactions between intestinal epithelial cells, increased digestive capacity and immunomodulation that is associated with the integrity and maintenance of the intestinal mucosa, promoted by the adequate colonization of beneficial bacteria, which could only be observed as a trend of colonization by *L. salivarius* when using the symbiotic.

## CONCLUSION

The addition of the antibiotic bacitracin and eubiotics used in the present study; bacteriophages, probiotic (*B. subtilis*) and the symbiotic (*L. salivarius*, *L. reuteri*, *E. faecium*, *B. animalis*, *P. acidolactici* and inulin), in



broiler diets, improved the productive performance at 49 days of age. This was congruent with what was reported in the histometric variables of the villi, as well as the histological changes that showed controlled inflammation, fundamental for the maintenance of intestinal integrity. The effect of bacteriophages showed that they promote benefits at the intestinal level as well as probiotics and symbiotics, however, it is important to continue investigating the mechanisms of action that make this possible. Considering the variability in the results of enterobacterial counts, it is recommended to contemplate the microbiome in each study, since, as a dynamic system, more research is required to understand the relationship of eubiosis with productivity. For the time being, the use of eubiotic additives, including bacteriophages, indicated that they are an alternative to the use of the growth-promoting antibiotic Bacitracin.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge the financial support of CTCBIO DE MÉXICO S. DE R.L. DE C.V. and Elanco Salud Animal, S.A. de C.V.

## REFERENCES

- Adedokun SA, Olojede OC. Optimizing gastrointestinal integrity in poultry: The role of nutrients and feed additives. *Frontiers in Veterinary Science* 2019;5(348):1-11.
- Al-Khalaifa HS. Benefits of probiotics and/or prebiotics for antibiotic-reduced poultry. *Poultry Science* 2018;97(11):1807-15.
- Alshamy Z, Richardson KC, Hunigen H, Hafez HH, Plendl J, Al Masri S. Comparison of the gastrointestinal tract of a dual-purpose to a broiler chicken line: A qualitative and quantitative macroscopic and microscopic study. *PLoS One* 2018;13(10):e0204921.
- Apajalahti J, Vienola K. Interaction between chicken intestinal microbiota and protein digestion. *Feed Science and Technology* 2016;221:323-30.
- Bagajai Y, Klieve A, Dart P, Wayne B. Probiotics in animal nutrition: Production, impact, and regulation. Rome: FAO Animal Production and Health; 2016.
- Caly DL, D'Inca R, Auclair E, Drider D. Alternatives to antibiotics to prevent necrotic enteritis in broiler chickens: A microbiologist's perspective. *Frontier in Microbiology* 2015;6:1-12.
- Cardinal KM, Lemos de MM, Andretta I, Schirrmann GD, Belote, BL, Barrios MA, et al. Growth performance and intestinal health of broilers fed a standard or low-protein diet with the addition of a protease. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2019;48.
- Cardoso DPG, Farnell M, Farnell Y, Kogut MH. Dietary factors as triggers of low-grade chronic intestinal inflammation in poultry. *Microorganisms* 2020;8(139):1-10.
- Clavijo V, Vives FMJ. The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: a review. *Poultry Science* 2018;97:1006-21.
- Dibaji SM, Seidavi A, Asadpour L, Silva FM da. Effect of a symbiotic on the intestinal microflora of chickens. *Journal Applied Poultry Research* 2014;23:1-6.
- Donato P di, Pennink D, Pietra M, Cipone M, Diana A. Ultrasonographic measurement of the relative thickness of intestinal wall layers in clinically healthy cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2013;16(4):333-9.
- Engberg RM, Hedemann MS, Leser TD, Jensen BB. Effect of Zinc Bacitracin and Salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers. *Poultry Science* 2000;79:1311-9.
- Elhassan MMO, Ali AM, Blanch A, Kehlet AB, Madekurozwa MC. Morphological responses of the small intestine of broiler chicks to dietary supplementation with a probiotic, acidifiers, and their combination. *Journal Applied Poultry Research* 2018;28:108-17.
- Faseleh JM, Shokryzdan P, Idrus Z, Ebrahimi R, Liang JB. In Ovo and dietary administration of oligosaccharides extracted from palm kernel cake influence general health of pre- and neonatal broiler chicks. *PLoS One* 2017;12(9):e0184553.
- Gao P, Ma C, Sun Z, Wang L, Huang S, Su X, et al. Feed-additive probiotics accelerate yet antibiotics delay intestinal microbiota maturation in broiler chicken. *Microbiome* 2017;5:91.
- Ghazanfari SI, Mohammadi ZI, Adib Moradi MII. Effects of Coriander Essential Oil on the Performance, Blood Characteristics, Intestinal Microbiota and Histological of Broilers. *Brazilian Journal of Poultry Science* 2015;17(4):419-26.
- Giannenas I, Tsalie E, Triantafyllou E, Hessenberger S, Teichmann K, Mohl M, et al. Assessment of probiotics supplementation via feed or water on the growth performance, intestinal morphology and microbiota of chickens after experimental infection with *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* y *Eimeria tenella*. *Avian Pathology* 2014;43(3):209-16.
- Hassan HMA, Youssef AW, El-Daly EF, Abd El-Azeem NA, Hassan ER, Mohamed MA. Performance, caecum bacterial count and ileum histology of broilers fed different direct-fed microbials. *Asian Journal of Poultry Science* 2014;8(4):106-14.
- Huang L, Luo L, Zhang Y, Wang Z, Xia Z. Effects of the dietary probiotic, *Enterococcus faecium* NCIMB11181, on the intestinal barrier and system immune status in *Escherichia coli* O78-challenged broiler chickens. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 2019;11(3):946-56.
- Hussein EOS, Ahmed SH, Abudabos AM, Aljumaah MR, Alkhulaifi MM, Nassan MA, et al. Effect of antibiotic, phytobiotic and probiotic supplementation on growth, blood indices and intestine health in broiler chicks challenged with *Clostridium perfringens*. *Animals* 2020;10:507.
- Iebba V, Totino V, Gagliardi A, Santangelo F, Cacciotti F, Trancassini M, et al. Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. *New Microbiologica* 2016;39:1-12.
- Kim YS, Ho SB. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Current Gastroenterology Reports* 2010;12(5):319-30.
- Kim JS, Hosseindoust A, Lee SH, Choi YH, Kim MJ, Lee JH, et al. Bacteriophage cocktail and multi-strain probiotics in the feed for weaning pigs: effects on intestine morphology and targeted intestinal coliforms and *Clostridium*. *Animal* 2017;11(1):45-53.
- Kogut MH, Genovese KJ, Swaggerty CL, He H, Broom L. Inflammatory phenotypes in the intestine of poultry: not all inflammation is created equal. *Poultry Science* 2018;97(7):2339-46.
- Kraieski AL, Hayashi RM, Sanches A, Almeida GC, Santin E. Effect of aflatoxin experimental ingestion and Eimeria vaccine challenges on intestinal histopathology and immune cellular dynamic of broilers: applying an Intestinal Health Index. *Poultry Science* 2017;96:1078-87.



- Laudadio V, Passantino L, Perillo A, Lopresti G, Passantino A. Productive performance and histological features of intestinal mucosa of broiler chickens fed different dietary protein levels. *Poultry Science* 2012;91:265-70.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2DDCT Methods 2001;25(4):402-8.
- M'Sadeq SA, Wu S, Swick RA, Choct M. Towards the control of necrotic enteritis in broiler chickens with in-feed antibiotics phasing-out worldwide. *Animal Nutrition* 2015;1:1-11.
- Marcovik R, Sefer D, Krstic M, Petrujkic B. Effect of different growth promoters on broiler performance and gut morphology. *Archivos de Medicina Veterinaria* 2009;41:163-9.
- Mountzouris KC, Dalaka E, Palamidi I, Paraskevas V, Demey V, Theodoropoulos G, et al. Evaluation of yeast dietary supplementation in broilers challenged or not with *Salmonella* on growth performance, cecal microbiota composition and *Salmonella* in ceca, cloacae and carcass skin. *Poultry Science* 2015;94:2445-55.
- Oh JK, Pajaniello EAB, CHae JP, Kim IH, Yang DS, Kang Dae-Kyung. Effects of *Bacillus subtilis* CSL2 on the composition and functional diversity of the faecal microbiota of broiler chickens challenged with *Salmonella* Gallinarum. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 2017;8(1):1-9.
- Oviedo-Rondón, EO. Holistic view of intestinal health in poultry. *Animal Feed Science Technology* 2019;250:1-8.
- Paeppe M de, Leclerc M, Tinsley CR, Petit Marie-Agnes. Bacteriophages: an underestimated role in human and animal health?. *Frontiers in Cellular Infection Microbiology* 2014;4(39):1-11.
- Paone P, Cani PD. Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners? *Gut* 2020;69:2232-43.
- Ravindran V, Wu YB, Thomas DG, Henri Morel PC. Influence of whole wheat feeding on the development of gastrointestinal tract and performance of broiler chickens. *Australian Journal of Agricultural Research* 2006;57:21-6.
- Riahi I, Marquis V, Ramos AJ, Brufau J, Esteve-Garcia E, Pérez-Vendrell VAM. Effects of deoxynivalenol-contaminated diets on productive, morphological, and physiological indicators in broiler chickens. *Animals* 2020;9(301):1-11.
- Roberts T, Wilson J, Guthrie A, Cookson K, Vanraeynest D, Shaeffer R, et al. New issues and science in broiler chicken intestinal health: Emerging technology and alternative interventions. *Journal Applied Poultry Research* 2015;24:257-66.
- Selaledi LA, Hassan ZM, Manyelo TG, Mabalebele M. The current status of the alternative use to antibiotics in poultry production: an African perspective. *Antibiotics* 2020;9(9):594.
- Sethiya, NK. Review on natural growth promoters available for improving gut health of poultry: An alternative to antibiotic growth promoters. *Asian Journal of Poultry Science* 2016;10(1):1-29.
- Setiawan, H, Jingga, ME, Saragih, HT. The effect of cashew leaf extract on small intestine morphology and growth performance of Jawa Super Chicken. *Veterinary World* 2018;11(8):1047-54.
- Smyth JA. Pathology and diagnosis of necrotic enteritis: is it clear-cut?. *Avian Pathology* 2016;45(3):282-7.
- Sun Q, Shang Y, She R, Jiang T, Wang D, Ding Y, et al. Detection of intestinal intraepithelial lymphocytes, goblet cells and secretory IgA in the intestinal mucosa during Newcastle disease virus infection. *Avian Pathology* 2013;42(6):541-5.
- Tan J, Applegate TJ, Liu S, Guo Y, Eicher SD. Supplemental dietary L-arginine attenuates intestinal mucosal disruption during a coccidial vaccine challenge in broiler chickens. *British Journal of Nutrition* 2014, 112:1098-109.
- Tarradas J, Tous N, Esteve-Garcia E, Brufau AJ. The control of intestinal inflammation: A major objective in the research of probiotic strains as alternatives to antibiotic growth promoter in poultry. *Microorganisms* 2020;8(2):148-64.
- Teirlynck E, Gussem MDE, Dewulf J, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F. Morphometric evaluation of "dysbacteriosis" in broilers. *Avian Pathology* 2011;40(2):139-44.
- Torok VA, Dyson C, McKay A, Open-Keller K. Quantitative molecular assays for evaluating changes in broiler gut microbiota linked with diet and performance. *Animal Production Science* 2013;53:1260-8.
- Upadhaya SD, Ahn JM, Cho JH, Kim JH, Kim JY, Kang DK, et al. Bacteriophage cocktail supplementation improves growth performance, gut microbiome and production traits in broiler chickens. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 2021;12(49):1-12.
- Whelan RA, Doranalli K, Rinttila T, Vienola K, Jurgens G, Apajalahti J. The impact of *Bacillus subtilis* DSM 32315 on the pathology, performance, and intestinal microbiome of broiler chickens in a necrotic enteritis challenge. *Poultry Science* 2019;98(1):3450-63.
- Wilson K. Preparation of genomic DNA from Bacteria. In: Ausubel, FM, editor. *Current protocols in molecular biology*. New York: Wiley InterScience; 1997.
- Yasar S, Okutan I, Tosun, R. Testing novel eubiotic additives: Its health and performance effects in commercially raised farm animals. *Journal of the Institute of Science and Technology* 2017;7(4):297-308.