

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES

EFFECTO DE UN PRODUCTO DE EXCLUSION
COMPETITIVA COMERCIAL (Preempt™) SOBRE LA
MORTALIDAD Y TRANSMISION HORIZONTAL DE
Salmonella gallinarum EN POLLO DE ENGORDA

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTADA POR:
GERARDO MANUEL NAVA MORALES

ASESORES: MVZ, MC, PhD. GUILLERMO TELLEZ ISAIAS
MVZ, MC, GARY GARCIA ESPINOZA
MVZ, MC, GABRIELA GOMEZ VERDUZCO



MEXICO, D. F.

JUNIO DEL 2002

TESIS CON
FOLIO DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

DEDICATORIA

A mis padres: María E. Morales Ortiz

Juan M. Nava Reyes

A mis hermanos: Hector, Claudia y Noemi

y muy especialmente a Catalina Franco Reyes

Tía Catita este trabajo es para ti...

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Al Departamento de Producción Animal: Aves

Al Dr. Guillermo Téllez Isaías

A mis compañeros y amigos

Al Programa de Becas para Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación

(PROBETEL) de la UNAM, por su apoyo económico

Resumen

Nava Morales Gerardo Manuel. EFECTO DE UN PRODUCTO DE EXCLUSIÓN COMPETITIVA COMERCIAL (PreemptTM) SOBRE LA MORTALIDAD Y TRANSMISIÓN HORIZONTAL DE *Salmonella gallinarum* EN POLLO DE ENGORDA. (Bajo la asesoría de: MVZ, MC, PhD. Guillermo Téllez Isalas, MVZ, MC Gary García Espinoza y MVZ, MC Gabriela Gómez Verduzco).

La producción avícola constituye uno de los reservorios más grande de microorganismos de salmonela que existe en la naturaleza. Sin importar la fuente de contaminación, la exposición a salmonela en los pollitos recién nacidos es crítica ya que las aves jóvenes no tienen una microflora nativa intestinal (MNI) madura y por lo tanto son altamente susceptibles a ser colonizados por bacterias patógenas. Uno de los actuales y más prometedores métodos para el control de las infecciones por *Salmonella* spp en la industria avícola, es el control en la colonización microbial por medio de la administración a aves jóvenes de MNI proveniente de aves adultas, un proceso conocido como el "concepto Nurmi" o "exclusión competitiva" (EC). Para investigar el efecto de la administración profiláctica de un producto de EC comercial sobre la disminución de la mortalidad y la transmisión horizontal de *Salmonella gallinarum* en pollos de engorda, se realizaron dos experimentos. *Experimento 1.-* Para evaluar el efecto del producto de EC comercial sobre la mortalidad causada por *Salmonella gallinarum* se utilizaron 160 pollos de un día de edad asignados aleatoriamente en dos grupos de 20 aves cada uno, con cuatro réplicas. Grupo A.- testigo positivo con administración de 0.25 ml de solución salina fisiológica (SSF) *per os*, grupo B.- tratado con 0.25 ml del producto de EC comercial *per os*. Al tercer día de edad, ambos grupos fueron desafiados con 0.25 ml de inóculo conteniendo 10^6 ufc de *Salmonella gallinarum*/ml. La mortalidad se registró diariamente en ambos grupos. La administración profiláctica del producto de EC comercial redujo significativamente ($p < 0.001$) la mortalidad en los pollos tratados con EC, comparados con los grupos testigos positivo. El porcentaje de mortalidad para los grupos testigo positivo y los grupos tratados con EC fueron: 73.7 y 7.5 respectivamente. *Experimento 2.-* Para evaluar el efecto del producto de EC comercial sobre la transmisión horizontal de *Salmonella gallinarum*, se utilizaron 240 pollos asignados aleatoriamente en tres grupos de 20 aves cada uno con cuatro réplicas. Todos los grupos fueron tratados al día de edad. Grupo C.- testigo positivo desafiado con 0.25 ml de inóculo conteniendo 10^6 ufc de *Salmonella gallinarum*/ml *per os*, grupo D.- testigo negativo con administración de 0.25 ml de SSF *per os*, grupo E.- tratado con 0.25 ml del producto de EC comercial *per os*. Las aves sobrevivientes se sacrificaron 10 días posdesafío para la determinación de *Salmonella gallinarum* en órganos internos. La administración profiláctica del producto de EC comercial redujo significativamente la transmisión horizontal de *Salmonella gallinarum* ($p < 0.005$) en el grupo E cuando se comparó con el grupo testigo positivo (grupo C) y con el grupo testigo negativo (grupo D). El porcentaje de mortalidad para los grupos: C, D y E fueron: 80.0, 53.7 y 8.7 respectivamente. La transmisión horizontal de *Salmonella gallinarum* en hígado y bazo del grupo E se redujo significativamente al compararse con el grupo D. El porcentaje de aislamientos positivos a *Salmonella gallinarum* de hígado y bazo para los grupos: C, D y E fueron: 86.2, 83.7 y 35.0 respectivamente. Durante los primeros 10 días *Salmonella gallinarum* mostró alta patogenicidad indicada por la alta mortalidad en los grupos no tratados con el cultivo de EC comercial. En este trabajo se demostró que la administración profiláctica de MNI definida en pollos de un día de edad, reduce significativamente la transmisión horizontal y la mortalidad causada por *Salmonella gallinarum*. Esto sugiere que el producto de EC coloniza el ciego de estos pollos e inhibe la colonización del patógeno. Este es el primer estudio donde se reporta que la MNI definida, contenida en el producto de EC comercial, es capaz de disminuir la transmisión horizontal de *Salmonella gallinarum* en pollos de engorda de un día de edad.

ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN	1
Salmonelosis	1
Tifoidea Aviar	2
Factores de importancia en la colonización por <i>Salmonella</i> spp	4
Fuentes de salmonela en la industria avícola	4
La importancia de la microflora nativa intestinal del ave	5
Establecimiento de la microflora nativa intestinal	6
Factores que regulan las poblaciones bacterianas	7
Uso de la microflora nativa intestinal para el control de la salmonela	10
OBJETIVOS	16
HIPÓTESIS	16
MATERIAL Y MÉTODOS	17
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	24
CONCLUSIONES	42
REFERENCIAS	43
CUADROS	54

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1.- Algunos factores que probablemente influyen sobre los microorganismos autóctonos en el SGI	54
Cuadro 2.- Bacterias presentes en el cultivo Bacteriano Preemt™, aisladas de microflora cecal nativa de pollos adultos y mantenida en flujo continuo	55
Cuadro 3.- Efecto del producto de exclusión competitiva comercial sobre la mortalidad de pollos de engorda infectados con <i>Salmonella gallinarum</i>	56
Cuadro 4.- Efecto del producto de exclusión competitiva comercial sobre la mortalidad y la invasión de órganos internos de pollos de engorda en la transmisión horizontal de <i>Salmonella gallinarum</i>	57

EFFECTO DE UN PRODUCTO DE EXCLUSIÓN COMPETITIVA COMERCIAL (Preempt™) SOBRE LA MORTALIDAD Y TRANSMISIÓN HORIZONTAL DE *Salmonella gallinarum* EN POLLO DE ENGORDA .

INTRODUCCIÓN

Salmonelosis

Las enfermedades originadas por los alimentos no sólo son de gran importancia en salud pública, sino también en el aspecto económico; la OMS (Organización Mundial de la Salud) reporta que en 1980, ocurrieron más de un billón de casos de diarrea aguda en niños menores de cinco años de edad en países subdesarrollados y que cinco millones de estos niños murieron. ⁽¹⁾ Aproximadamente un tercio de las enfermedades diarreicas son de origen alimenticio. ⁽²⁾ De las cuales un gran porcentaje se atribuye a salmonela presente en carnes crudas y pollo. ⁽¹⁾ La gran demanda de productos avícolas y la velocidad con la que se procesan los mismos, facilitan la contaminación bacteriana. ⁽³⁾

El género *Salmonella*, designada así por Daniel E. Salmon, pertenece al grupo de bacterias Gram negativas que se incluye en la familia *Enterobacteriaceae*. Este género se compone de más de 2300 serotipos definidos antigénicamente ⁽⁴⁾, de los cuales los de interés para la industria avícola se pueden dividir en dos grupos, el de las salmonelas móviles como *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium*, causantes de las "Paratifoideas"; y el de salmonelas inmóviles donde sólo existen *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum* responsables de la "Tifoidea Aviar y Pulorosis" respectivamente. ⁽⁵⁾

La salmonelosis aviar es una de las principales enfermedades infecciosas que afectan a la industria avícola. Las aves comerciales infectadas constituyen uno de los reservorios más grandes de microorganismos de salmonela que existe en la naturaleza. ⁽⁴⁾

Tifoidea Aviar

La Tifoidea Aviar (TA) es una enfermedad septicémica de aves domésticas, de curso agudo o crónico, mortalidad variable de acuerdo a la virulencia de la cepa infectante. Manifiesta gran capacidad para infectar lo mismo a pollos jóvenes como adultos;⁽⁶⁾ en casos excepcionales afecta a patos, faisanes, pavo reales, gallina de Guinea y algunas otras aves. Pocas veces se aísla *Salmonella gallinarum* de humanos y tiene poca importancia en salud pública.⁽⁴⁾ El informe anual de 1992 del *Centro para el Control de las Enfermedades de los Estados Unidos de Norteamérica (U.S. Center for Disease Control)*, reporta ocho aislamientos de *Salmonella gallinarum* en humanos entre 1982 y 1992.⁽⁴⁾

La TA tiene una distribución mundial, en Estados Unidos de Norteamérica, Canadá, Inglaterra y Suecia, la TA esta erradicada.⁽⁷⁾ En varios países de América Latina se ha intentado controlar más que erradicar esta enfermedad.⁽⁸⁾ En México, existe la campaña nacional contra la salmonelosis aviar, que tiene por objeto establecer los procedimientos, actividades, criterios, estrategias y técnicas operativas para la prevención, control y erradicación de salmonelosis aviar (Pulorosis y TA), en todo el territorio nacional. ⁽⁸⁾

La TA se reporta como una enfermedad de gran importancia económica, ya que afecta principalmente a las aves productoras de huevo comercial y a las reproductoras pesadas.⁽⁶⁾ En las gallinas domésticas existe mayor susceptibilidad a la enfermedad en aves semipesadas, seguidas por las aves pesadas y finalmente por las aves ligeras. ⁽⁹⁾ Las cepas de *Salmonella*

gallinarum presentes en nuestro país son capaces de producir cuadros de tipo sobreagudo y agudo caracterizados por altas mortandades y bajas en la producción de huevo. ⁽⁹⁾

Salmonella gallinarum es un microorganismo en forma de bastón que mide aproximadamente de 1.0 a 2.0 μm de largo y 1.5 μm de diámetro. Es un bacilo Gram negativo que no forma esporas y no tiene cápsula. Crece rápidamente sobre extractos de carne, en infusión agar, en caldo triptosa y otros medios nutritivos ajustados a un pH de 7.2. Es un bacilo anaerobio facultativo que crece mejor a 37C, en medios enriquecidos selectivos tales como caldo selenito y caldo tetrionato; y en medios diferenciales tales como MacConkey, sulfito de bismuto, salmonella-shigella, deoxicolato, deoxicolato citrato lactosa sucrosa y agar verde brillante.

Aunque la TA ha sido frecuentemente mencionada como una enfermedad de aves adultas afecta también a pollos jóvenes. La TA genera pérdidas desde el momento del nacimiento y continúa durante la edad de postura. La transmisión no sólo puede ocurrir de aves infectadas al resto de las aves sanas, sino además a sucesivas generaciones a través del huevo. El período de incubación es de 4 a 5 días, aunque este varía con la virulencia del microorganismo, el curso de la enfermedad es alrededor de 5 días, pero puede extenderse hasta por 2 a 3 semanas.

Los signos observados en pollitos no son específicos para esta enfermedad. Si las aves nacen de huevos infectados se pueden observar aves moribundas o muertas, somnolencia, pobre crecimiento, inapetencia y adherencia de material blanquecino a la cloaca. Se puede observar dificultad para respirar ya que el pulmón también es afectado. En aves jóvenes y adultas en un brote agudo se observa una disminución repentina en el consumo de alimento, las aves se observan postradas, con las plumas erizadas y la cresta pálida y contraída; la muerte ocurre entre 5 a 10 días después de la exposición, encontrándose el pico de mayor mortalidad a los 10 días. La morbilidad y mortalidad puede variar de un 10 a un 50 % o más. En los casos hiperagudos no se observan lesiones y en los casos subagudos se observa congestión,

hemorragias y focos de necrosis en hígado, bazo, corazón, peritoneo, ovarios, pulmón, molleja, duodeno, ciegos y riñón. *Salmonella gallinarum* puede ser aislada fácilmente de estos órganos. ^(4, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15)

Factores de importancia en la colonización por *Salmonella* spp

Algunos estudios indican que la salmonela puede entrar por vía cloacal y colonizar ciego de aves recién eclosionadas cuando entra en contacto con superficies contaminadas de la incubadora. ⁽¹⁶⁾ Otros investigadores han reportado que los movimientos de succión espontáneos de los labios de la cloaca en pollos recién eclosionados, acompañado de contracciones peristálticas del recto, promueve el acarreo de microorganismos y sustancias. ⁽¹⁷⁾ Pero la principal ruta de entrada del patógeno, es la vía oral. La adherencia y subsecuente invasión de *Salmonella* spp en la mucosa intestinal es un evento clave en las infecciones causadas por esta bacteria intracelular. ⁽¹⁸⁾

La infección por salmonela ocurre en el intestino grueso, probablemente por la poca motilidad, pH alcalino y la falta de enzimas digestivas. ^(18, 19, 20, 21) Se sabe que los ácidos grasos volátiles en estado de disociación, ejercen una actividad inhibitoria en infecciones por salmonela, dicho estado de disociación es determinado por el pH del contenido intestinal, que no sólo se asocia con el incremento en la concentración orgánica de ácidos, sino también con cambios apreciables en la mucosa cecal. ^(22, 23, 24, 25, 26, 27) Lupton *et al.* sugieren que la fermentación de carbohidratos no digeribles por el ave en el intestino grueso, pueden ser un importante factor en la determinación de la proliferación de las células de la mucosa intestinal. ⁽²⁸⁾

Fuentes de salmonela en la industria avícola

Por años se creyó que el alimento de aves comerciales era el principal contribuyente en el problema de salmonelosis aviar, se pensaba que si la salmonela se eliminaba del alimento, se

resolvería el problema. Sin embargo, no fue tan sencillo pues existen numerosas fuentes de contaminación en las operaciones integradas de pollo comercial y algunas de estas parecen ser los principales contribuyentes en la contaminación final del pollo.⁽²⁹⁾ Por ejemplo las parvadas de reproductoras infectadas, la incubadora, la cama, el agua, los insectos, los pájaros, los roedores, el hombre, entre otros. Por lo que las principales especies de salmonela encontradas en el pollo procesado provienen de estas fuentes. Además, sin importar la fuente de contaminación, la exposición a salmonela en los pollitos recién nacidos es crítica; ya que las aves jóvenes no tienen una microflora nativa intestinal (MNI) madura y por lo tanto son altamente susceptibles a ser colonizados por bacterias patógenas.^(29,30)

La importancia de la microflora nativa intestinal del ave

En aves jóvenes de engorda niveles bajos de salmonela son suficientes para colonizar los intestinos.^(29, 30) La resistencia natural se desarrolla con la edad, la cual se relaciona con el establecimiento de una MNI madura en el sistema digestivo del ave. Al día de edad, 10 ufc (unidades formadoras de colonia) de *Salmonella typhimurium*/pollo infecta a más del 50% de la parvada, al día 14 de edad el 90% resiste a un desafío con un millón de ufc.⁽³¹⁾ La compleja microflora intestinal, se establece en el intestino delgado en las dos primeras semanas de vida,⁽³²⁾ pero en el ciego, tarda más de cuatro semanas en madurar completamente.⁽³³⁾ El ciego es el principal sitio de colonización de salmonela.⁽³⁴⁾

El lento desarrollo de la MNI se ha atribuido a las condiciones sanitarias de producción y al reemplazo de la incubación natural por el uso de incubadoras mecánicas; en condiciones naturales, los pollos dentro del huevo tienen un sistema gastrointestinal estéril que al momento de salir del huevo, es expuesto a microorganismos intestinales de aves adultas por medio de las heces en el cascarón, en el nido, entre otros. Sin embargo, bajo las actuales prácticas de manejo en las operaciones comerciales, con las medidas de bioseguridad establecidas en las plantas incubadoras, las aves tienen poca oportunidad de adquirir rápidamente la MNI.^(31, 35)

Establecimiento de la microflora nativa intestinal

El sistema gastrointestinal (SGI) de aves y mamíferos adultos, contiene microorganismos de especies muy variadas ⁽³⁶⁾. En animales de diferentes clases taxonómicas, se sabe que la población microbiana en ciertas áreas del SGI, puede exceder cien billones de células por gramo de contenido.⁽³⁷⁾ Esta enorme microbiota interactúa nutricional y fisiológicamente de forma muy estrecha y compleja con las células intestinales.^(37, 38) Muchas de estas bacterias encontradas en el SGI residen (nichos) en distintos hábitats (áreas físicas) y son consideradas como bacterias autóctonas de estas zonas. Debido a que el SGI es un canal abierto al medio ambiente, algunas de las bacterias encontradas en la flora intestinal son temporales o "de paso" que ingresan con el alimento u otro tipo de ingesta. Algunos de estos microorganismos pasan a través del SGI y son eliminados sin colonizar ningún área en particular o bajo algunas circunstancias colonizan y persisten por algún tiempo en el sistema.⁽³⁷⁾

Se han encontrado bacterias en la microflora del SGI de aves que pueden ser enteropatógenas para el hombre. Cuando éste patógeno está presente en el SGI del ave, sea o no miembro autóctono de la microbiota; y algunos de los tejidos o productos del ave, son utilizados como materia prima para la elaboración de alimentos, el patógeno puede ser transmitido al hombre.⁽³⁹⁾ Se han realizado esfuerzos para estabilizar y mejorar estos mecanismos de biocontrol e impedir el desarrollo de microorganismos enteropatógenos, pero se tienen pocos conocimientos acerca de los factores ambientales y nutricionales que controlan a la MNI de acuerdo a su composición, regulación, función bioquímica, genética y la influencia de la interacción con los tejidos del animal hospedador.⁽⁴⁰⁾

En animales adultos, la población de microorganismos autóctonos que colonizan cualquier parte del SGI es llamada "comunidad clímax".⁽³⁷⁾ Las "comunidades clímax" pueden ser encontradas a

lo largo del lumen, en áreas donde la digesta pasa lentamente, permitiendo así la multiplicación de esta microbiota.⁽³⁷⁾ Algunas de las bacterias "de paso", colonizan temporalmente hábitats vacantes, que los microorganismos autóctonos dejan libres debido a disturbios en el ecosistema. Normalmente, cada hábitat en los animales adultos es colonizado por "comunidades climax" formadas por cepas específicas autóctonas, cada una de ellas ocupa un nicho específico en el hábitat. Se han logrado diferenciar cepas de microorganismos autóctonos, de microorganismos "de paso", verificando así, hasta cierto grado, la inocuidad de la microbiota autóctona. ⁽³⁷⁾

Los microorganismos eucariotes y procariotes pueden ser habitantes autóctonos del SGI de las aves. Savage en 1987 logró aislar protozoarios, hongos y levaduras en algunos cultivos de SGI de diversas especies.⁽³⁹⁾ La población de eucariotes tiende a ser menor en comparación con la población bacteriana encontrada en el SGI en todas las especies estudiadas. La basta mayoría de comunidades autóctonas de microorganismos eucariotes o procariotes que habitan en el SGI, son incapaces de utilizar el oxígeno en su metabolismo de energía y de estas, las bacterias estrictamente anaerobias predominan enormemente en todas las comunidades. ^(37, 39)

La formación de "comunidades climax" son el resultado de una sucesión bacteriana iniciada en el animal hospedador al momento de nacer.^(36, 24, 41) El ave recién nacida bajo condiciones de incubación natural entra en contacto con una gran variedad de microorganismos del SGI de aves adultas; algunos de estos microorganismos son los primeros que inician la sucesión. ^(36, 37, 40, 42)

Factores que regulan las poblaciones bacterianas

La sucesión, los niveles de población, las especies de microorganismos que forman "comunidades climax" y la función genética y bioquímica de estos microorganismos; probablemente estén regulados por procesos interactivos multifactoriales.^(36, 37, 40, 42) Algunos de

los procesos que influyen en la formación de "comunidades climax" son ejercidos por los tejidos del animal hospedador, alimento, drogas y medio ambiente. Otros son ejercidos por las mismas poblaciones autóctonas ^(39, 43, 44, 45) (cuadro 1).

La nutrición de los microorganismos autóctonos en el SGI es compleja, probablemente existan numerosas fuentes de carbón y energía; algunas de estas fuentes son exógenas como la dieta que consume el hospedador, otras endógenas como las glicoproteínas, proteínas enzimáticas, exfoliación epitelial, etc. La mucina y la urea particularmente son importantes substratos nutricionales, especialmente para bacterias que colonizan hábitats en superficies epiteliales. ^(38, 46)

Otros factores que modifican la MNI es la temperatura y el pH del contenido del SGI; pudiendo ser dos factores detrimentales para el establecimiento y desarrollo de microorganismos gastrointestinales que colonizan un área en particular. ⁽⁴⁰⁾ El potencial de oxidación-reducción también es un factor importante en los hábitats del SGI, porque muchos de los microorganismos de la MNI son anaerobios estrictos y el oxígeno puede estar presente en el SGI en pequeñas cantidades. ^{(38,}

⁴⁷⁾ Sin embargo, este puede ser utilizado por microorganismos anaerobios facultativos autóctonos del SGI. Muchos de estos microorganismos pueden utilizar concentraciones de oxígeno cercanas a las concentraciones encontradas en la atmósfera. ^(37, 47) Savage reportó en 1977, que los microorganismos anaerobios facultativos se pueden encontrar en la microbiota, en una proporción de 1 por cada 1000 anaerobios estrictos, aproximadamente. ⁽³⁷⁾ Aún cuando estos sean minoría en los hábitats del SGI, tienen la capacidad de aprovechar el oxígeno presente y reducir así, el potencial de oxidación-reducción. Esta actividad es muy importante para generar las condiciones en las cuales, los microorganismos intolerantes al oxígeno puedan poblar áreas del SGI; especialmente durante la sucesión en animales neonatos. ^(40, 47) Una situación similar sucede con la motilidad intestinal, el movimiento de la mucosa del SGI debido a contracciones musculares, es un factor ambiental importante que afecta considerablemente a la microbiota en el sistema. Los microorganismos han tenido que responder a esta fuerza, para poder colonizar las superficies epiteliales. En algunos hábitats epiteliales, los microorganismos residentes colonizan

las superficies epiteliales por adherencia a estas.⁽⁴⁸⁾ En otros casos, los residentes son arrastrados y forman comunidades sobrepuestas en el moco de la superficie epitelial, esto, presumiblemente en respuesta a factores quimiotácticos en el moco de la superficie epitelial.⁽⁴⁹⁾ Independientemente de que los microorganismos se adhieran a superficies epiteliales o colonicen el moco de la superficie epitelial, se han observado superficies específicas en regiones particulares del SGI de diversas especies que permiten esto. En la misma forma, el pH del SGI, la cantidad de oxígeno y potencial de óxido reducción en el ciego, así como la motilidad intestinal; forman un conjunto de interacciones entre los tejidos animal y la microbiota.^(36, 40, 48, 50)

Un gran número de factores generados por los mismos microorganismos gastrointestinales (factores autogénicos), influyen sobre los hábitats del SGI, estos son complejos y difieren de comunidad en comunidad. El mayor factor autogénico es la toxicidad microbial, generada por los miembros de la microbiota; que producen sustancias en el SGI tóxicas para los microorganismos gastrointestinales. Algunas de estas sustancias tóxicas conocidas son: ácido láctico, ácidos grasos volátiles de cadena corta y ácido sulfhídrico.^(42, 51, 52, 53, 54, 55, 56)

Otro factor importante, es la producción de sustancias macromoleculares que limitan a los habitantes del SGI. Estas sustancias son las bacteriocinas, proteínas producidas por algunos géneros bacterianos, que pueden matar o inhibir la multiplicación de otras bacterias del mismo o diferente género bacteriano.⁽⁵⁷⁾ En el intestino grueso de los pollos adultos (colón y ciego) contiene entre 10^8 y 10^9 ufc de *E. coli* por centímetro lineal de intestino o de 10^5 a 10^7 ufc/g de intestino.^(58, 59, 60) Estas bacterias producen las colicinas, proteínas antibacterianas de aproximadamente 50 a 80 kilodaltons. Se han encontrado aproximadamente más de 20 colicinas diferentes y todas ellas actúan contra *E. coli* y otras bacterias.⁽⁶¹⁾ Además, las poblaciones bacterianas autóctonas del SGI, también son controladas por la competencia directa de substratos nutricionales; estos substratos, pueden provenir directamente de la dieta, de otro tipo de ingesta, de procesos metabólicos del hospedador o de procesos metabólicos de los microorganismos del SGI.⁽⁴²⁾

Es claro, que para realizar un efectivo biocontrol de bacterias enteropatógenas del SGI, debemos conocer primeramente el mecanismo de regulación de la composición, función e interacción entre tejidos animales y poblaciones autóctonas de microorganismos.

Uso de la microflora nativa intestinal para el control de la salmonela

Uno de los actuales y más prometedores métodos para el control de las infecciones por *Salmonella* spp en la industria avícola, es el control en la colonización microbial. Un proceso conocido como el "concepto Nurmi" o "exclusión competitiva" (EC). Este concepto reconoce la importancia de un temprano o rápido establecimiento de la MNI de aves adultas en pollos recién nacidos. Las aves comerciales recién nacidas, carecen de esta microflora y son por esta razón altamente susceptibles a ser infectados por salmonela. El tratamiento de estas aves recién nacidas con contenido intestinal o con un cultivo anaeróbico de contenido intestinal de aves adultas libres de *Salmonella* spp, las hace resistentes a subsecuentes desafíos con altas dosis de *Salmonella* spp^(31, 62) Aunque este método se ha utilizado con éxito, el mecanismo responsable exacto no se ha definido totalmente.^(19, 52, 63, 64)

El término EC implica la prevención del ingreso de una entidad en un medio ambiente dado, porque ese espacio ya está ocupado; la entidad competitiva está mejor situada para establecerse y mantenerse por sí misma en el medio ambiente o la entidad competitiva es capaz de producir una sustancia hostil (tóxica) en la competencia.⁽⁶⁵⁾ Las primeras investigaciones sobre este fenómeno fueron realizadas por Metchnikoff en 1903. Este autor reportó que la alimentación con lactobacilos de la leche fermentada era benéfica para el huésped, ya que inhibía a las bacterias de la putrefacción; y no fue, hasta los años 30's, que se acumuló fuerte evidencia de que no sólo las bacterias suministradas en la dieta eran benéficas para el huésped, sino que también la MNI tenía un papel muy importante, debido al efecto inhibitorio sobre microorganismos indeseables.⁽⁶⁶⁾ Volterra en 1928, fue el primero en usar un modelo matemático para sugerir que "la indefinida

coexistencia de dos o más especies limitadas por el mismo recurso es imposible".⁽⁶⁵⁾ En 1934 Gause postuló que "dos especies con ecología similar no pueden vivir en el mismo sitio al mismo tiempo". A esto se le conoce como "Principio de Gause".⁽¹⁵⁾ Se han propuesto diversos mecanismos por medio de los cuales la MNI o microflora competitiva es capaz de excluir microorganismos contaminantes del SGI. Casi siempre es mencionada la producción de ácidos grasos volátiles con la disminución subsecuente del pH del contenido intestinal, pero esto parece ser menos importante que la ocupación física de los receptores intestinales para las bacterias que atacan, colonizan o invaden.⁽⁶⁵⁾ Milner y Shaffer en 1952 reconocieron que en pollos recién nacidos la resistencia a infecciones por salmonela es desarrollada por el establecimiento de la MNI madura.⁽⁶⁵⁾

Los efectos de competencia de la MNI contra infecciones entéricas por *Salmonella* spp fueron demostrados por Greenberg en 1969⁽⁶⁷⁾ y Nurmi y Rentala demostraron el efecto de la exclusión competitiva en las aves en 1973, esto como una medida para disminuir las infecciones por *Salmonella infantis* que afectaban a la industria avícola desde 1971, en su experimento, ellos administraron 0.5 ml de contenido intestinal de aves adultas sanas a pollos de uno y dos días de edad y observaron disminución en el grado de colonización a órganos internos por *Salmonella infantis*.⁽⁶²⁾ Desde entonces, muchos laboratorios han reportado los niveles diferentes de protección que confiere la MNI de aves adultas contra infecciones por *Salmonella* spp en pollos jóvenes.⁽⁶²⁾

El concepto Nurmi de exclusión competitiva se basa en la siguiente teoría: *La administración de contenido intestinal proveniente de pollos adultos sanos, oralmente a pollos de un día de edad, disminuye la susceptibilidad a la infección por Salmonella spp, ya que previene el establecimiento de ésta en el intestino.*⁽⁶²⁾

El mecanismo por el cual la MNI previene las infecciones por salmonela no es todavía claro, pero los tres mecanismos más reconocidos son la ocupación de sitios específicos que invade

salmonela en la mucosa intestinal, la competencia por nutrientes limitantes y la producción de ácidos grasos volátiles. (15, 31, 49, 51, 54, 55, 66)

Los factores que afectan la eficacia del cultivo o producto de EC están claramente identificados, uno de ellos es el origen del cultivo primario para el producto de EC; el más utilizado proviene de pollos adultos libres de *Salmonella* spp. Otro recurso de cultivo primario, es el contenido intestinal de pavo, que también confiere protección contra infecciones por *Salmonella* spp.⁽⁶⁸⁾ Cultivos de EC provenientes de pollos protegen a pollos y cultivos de pavos pueden proteger a pollos; pero el contenido intestinal de otras muchas aves, no protege a los pollos.⁽⁶⁵⁾ Hasta ahora, no ha sido determinada con exactitud la edad a la cual las aves pueden ser donadoras de MNI o cultivo primario de EC, pero en un estudio realizado por Starvric *et al.* se demostró que pollos de un día de edad tratados con un producto de EC, proveniente de microflora fecal de aves adultas, sirvieron como donadores para colectar MNI, después de 6 horas de la administración del producto.⁽⁶⁵⁾

Las condiciones de cultivo del producto de EC, también son importantes. Los primeros estudios acerca de la EC, mostraron que los cultivos de EC producidos anaeróbicamente eran más efectivos y que estos sufrían una disminución en su capacidad protectora por efecto del aire. Por lo que se demostró en 1984, que los cultivos de EC necesitaban ser trabajados bajo condiciones de anaerobiosis durante su preparación, cultivo, almacenamiento y aplicación.⁽⁶⁵⁾

En la actualidad todavía muchos laboratorios alrededor del mundo continúan investigando la dosis o número de microorganismos de MNI óptimo para conferir protección en pollos de un día de edad. Se ha observado que dosis tan pequeñas de 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-8} y 5×10^{-10} g de material fecal, administrado a pollos de un día de edad, confiere una buena protección contra *Salmonella* spp; no así la administración de 10^{-10} g de material fecal.⁽⁶⁹⁾

Otro factor importante a considerar es el almacenamiento del producto de EC. Los cultivos primarios se han mantenido por medio de subcultivos, refrigeración y liofilización, pero las condiciones de almacenamiento para asegurar la estabilidad de los cultivos y mantener su eficacia de EC, no ha sido establecida.⁽⁶⁵⁾

Durante la realización de experimentos en laboratorios, los cultivos de EC son comúnmente administrados en los pollos por vía oral o inoculados con sonda en el ingluvies. Sin embargo, las explotaciones avícolas comerciales requieren que los productos de EC se administren fácilmente y con una evaluación costo-beneficio. Comercialmente en algunos países como Inglaterra y Finlandia, los productos de EC son administrados en la primer agua de bebida que reciben las aves. En otras regiones se administran por aspersión en la incubadora y en muchos otros como en Puerto Rico, utilizan la combinación de ambos.⁽⁷⁰⁾ Aunque las investigaciones al respecto continúan en todo el mundo, muchos autores coinciden que la administración por sonda al ingluvies provee una protección superior y más consistente contra infecciones por *Salmonella* spp que otras vías y que la administración de cultivos de EC en cápsulas liofilizadas, provee un nivel de protección inferior.^(65, 70, 71)

Los tratamientos contra salmonela con productos de EC, han resultado efectivos en muchos trabajos. Pero esta protección depende directamente del nivel de desafío con *Salmonella* spp; dosis altas (10^8 ufc) pueden infectar a aves tratadas con cultivos de EC, las cuales son resistentes a desafíos con 10^3 ufc.^(65, 67)

Se necesita un intervalo de tiempo entre la aplicación del producto de EC y el desafío con la bacteria patógena, con la finalidad de permitir el establecimiento de la microflora protectora en el ciego.^(67, 71) Se ha observado un nivel bajo de protección cuando la administración del producto de EC se realiza al mismo tiempo que el desafío con *Salmonella* spp, mostrando mejores resultados cuando el desafío con la bacteria se realiza después de una hora.⁽⁷²⁾ También se ha demostrado que pollos tratados con cultivos de EC e infectados por *Salmonella* spp, se recuperan

más rápido de la infección que los pollos no tratados con el producto de EC. Para que el tratamiento con el cultivo de EC sea más efectivo, los pollos tienen que recibirlo lo más rápido posible después del nacimiento y necesitaran de unas cuantas horas después (24 - 72 hrs), para el establecimiento de la MNI.^(65, 72)

Muchas plantas incubadoras están contaminadas por salmonela y la alta incidencia en pollos se atribuye a esta. La temprana exposición a salmonela en la incubadora o nacedora permite que el pollo de un día de edad llegue a la granja infectado y el tratamiento con el producto de EC resulta ineficiente.⁽⁶⁷⁾

Un factor que puede tener un impacto muy fuerte en el establecimiento de cultivos de EC es la presencia de antibióticos mezclados en el alimento, administrados vía subcutánea al día de edad, o residuos que resultan de la administración *in ovo* en el primer día de incubación o la administración a las gallinas reproductoras. Aunque algunos investigadores sugieren que esta interferencia se encuentra limitada a ciertos antibióticos.⁽⁷³⁾ Estudios *in vitro* con diferentes antibióticos demostraron que algunos de ellos tienen efecto negativo sobre la eficacia del producto de EC. La MNI de ave adulta cultivada *in vitro* con o sin zinc bacitracina o nitrovin, previene la colonización por *Salmonella* spp, pero cuando es cultivada con tetraciclina, pierde la capacidad de prevenir la colonización por salmonela.⁽⁶⁵⁾ La combinación de antibacterianos y anticoccidianos como aditivo en el alimento, es una práctica común en la industria avícola. Bailey *et al.* demostraron que la combinación de bacitracina y nicarbicina, interfiere con el efecto protector del producto de EC.⁽⁷⁴⁾ McReynolds *et al.* observaron que la administración *in ovo* al día 18 de incubación o subcutánea al día de edad de sulfato de gantamicina o ceftiofur sódico tiene un efecto negativo para el establecimiento de la EC, así como la administración de enrofloxacin en las aves reproductoras.⁽⁷³⁾

La colonización por salmonela en el SGI de los pollos y la prevención de esta, es extremadamente complicada por la infinidad de factores involucrados en estos dos procesos.

Hasta hoy no se tienen los conocimientos suficientes para entender el mecanismo de regulación y la interacción de los microorganismos con el hospedador. Antes de utilizar sistemas de control biológicos y/o químicos para la prevención de enfermedades, se debe pensar siempre en la bioseguridad, verificando que estos productos a utilizar sean inocuos para el hombre y otras especies animales.

Los cultivos bacterianos de contenido intestinal de aves adultas o cultivos derivados de la mezcla de un gran número de microorganismos no identificados, podrían incluir patógenos aviares o humanos. En Suecia y Finlandia se usan comercialmente cultivos bacterianos indefinidos, que son inaceptables en muchos otros países por la posibilidad de transmisión de patógenos aviares al hombre, por ésta razón se creó la necesidad del desarrollo de un cultivo bacteriano definido, en el cual se conozca exactamente los microorganismos que lo componen y además que sea efectivo para el control de salmonela.^(30, 75)

Recientemente se desarrolló mediante la técnica de flujo continuo, un cultivo de EC, denominado Preemt[™], el cual demostró incrementar la concentración de ácidos grasos volátiles en el ciego de pollos recién nacidos, aumentando principalmente la concentración de ácido propiónico y reduciendo la concentración de amino ácidos limitantes. Se observó que protege contra la colonización cecal por *Salmonella typhimurium*. Este cultivo bacteriano consiste en una mezcla de bacterias anaeróbicas estrictas y facultativas, Gram positivas y Gram negativas que fueron originalmente aisladas de MNI de pollos adultos sanos ^(15, 63, 75, 76)

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de la administración profiláctica de un producto de exclusión competitiva comercial^P para disminuir la mortalidad y el efecto sobre la transmisión horizontal de *Salmonella gallinarum* en pollos de engorda.

Objetivos particulares

- Comprobar el efecto de la administración profiláctica de un producto de exclusión competitiva comercial^P sobre la disminución de la mortalidad en pollos de engorda al ser inoculados con *Salmonella gallinarum*.
- Determinar el efecto de la administración profiláctica de un producto de exclusión competitiva comercial^P sobre la disminución de la transmisión horizontal en pollos de engorda que conviven con pollos inoculados con *Salmonella gallinarum*.

HIPÓTESIS

La administración profiláctica de un producto de exclusión competitiva comercial^P disminuirá la mortalidad por *Salmonella gallinarum*; así como la transmisión horizontal de *Salmonella gallinarum* en pollos de engorda.

^P Nombre comercial PreemtTM; BioScience Inc. Madison, WI, U.S.A.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación del inóculo

La cepa de desafío fue un aislamiento primario de *Salmonella gallinarum*, resistente a la novobiocina (NO) y al ácido nalidíxico (NA)¹ obtenido en el laboratorio del Departamento de Producción Animal (DPA): Aves, la cual fue donada por el Dr. Mario Padrón. El cultivo se mantuvo en un medio de cultivo que contenía 25 µg de NO y 20 µg de AN / ml. El inóculo de desafío se preparó a partir de un cultivo de 18 hrs en caldo tripticasa soya². La concentración del inóculo fue determinada mediante espectrofotometría³ a razón de 10⁹ ufc/1.0 ml, a partir de la cual se realizaron diluciones décuples seriadas en solución salina fosfatada amortiguadora (PBS por sus siglas en inglés) estéril, para lograr una concentración de 10⁶ ufc /1.0 ml. Se confirmó la concentración de células viables del inóculo de desafío mediante conteo de colonias en placas de agar verde brillante (AVB)⁴.

Los medios empleados para cultivar el aislamiento procedente de los pollos desafiados en el estudio experimental, contenía 25 µg de NO y 20 µg de AN / ml. con la finalidad de inhibir el crecimiento de otras bacterias no resistentes a estos antibióticos.

Preparación del producto de exclusión competitiva

El producto de EC comercial^o fue preparado siguiendo las instrucciones del fabricante. Un paquete de reconstituyente del diluyente fue depositado en un termo estéril que contenía 490 ml

¹ SIGMA Chemical C.O. St. Louis MO, U.S.A.

² DIFCO Laboratories, Detroit MI. U.S.A.

³ Milton Roy Spectronic 20D, Milton Roy company, U.S.A.

⁴ MERCK KGaA, Darmstadt, Germany.

^o Nombre comercial PreemtTM; BioScience Inc. Madison, WI, U.S.A.

de agua destilada estéril y fue mezclado cuidadosamente. Se tomó un paquete de 2000 dosis de producto de EC almacenadas en un congelador a -70 C y se depositó en el termo que contenía el diluyente. El producto fue administrado a los pollos 45 minutos después de su preparación. El producto de EC comercial consiste en una mezcla de 27 bacterias cecales de aves adultas (*cuadro 2*), mantenidas en cultivo de flujo continuo elaborado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica y la Universidad de Texas A & M. La metodología de elaboración, ha sido descrita anteriormente.^(15, 77, 78)

Animales de experimentación

Se utilizaron 420 pollos de engorda (Arbor acres x Arbor acres) de un día de edad, provenientes de una incubadora comercial ubicada en el estado de Morelos, México. Fueron alojados en cuatro corrales en piso, en una de las unidades de aislamiento del Departamento de producción animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al arribo de los pollitos se realizó muestreo bacteriológico del material de cama contenido en las cajas de transporte, del alimento y de 20 pollitos (para descartar la presencia de *Salmonella* spp según la NOM-005-ZOO-1993.⁽⁸⁾) Los pollos fueron alimentados con una ración balanceada sin anticoccidiano y con agua *ad libitum*.

Diseño experimental

Experimento 1: Para evaluar el efecto del producto de EC comercial sobre la mortalidad por *Salmonella gallinarum*, se utilizaron 160 pollos de un día de edad que fueron asignados aleatoriamente en dos grupos de 20 aves cada uno, con cuatro réplicas. Grupo A.- testigo con

administración de 0.25 ml de solución salina fisiológica (SSF) vía oral, grupo B.- tratado con 0.25 ml del producto de EC comercial^o vía oral, identificándolos con una marca en la cabeza con tinta indeleble, las cuales fueron remarcadas diariamente. Al tercer día de edad, ambos grupos fueron desafiados con 0.25 ml del inóculo que contenía 10⁶ ufc *Salmonella gallinarum*/ml. La mortalidad se registró durante 10 días posinoculación.

<i>Experimento 1</i>			
Grupo	Tratamiento	Vía de Inoculación	Desafío
A Testigo (+)	0.25 ml de SSF	Oral	0.25 ml de 10 ⁶ ufc/ml de <i>Salmonella gallinarum</i>
B MNI	0.25 ml de producto de EC comercial ^o .	Oral	0.25 ml de 10 ⁶ ufc/ml de <i>Salmonella gallinarum</i>

MNI = microflora nativa intestinal.

Experimento 2: Para evaluar el efecto del producto de EC comercial^o sobre la transmisión horizontal de *Salmonella gallinarum*, se utilizaron 240 pollos asignados aleatoriamente en tres grupos de 20 aves cada uno, con cuatro réplicas. Grupo C.- testigo desafiado por vía oral con 0.25 ml del inóculo conteniendo 10⁶ ufc de *Salmonella gallinarum*/ml, grupo D.- con administración de 0.25 ml de SSF vía oral, grupo E.- tratado con 0.25 ml del producto de EC comercial^o vía oral al día de edad. Todos los grupos fueron identificados con una marca en la cabeza con tinta indeleble de diferente color para cada grupo y que fueron remarcadas diariamente. Los tres grupos se alojaron en el mismo corral y se registró la mortalidad diaria durante todo el experimento. Las aves sobrevivientes se sacrificaron 10 días posdesafío para intentar el aislamiento de *Salmonella gallinarum* a partir de hígado y bazo.

^o Nombre comercial PreemtTM; BioScience Inc. Madison, WI, U.S.A.

Experimento 2			
Grupo	Tratamiento	Vía de inoculación	Desafío
C Testigo (+)	0.25 ml del inóculo	Oral	0.25 ml de 10 ⁶ ufc/ml de <i>Salmonella gallinarum</i>
D Testigo (-)	0.25 ml de SSF	Oral	Ninguno
E MNI	0.25 ml de producto de EC comercial ¹	Oral	Ninguno

MNI = microflora nativa intestinal.

Determinación de la presencia de *Salmonella gallinarum* a partir de órganos internos

De las aves muertas durante la prueba se realizó la necropsia y se tomaron muestras de hígado y bazo. Las aves sobrevivientes fueron sacrificadas humanamente por dislocación cervical y se colectaron muestras de hígado y bazo para intentar el aislamiento de *Salmonella gallinarum*.

Los órganos colectados se cultivaron de acuerdo a los lineamientos de la norma oficial mexicana para la campaña nacional contra la Salmonelosis aviar⁽⁸⁾ y el plan nacional de mejoramiento avícola de los E.U.A. (NPIP por sus siglas en ingles).^(7*) El hígado y bazo de cada pollo se colectó asépticamente y fueron cultivados, trabajándose como una muestra combinada en caldo tetrionato¹ que se incubó durante 24 hrs a 37 C. Posteriormente fue sembrado por estría en placas de AVB² conteniendo 25µg de NO/ml y 20µg de AN / ml, las cuales se incubaron a 37 C por 24 hrs y posteriormente se examinaron en busca de colonias típicas de *Salmonella gallinarum*. Además se realizaron pruebas bioquímicas para confirmar la identificación de la bacteria.

⁸ Nombre comercial PreemtTM, BioScience Inc. Madison, WI, U.S.A.

¹ DIFCO Laboratories, Detroit MI, U.S.A.

² MERCK KGaA Darmstadt, Germany.

Análisis estadístico

Para evaluar las diferencias entre los porcentajes de aislamientos positivos a *Salmonella gallinarum* y los porcentajes de mortalidad entre los grupos de cada experimento, se utilizó una prueba de Ji-cuadrada.⁽⁸⁰⁾ Para calcular los porcentajes de mortalidad y de aislamientos positivos se efectuó la división del número total de pollos muertos o número total de aislamientos positivos en las cuatro réplicas entre el número de réplicas.

RESULTADOS

Análisis bacteriológico de cama de transporte, alimento y aves

Las muestras de cama, alimento y órganos (hígado, bazo y saco vitelino) de 20 pollos resultaron negativos al aislamiento de *Salmonella* spp .

Signos clínicos

En los grupos testigo positivo de los experimentos 1 y 2 se observó depresión, deshidratación, anorexia, somnolencia, inapetencia adherencia de material blanquecino a la cloaca, diarrea y debilidad. En los grupos tratados con EC no se presentaron signos clínicos aparentes.

Mortalidad

Durante las primeras 48 hrs posinoculación se presentó el pico de mortalidad en los pollos desafiados con salmonela, disminuyendo hasta el día 6 de edad en ambos experimentos.

Experimento 1: La administración profiláctica del producto de EC comercial^o redujo significativamente ($p < 0.001$) la mortalidad en los pollos del grupo MNI comparado con el grupo testigo positivo durante un periodo de 10 días en las cuatro réplicas realizadas. El porcentaje de mortalidad para el grupo testigo positivo y los grupos tratados con el producto de EC comercial^o fueron: 73.7 y 7.5 respectivamente (*cuadro 3*).

Experimento 2: La mortalidad se redujo significativamente ($P < 0.005$) en el grupo E (MNI) cuando se comparó con el grupo C (testigo positivo) y con el grupo D (testigo negativo). El porcentaje de

^o Nombre comercial PreemtTM; BioScience Inc. Madison, WI, U.S.A.

mortalidad para los grupos C, D y E fueron: 80.0, 53.7 y 8.7 respectivamente. La mortalidad del grupo D no fue significativamente diferente comparada con el grupo testigo positivo (grupo C) (*cuadro 4*).

Invasión a órganos internos por *Salmonella gallinarum*

La transmisión horizontal de *Salmonella gallinarum* en hígado y bazo del grupo E se redujo significativamente al compararse con el grupo D. El porcentaje de aislamientos positivos a *Salmonella gallinarum* de hígado y bazo para los grupos: C, D y E fueron: 86.2, 83.7 y 35.0 respectivamente. La incidencia de *Salmonella gallinarum* en el hígado y bazo del grupo D no fue significativamente diferente comparada con el grupo testigo positivo (grupo C) (*cuadro 4*).

DISCUSIÓN

Durante los primeros 10 días *Salmonella gallinarum* mostró una alta patogenicidad que se vio reflejada por la alta mortalidad en los grupos que no recibieron el tratamiento profiláctico con el cultivo de exclusión competitiva comercial^º.

El huésped animal y su MNI conforman un ecosistema muy complejo, en el cual muchos mecanismos afectan la composición de la microbiota intestinal. La MNI afecta la colonización de otras bacterias por competencia directa de nutrientes (nutrientes y factores de crecimiento); competencia por receptores celulares en común (puntos de adhesión y estimulación de la descamación intestinal); por producción de sustancias bactericidas (colicinas, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, amonio, enzimas bacterianas, bacteriófagos, antibióticos); y creación de un ambiente restrictivo (incremento en la producción de ácidos grasos volátiles, principalmente el ácido propiónico; ácido láctico, ácido sulfhídrico, cambios en pH).^(15, 31, 49, 51, 52, 54, 55, 66, 75, 81, 82)

En este trabajo se demostró que la administración profiláctica de MNI definida, proveniente de aves adultas sanas, en pollos de un día de edad, reduce significativamente la mortalidad, comparada con los grupos no tratados con el producto de EC. Esto sugiere que el producto de EC coloniza el ciego de estos pollos e inhibe la colonización por *Salmonella gallinarum*. También se puede apreciar este efecto protector, al disminuir la transmisión horizontal de *Salmonella gallinarum* en los grupos que recibieron el tratamiento profiláctico con el producto de EC, comparándolos con el grupo desafiado con *Salmonella gallinarum* y el grupo no desafiado, no tratado con EC (grupo D). Los resultados del presente trabajo coinciden con los trabajos realizados anteriormente por otros investigadores, en los cuales se ha observado el efecto de diferentes cultivos de EC sobre la colonización e invasión de órganos por *Salmonella* spp.^(15, 19, 31, 51, 52, 53, 63, 67, 70, 75)

^º Nombre comercial Preemt™; BioScience Inc. Madison, WI, U.S.A.

En un estudio realizado por Snoeyenbos *et al.* también se observó que la MNI fue capaz de conferir protección contra la transmisión horizontal de *Salmonella* spp. Al igual que en el presente estudio, estos autores utilizaron un grupo control positivo ("grupo semilla") el cual fue alojado en el mismo corral que los grupos tratados al día de edad con el cultivo de EC, observando una disminución significativa de la transmisión horizontal de salmonela. ⁽⁸³⁾ Además, ellos pudieron observar que la MNI administrada en el grupo tratado con EC fue capaz transmitirse al "grupo semilla" (control positivo) disminuyendo así, el número de aislamientos positivos a salmonela de este grupo. De igual manera en este mismo estudio Snoeyenbos *et al.* pudieron demostrar que la administración de MNI al día 11 de edad en pollos infectados con salmonela al día de edad, fue capaz de eliminar más rápido la infección que en los grupos no tratados con EC. ⁽⁸³⁾ Pero el mecanismo terapéutico por medio del cual se reduce la infección es desconocido por los autores. En otro estudio realizado por Weinack *et al.* demostraron que la administración de cultivos de EC en pollos de 3 a 9 días de edad infectados experimentalmente con *Salmonella* spp, se recuperan más rápido de la infección que los pollos no tratados con el producto de EC. ⁽⁷²⁾ Por lo anterior, podemos deducir que la administración profiláctica de MNI tienen la capacidad de proteger ante un desafío con dosis altas de salmonela como se observó en el presente estudio. Pero además, la administración de cultivos de EC puede tener un efecto terapéutico ante las infecciones causadas por este mismo patógeno. Posiblemente estas dos características son las responsables de la disminución de la transmisión horizontal de *Salmonella gallinarum* observada en el presente estudio.

A diferencia de lo reportado por Snoeyenbos *et al.*, ⁽⁸³⁾ en el presente trabajo *Salmonella gallinarum* logró matar y colonizar órganos internos de un gran porcentaje de aves del grupo no tratado con EC (grupo D), debido probablemente a que el grado de exposición con la MNI de aves adultas contenida en el producto de EC no fue suficiente. Aunque la cama sea un buen vehículo para la transmisión de la MNI ^(72, 84, 85) existen varios factores que interactúan para que se realice adecuadamente esta actividad. Uno de ellos es la cantidad de bacterias anaerobias contenidas en la cama en el momento en que las aves son expuestas. Según Corrier *et al.* se observa un

buen nivel de protección cuando la cama contiene de 10^7 a 10^8 ufc de anaerobios/gr.⁽⁸⁴⁾ Además, se necesita que las bacterias anaerobias contenidas en la cama, no sean muy susceptibles al oxígeno libre en el ambiente por esta condición el número de bacterias anaerobias presentes en la cama, siempre será menor al número presente en el producto de EC comercial.^(84, 85) Otro factor que pudo influir en estos resultados es el tiempo que duro la prueba. Snoeyenbos *et al.* observaron que la MNI presentaba el efecto terapéutico ya antes mencionado a partir del día 25 de edad en el "grupo semilla" y a partir del día 39 de edad en el grupo tratado al día 11 de edad⁽⁸³⁾, el tiempo que duro el presente estudio fue menor (10 días), pudiendo ser esta la razón por la cual no se observó este efecto terapéutico.

Un número bajo de bacterias anaerobias de la MNI que colonicen el SGI del ave, generará un pobre nivel de protección contra patógenos entéricos, por la cantidad tan baja de ácidos grasos volátiles producidos y la pobre competencia por otros factores. Esto, aunado a que la asociación directa existente entre el incremento en la concentración de ácidos grasos volátiles, y el decremento de *Salmonella* spp en el ciego, se presenta durante los primeros 10 a 20 días posteriores al establecimiento de la MNI proveniente de la cama.⁽⁸⁴⁾

Por esta razón es importante desarrollar más estudios relacionados con la resistencia en cama de las bacterias anaerobias contenidas en los productos de EC comercial y con el posible efecto terapéutico de la MNI para el control de microorganismos patógenos en las aves. De esta manera se facilitaría la administración profiláctica y terapéutica de productos de EC en condiciones de campo.

El nivel de protección que pudo haber conferido la MNI del cultivo de EC en estudio, contra la transmisión horizontal de *Salmonella gallinarum*, pudo haber sido alto; debido a que en el "redesafío" (transmisión horizontal de *Salmonella* spp), la cantidad de ufc puede ser igual o mayor que la dosis de desafío original; como lo explica Pivnick y Nurmi, que mencionan que *la dosis conocida de desafío, introducida en el pollo por el investigador, y el continuo "redesafío" de*

compañeros de corral no infectados directamente con la dosis de desafío, pero expuestos con los pollos infectados; genera que la dosis de "redesafío" sea mayor en los pollos no infectados directamente; debido a que aves que reciben 10^3 células, excretaran de 10^7 a 10^9 salmonelas por gramo de heces, en las 1ª o 2ª semana posdesafío.⁽⁶⁵⁾ Claro que esto dependerá de muchos otros factores, como la resistencia por estirpe, la edad de desafío, el tipo de alojamiento, tipo de bacteria, entre otros como lo describen Duchet-Suchaux *et al.*⁽⁶⁶⁾

La MNI definida del producto de EC comercial^ª utilizado en este ensayo, contiene bacterias anaerobias facultativas y obligadas, pertenecientes a 10 géneros bacterianos, algunas de estas últimas, tienen la capacidad de producir ácidos grasos volátiles como: acético, propiónico y butírico; y otras que exclusivamente producen ácido propiónico. Goren *et al.* demostraron que las bacterias anaerobias obligadas, son necesarias para producir protección, pero la máxima protección se logra, cuando se acompañan de anaerobias facultativas⁽⁶⁵⁾; debido a que las bacterias anaerobias facultativas, tienen la capacidad de aprovechar el oxígeno presente y generar así, las condiciones en las cuales los microorganismos intolerantes al oxígeno pueden colonizar el sistema intestinal.^(37, 40) En el estudio de Goren *et al.*, se utilizó una mezcla de 295 cultivos puros de anaerobios obligados aislados de intestinos de pollos adultos que no lograron ser efectivos, sino hasta después de que se adicionaron cultivos anaerobios facultativos.⁽⁶⁵⁾ De aquí la importancia de que los cultivos de EC comercial contengan ambos tipos bacterianos para proveer un buen nivel de protección.

Las limitaciones en el desarrollo de cultivos de EC definidos, se atribuyen principalmente al limitado conocimiento acerca de los mecanismos de protección de esta microflora. Si logramos entender estos mecanismos, se podría proporcionar información práctica para preservar o mejorar los factores que contribuyen a la inhibición de *Salmonella* spp por cultivos de EC.⁽⁶⁷⁾

^ª Nombre comercial Preemt™; BioScience Inc. Madison, WI, U.S.A.

Los efectos de competencia por nutrientes, por receptores celulares y la creación de un ambiente restrictivo son difíciles de relacionar entre sí. Hasta el momento, solamente es posible comprender la participación de cada uno de ellos en la inhibición de patógenos entéricos. Las investigaciones acerca de la actividad inhibitoria de los coliformes sobre *Salmonella* spp *in vitro*, mostraron que esta puede ser revertida al adicionar glucosa en el medio. Esto demuestra que la inhibición se debe a la competencia por fuentes de carbono o energía.⁽⁶⁵⁾ La competencia por sustratos se puede dar por nutrientes limitantes o factores de crecimiento, pero esto ha sido poco estudiado en el SGI aviar.⁽⁶⁶⁾ El producto de EC comercial^o utilizado en el presente estudio, contiene dos cepas de *Escherichia coli*, la cepa CC-3A y la cepa CC-3B; esto sugiere que una forma de participación de estas dos bacterias y probablemente otras más, en la exclusión de *Salmonella gallinarum* es por a una competencia de fuentes de carbono.

Las poblaciones de microorganismos en el SGI, se encuentran en una constante competencia por sustratos limitantes y siempre habrá una población más eficiente para utilizar uno o varios de ellos. El nivel de población esta regulado por la cantidad de sustratos limitantes disponibles en el medio. Existe una relación directa entre el número de bacterias y la cantidad de nutrientes disponibles, por lo que a mayor concentración de nutrientes, mayor desarrollo bacteriano; y si la cantidad de nutrientes disponibles se reduce, también la cantidad de microorganismos bacterianos se disminuye.⁽⁶⁸⁾ Así, la administración profiláctica de cultivos de EC con el temprano establecimiento de la MNI en el SGI, ejercen una competencia por los nutrientes disponibles en el medio, los cuales podrían estar disminuidos en cantidad en el momento en que llegan las bacterias patógenas, provocando de esta forma la exclusión de patógenos como la observada en el presente ensayo.

En un estudio realizado por Hume *et al.*, observaron *in vitro* la actividad metabólica realizada por 27 bacterias contenidas en el producto de EC comercial PreemtTM donde demostraron un decremento en la concentración de amino ácidos limitantes al ser metabolizados a ácidos grasos

^o Nombre comercial PreemtTM; BioScience Inc. Madison, WI, U.S.A.

volátiles hasta en un 72%.⁽⁷⁸⁾ De igual forma, Ushijima y Seto atribuyen el control *in vitro* de *Salmonella* spp con cultivos de anaerobios en flujo continuo, debido a la competencia por amino ácidos limitantes como la arginina, serina, treonina y ácido aspártico.⁽⁸⁹⁾ Por lo que se deduce que la MNI contenida en el producto de EC comercial[®] es capaz de competir por factores limitantes de crecimiento y además generar un ambiente restrictivo .

La capacidad de los microorganismos para asociarse con la superficie epitelial, es un factor muy importante para controlar no sólo la composición de las comunidades epiteliales, sino además las comunidades del lumen. En cualquier área del SGI, las poblaciones bacterianas del lumen , están sujetas a ser disminuidas en número o a ser eliminadas cuando la ingesta o contenido luminal derivado de la dieta del hospedador, pasa a través del lumen hacia otra área o es eliminado en forma de heces.⁽³⁹⁾

La adhesión de *Salmonella* spp en el epitelio intestinal ha sido demostrada por microscopía electrónica de barrido. Los principales sitios para la colonización en el los intestinos son el ciego y el ingluvies.⁽⁹⁰⁾ Barrow *et al.* reportaron que en el ciego, la mayoría de microorganismos de *Salmonella* spp son aislados del lumen, más que de la capa epitelial. En cambio en el ingluvies , el número de microorganismos de *Salmonella* spp asociada con el epitelio, frecuentemente es superior al número de bacterias que se encuentran en el contenido luminal.⁽⁹¹⁾ Lo antes mencionado sugiere que al administrar el cultivo de EC comercial[®], en los primeros días de vida del pollo, no se permite que *Salmonella* spp colonice las superficies epiteliales de ingluvies y ciego, porque estas están ocupadas por la MNI del producto de EC, la simple acción mecánica de paso de la ingesta o contenido luminal, reduce el número de microorganismos de *Salmonella* spp presentes en el sistema digestivo.

Algunos microorganismos se asocian con las superficies epiteliales mediante el uso de mecanismos de motilidad para abrirse paso a través de los geles o moco que protege el epitelio

[®] Nombre comercial Preemt[™]; BioScience Inc. Madison, WI, U.S.A.

intestinal,^(39, 92) mecanismo del cual carece *Salmonella gallinarum*, por lo que podría estar en desventaja en la competencia por receptores celulares ante otras bacterias móviles como *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* sp, *Pseudomonas* sp, *Serratia liquefaciens*, *Eubacterium* sp⁽⁹²⁾; contenidas en el producto de EC utilizado en el presente estudio.

En muchos trabajos con productos de EC, siempre se menciona la producción de factores que generan un ambiente restrictivo (ácidos grasos volátiles, cambios de pH, etc.), pero esto parece ser menos importante que la ocupación física de los receptores celulares, principalmente para las bacterias que atacan, colonizan o invaden como la *Salmonella* spp.⁽⁶⁵⁾ Dávila *et al.* demostraron el grado de competencia por estos receptores celulares, al desafiar consecutivamente con 24 hrs de diferencia, a pollos de un día de edad con *Salmonella enteritidis* y *Salmonella gallinarum* y viceversa. Observaron que el primer desafío provee de protección ante un segundo desafío con el otro patógeno⁽⁹³⁾ esto sin generar un ambiente restrictivo o una respuesta inmunológica posiblemente por que el tiempo entre desafíos es muy corto, lo que sugiere que únicamente fueron ocupados los receptores celulares específicos. La sola competencia por receptores celulares, al administrar el producto de EC comercial⁹, es un factor importante en la exclusión de *Salmonella gallinarum* que se observó en el presente ensayo.

Los mecanismos involucrados en la colonización del sistema alimenticio de las aves por *Salmonella* spp, no son muy claros hasta el momento, debido a la complejidad de los mismos. Los lipopolisacáridos, pilis, proteínas de membrana externa y adhesinas han sido atribuidas como parte de estos mecanismos.⁽⁹⁴⁾

El mecanismo de unión a superficies epiteliales es la adhesión al glucocalix. La adhesión es lograda a través de fuerzas interactivas como la iónica, la bipolar, enlaces de hidrógeno, y atracción hidrofóbica. La adhesión específica es usualmente un mecanismo de dos componentes que involucra un sistema de "llave y candado".⁽⁶⁶⁾

⁹ Nombre comercial PreemtTM; BioScience Inc. Madison, WI, U.S.A.

Se sabe que la adhesión a la mucosa intestinal, es precedida por la invasión de salmonela.^(87, 95) pero el papel de esta adhesión en la colonización por *Salmonella* spp en el SGI del ave no es comprendida totalmente.⁽⁹⁴⁾ La dinámica de la colonización intestinal de algunas bacterias, es afectada por otros microorganismos intestinales⁽⁸⁷⁾ como ocurrió en el presente estudio.

La adhesión bacteriana a sustancias receptoras en el moco que protege la superficie epitelial, ha sido considerada como el primer paso en la colonización de la bacteria para invadir el epitelio intestinal. Se ha observado, que los microorganismos son atraídos por factores quimiotácticos presentes en el moco gel.⁽⁴⁹⁾ También se han identificado receptores específicos para enteropatógenos en el moco de varios mamíferos. Craven *et al.* en estudios *in vitro* demostraron la presencia de mecanismos de adherencia en el moco y en los enterocitos, ellos sugieren que el moco aunque protege al epitelio intestinal de patógenos entéricos, posiblemente también tiene la capacidad por sus componentes, de facilitar la colonización de *Salmonella* spp en los intestinos. Estos autores observaron que el moco proveniente del ciego, provee de un efectivo recurso de nutrientes para el desarrollo de salmonela.^(84, 95) En los pollos esta podría ser la razón por la cual para muchos géneros de *Salmonella*, es menos importante la penetración a través del moco y la posterior adherencia al epitelio intestinal, especialmente en los órganos con poca motilidad como el ciego,⁽⁹⁵⁾ explicando así el por que es menos frecuente aislar salmonela del epitelio cecal, que de contenido luminal.⁽⁹¹⁾

Por otro lado se han descrito diferentes adhesinas de la fimbria en la superficie celular bacteriana que se adhieren a receptores específicos en el epitelio intestinal.⁽⁶⁶⁾ La contribución de esta fimbria o pili para la colonización e infección por *Salmonella* spp, ha sido controversial.⁽⁹⁵⁾ Se ha demostrado que el efecto de inhibición de patógenos entéricos, depende de la capacidad de adhesión del cultivo bacteriano utilizado para conferir protección.

En estudios *in vitro* realizados por Craven *et al.* demostraron una reducción en el fenómeno de adhesión de *Salmonella* spp al moco cecal proveniente de pollos, mediante la exposición previa del moco a los cultivos de dos enterobacterias provenientes de intestino de pollo adulto, mediante la adición de fimbrias de enterobacterias, mediante la exposición previa del moco a una cepa de *Lactobacillus* sp y mediante la adición de lavado de bacterias o sobrenadante de medios de cultivo de *Lactobacillus* sp. Sus resultados sugieren que las enterobacterias se unen por medio de fimbrias (presumiblemente tipo 1) a receptores específicos en el moco cecal, bloqueando de esta manera la adhesión de *Salmonella* spp. Aunque se han reportado diferentes tipos de fimbrias para salmonela (tipo 1 y otras), el papel de cada una de ellas, no ha sido determinado en el fenómeno de adhesión para lograr la colonización de los intestinos de los pollos. Además, de que el efecto de la disminución de la adhesión de *Salmonella* spp mediante el uso de cultivos de *Lactobacillus* sp, se asocia con la unión del lactobacilo a sitios hidrofóbicos en las células del epitelio intestinal.⁽⁸⁷⁾ Craven *et al.* especulan, que la disminución de estos sitios para la adhesión hidrofóbica, conduce a la reducción en la adhesión de salmonela en los enterocitos y moco cecal. Los resultados de su estudio, de acuerdo al uso del lavado de bacterias o sobrenadante de medio de cultivo, puede ser atribuido también a la adhesión de fimbrias o a lo que ellos llaman "factores-celulares-libres" en el sobrenadante.⁽⁸⁷⁾

En relación a la adhesión, Spencer *et al.* han reportado la presencia de adhesinas de *Lactobacillus* sp en sobrenadante de medio de cultivo, que inhiben la adhesión de otras bacterias al epitelio intestinal.⁽⁹⁶⁾ Se han encontrado cepas adherentes de *Lactobacillus* sp que pueden ocupar receptores patogénicos y toxigénicos sin la necesidad de unirse a estos receptores, de esta manera, se limita la capacidad de patógenos (ejemplo salmonela) para colonizar los intestinos.⁽⁸⁷⁾ Otros autores sugieren, que la adherencia de *Lactobacillus* sp a la mucosa o al epitelio intestinal, podría ser mediada a través de carbohidratos, proteínas o polímeros de ácido lipoteicoico.^(39, 66, 87)

En estudios *in vitro* realizados por Craven *et al.* demostraron una reducción en el fenómeno de adhesión de *Salmonella* spp al moco cecal proveniente de pollos, mediante la exposición previa del moco a los cultivos de dos enterobacterias provenientes de intestino de pollo adulto, mediante la adición de fimbrias de enterobacterias, mediante la exposición previa del moco a una cepa de *Lactobacillus* sp y mediante la adición de lavado de bacterias o sobrenadante de medios de cultivo de *Lactobacillus* sp. Sus resultados sugieren que las enterobacterias se unen por medio de fimbrias (presumiblemente tipo 1) a receptores específicos en el moco cecal, bloqueando de esta manera la adhesión de *Salmonella* spp. Aunque se han reportado diferentes tipos de fimbrias para salmonela (tipo 1 y otras), el papel de cada una de ellas, no ha sido determinado en el fenómeno de adhesión para lograr la colonización de los intestinos de los pollos. Además, de que el efecto de la disminución de la adhesión de *Salmonella* spp mediante el uso de cultivos de *Lactobacillus* sp, se asocia con la unión del lactobacilo a sitios hidrofóbicos en las células del epitelio intestinal.⁽⁸⁷⁾ Craven *et al.* especulan, que la disminución de estos sitios para la adhesión hidrofóbica, conduce a la reducción en la adhesión de salmonela en los enterocitos y moco cecal. Los resultados de su estudio, de acuerdo al uso del lavado de bacterias o sobrenadante de medio de cultivo, puede ser atribuido también a la adhesión de fimbrias o a lo que ellos llaman "factores-celulares-libres" en el sobrenadante.⁽⁸⁷⁾

En relación a la adhesión, Spencer *et al.* han reportado la presencia de adhesinas de *Lactobacillus* sp en sobrenadante de medio de cultivo, que inhiben la adhesión de otras bacterias al epitelio intestinal.⁽⁸⁶⁾ Se han encontrado cepas adherentes de *Lactobacillus* sp que pueden ocupar receptores patogénicos y toxigénicos sin la necesidad de unirse a estos receptores, de esta manera, se limita la capacidad de patógenos (ejemplo salmonela) para colonizar los intestinos.⁽⁸⁷⁾ Otros autores sugieren, que la adherencia de *Lactobacillus* sp a la mucosa o al epitelio intestinal, podría ser mediada a través de carbohidratos, proteínas o polímeros de ácido lipoteicoico.^(38, 86, 87)

Como se puede observar, los mecanismos involucrados en el fenómeno de adhesión bacteriana son variados y complejos. Lo que es importante destacar, es la participación de los *Lactobacillus* sp y enterobacterias aisladas del SGI de pollos adultos, que puede inhibir la adhesión de salmonela a través de diferentes mecanismos. De esta misma forma, los lactobacilos y enterobacterias contenidas en el producto de EC comercial^o utilizado en el presente estudio, posiblemente participan para impedir la adherencia de *Salmonella gallinarum* de pollos de un día de edad.

Una cepa de *Lactobacillus acidophilus* que se adhiere fuertemente por medio de una proteína (S-layer) al epitelio intestinal de los pollos y que se ha comprobado que protege contra desafíos con *Salmonella* spp, después de ser cultivada varias veces en agar selectivo, pierde su capacidad de adhesión, acompañado con la pérdida de la actividad protectora contra salmonela.⁽⁶⁶⁾ De aquí la importancia de mantener los cultivos de EC en medios artificiales, sin que estos pierdan su efectividad protectora con el tiempo. La utilización de cultivos de EC comercial elaborados bajo un sistema de flujo continuo, ha demostrado en varios estudios al igual que en el presente, ser efectivos para conservar la capacidad protectora de la MNI de aves adultas, ante desafíos con *Salmonella* spp.^(15, 19, 63, 70, 75, 76, 89, 98)

La característica principal de los cultivos de EC comercial elaborados en un sistema de flujo continuo, es que se trata de reproducir *in vitro* las interacciones bacterianas que ocurren en el intestino grueso del pollo.⁽⁹⁸⁾ Es esencialmente un sistema de flujo, donde continuamente se adiciona un volumen constante de cierto medio para generar un balance. En un sistema en equilibrio, el número de bacterias por unidad de sustrato es constante o en continuo estado de crecimiento. El medio de crecimiento es formulado para que un sólo nutriente, sea el principal y limitante. La clave de este sistema es que la concentración del nutriente siempre es baja y cada gota de nutriente adicionada, es inmediatamente consumida por las bacterias. De esta forma se puede controlar la tasa crecimiento bacteriano y examinar otros factores fisiológicos que influyen

^o Nombre comercial PreemtTM; BioScience Inc. Madison, WI, U.S.A.

en el desarrollo bacteriano⁽⁹⁸⁾ Por todo esto la MNI contenida en el producto de EC comercial[®], procesada en grandes cantidades para uso comercial y almacenada a -70 C, conserva su capacidad de proteger a pollos de un día de edad contra desafíos con *Salmonella gallinarum* como se mostró en este estudio, debido a que el sistema de cultivo artificial utilizado, permite que las bacterias (MNI) no perdieran la capacidad de competencia y colonización necesarias para excluir al patógeno, la cual fue la misma que se observó en los primeros estudios acerca de la EC con cultivos provenientes de contenido cecal de aves adultas.^(31, 62)

Se han propuesto otros métodos para mantener la efectividad de los cultivos de EC, como pases a través de animales gnotobióticos,⁽⁹⁹⁾ o dar pases previos en animales convencionales, antes de administrar el cultivo de EC. Métodos que han resultado poco prácticos y costosos.⁽¹⁰⁰⁾

En los resultados del trabajo de Dávila *et al.*, se observó una disminución significativa en el grado de colonización bacteriana (95% vs. 15% de las aves) del segundo desafío de *Salmonella gallinarum* o *enteritidis* inoculada comparándola con el primer desafío (*enteritidis* o *gallinarum*),⁽⁹²⁾ no alcanzando a inhibir la colonización en su totalidad. Estos resultados indicarían que la generación de un ambiente restrictivo, competencia por nutrientes y producción de sustancias bactericidas, son factores importantes para lograr la exclusión de enterobacterias patógenas como *Salmonella gallinarum* o *enteritidis*. Por esta razón, es importante que la MNI del producto de EC comercial a utilizar, contenga diferentes géneros bacterianos que realicen esta actividad, para que juntas o separadas proporcionen un buen nivel de competencia como el alcanzado en el presente ensayo.

La protección ofrecida por la MNI de aves adultas sanas contra la multiplicación de *Salmonella* spp en el SGI, ha sido ampliamente probada en pollos,^(15, 19, 31, 51, 52, 53, 63, 67, 70, 76) Sin embargo, todos estos estudios se han realizado con animales convencionales y es difícil distinguir en ellos, el papel de la MNI (inoculada a través de los cultivos de EC) y el ambiente bacteriano que aunque

[®] Nombre comercial Preemt[™]; BioScience Inc. Madison, WI, U.S.A.

escaso, siempre esta presente en el SGI de las aves. Hudault *et al.* demostraron el efecto de la EC con MNI de aves adultas, administrada en aves gnotobióticas ante desafíos con *Salmonella* spp. La MNI utilizada en el cultivo de EC contenía al igual que el producto de EC utilizado en el presente estudio, microorganismos como *Lactobacillus* sp, *Enterococcus faecalis*, *Bacteroides* sp, *Eubacterium* sp.⁽¹⁰¹⁾ Sin embargo, el producto de EC utilizado en el trabajo de Hudault *et al.* contenía otros dos microorganismos que pueden ser patógenos para el hombre,⁽⁹²⁾ *Clostridium* sp y *Peptostreptococcus* sp,⁽¹⁰¹⁾ razón por la cual no están incluidos en el producto de EC comercial^o utilizado en el presente estudio. Por otro lado, Hudault *et al.* demostraron que estos microorganismos son capaces de excluir *Salmonella* spp de aves gnotobióticas, por lo que esta mezcla de MNI tiene la capacidad de desarrollarse en un ambiente inhabitado, sin la necesidad de interactuar con otras bacterias que pudieran estar presentes en el SGI del ave.⁽¹⁰¹⁾

Los ácidos orgánicos son producto final de la fermentación y juegan un papel primordial en el antagonismo de enterobacterias en el SGI. Mientras que el pH por si mismo es un factor, los niveles ácidos de pH incrementan la actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos. A niveles bajos de pH, los ácidos orgánicos están presentes en su forma indisociada, lo que permite atravesar la pared celular de la bacteria con mayor facilidad ya que no tienen carga eléctrica y por lo tanto ejercen un mayor efecto antimicrobiano que las formas disociadas con carga negativa.⁽⁶⁸⁾ Barnes *et al.* mostraron que diferentes bacterias anaerobias inhibían *in vitro* a salmonela y atribuían la inhibición a elevados niveles de ácidos grasos volátiles.⁽³²⁾

Las aves tratadas con cultivos de EC cultivadas en flujo continuo, muestran un incremento en la concentración de ácidos grasos volátiles, principalmente ácido propiónico. Muchos autores han determinado que un aumento en la concentración de ácido propiónico indisociado en el contenido cecal de pollos tratados con productos de EC comercial presenta menores cargas de *Salmonella* spp.^(15, 70, 84, 98, 85) El aumento en la concentración de ácido propiónico en pollos tratados con el cultivo de EC comercial^o ha sido correlacionado con un aumento de 100 veces la presencia de

^o Nombre comercial PreemTM; BioScience Inc. Madison, WI, U.S.A.

UFC de bacterias anaerobias.⁽¹⁵⁾ Por lo tanto, bajas concentraciones de ácido propiónico en el contenido cecal, sugieren que la MNI anaerobia, no logró colonizar el ciego de las aves.^(70, 75, 84) La resistencia de los pollos de un día de edad a la colonización por *Salmonella* spp cuando se administra un cultivo de EC, se encuentra directamente asociado con el incremento de ácido propiónico en el ciego.^(84, 85, 88, 100) El ácido propiónico es uno de los principales ácidos grasos volátiles resultantes del metabolismo final de muchas bacterias anaerobias obligadas presentes en el ciego.^(70, 84) Por lo que este, podría ser otro de los mecanismos de exclusión generado por la MNI del producto de EC comercial^o utilizado en el presente ensayo.

En un estudio realizado por Corrier *et al.* demostraron que el incremento en la concentración de ácidos grasos volátiles en pollos tratados con MNI de aves adultas a través de la cama se observa hasta 10 días después del tratamiento y que esto correspondió al establecimiento de la MNI en el sistema digestivo.⁽⁸⁴⁾ En cambio, en pollos de un día de edad tratados con cultivos de EC de flujo continuo, mostraron un incremento en la concentración de dichos ácidos a los 3 días de edad.^(15, 83, 84, 70) Así, el incremento en la concentración de ácidos grasos volátiles es un acontecimiento que precede al establecimiento de la MNI en el ciego de las aves. Los resultados de Corrier *et al.* demuestran que cuando el pollo recibe la MNI a través de la cama, esta tiene una dinámica más lenta para colonizar los intestinos.⁽⁸⁴⁾ Probablemente, este factor pudo haber influido en los resultados del experimento 2 del presente estudio donde el número de aislamientos de hígado y bazo positivos a *Salmonella gallinarum*, no fue diferente en el grupo no desafiado y no tratado con EC, al compararlo con el grupo que se desafió directamente con el patógeno.

Como ya se mencionó anteriormente, la gran mayoría de microorganismos de *Salmonella* spp en el ciego se encuentran en el lumen cecal.⁽⁹¹⁾ Se sabe que los productos de EC cultivados en sistema de flujo continuo tienen la característica de aumentar en el contenido cecal la concentración de ácidos grasos volátiles en su forma disociativa, principalmente del ácido propiónico; de esta manera, el gran número de microorganismos de *Salmonella* spp presentes en

^o Nombre comercial PreemtTM; BioScience Inc. Madison, WI, U.S.A.

el lumen intestinal, sufren directamente la acción bactericida de estos ácidos. Sugiriendo ser este otro de los mecanismos de exclusión que tiene el producto de EC^o cultivado en flujo continuo empleado en la presente prueba para inhibir la transmisión horizontal y la mortalidad originada por *Salmonella gallinarum*, tal como se observa en los resultados obtenidos.

Otro de los mecanismos de protección que podría estar asociado con el cultivo de EC comercial^o empleado en el presente estudio, es que al acidificar el pH del contenido cecal, no sólo se disminuye la viabilidad de las bacterias, sino además se podría generar un incremento en la mitosis celular e inducción de la modificación de receptores de las células epiteliales, necesarios para la adhesión e invasión de la bacteria.^(102, 103) Hernández *et al.* demostraron el efecto del incremento del pH del contenido cecal sobre la inhibición de la colonización por *Salmonella gallinarum* en pollos de un día de edad,⁽¹⁰²⁾ donde el pH se incremento en presencia de ácidos orgánicos. Por lo que se puede inferir que el establecimiento de la MNI en el SGI del ave, con el subsecuente incremento en la concentración de ácidos orgánicos en el lumen intestinal^(84, 85, 90, 100) podrían generar estos cambios celulares.

Por otro lado, los metabolitos antimicrobianos producidos por bacterias nativas del SGI y particularmente los lactobacilos, han sido extensamente estudiados. Se ha logrado aislar varias sustancias con actividad contra bacterias Gram negativas y Gram positivas. La Reuteria por ejemplo, es producida por el *Lactobacillus reuteri* en condiciones anaeróbicas y a un pH y temperatura similares a la de los intestinos. También se ha demostrado que el *Lactobacillus acidophilus* tiene la capacidad de producir algunas bacterinas.⁽⁶⁶⁾ Wooley *et al.* demostraron la existencia de colicinas en varias cepas de *Escherichia coli* presentes en la MNI de pollos, y que estas colicinas tienen la capacidad de inhibir el desarrollo de otros microorganismos.⁽⁶¹⁾ La mezcla bacteriana del producto de EC comercial utilizado para la exclusión de *Salmonella gallinarum* en este estudio contiene microorganismos de *Escherichia coli* y *Lactobacillus* sp. Microorganismos reconocidos como productores de sustancias antibacterianas, pero no se

^o Nombre comercial PreemtTM; BioScience Inc. Madison, WI, U.S.A.

descarta la posibilidad de que otras bacterias tengan la misma capacidad, por consiguiente, este podría ser otro mecanismo de exclusión utilizado para la inhibición del patógeno.

Miyamoto *et al.* observaron un incremento en la población de *Lactobacillus* sp de la microflora nativa de la cloaca de pollos, posiblemente como un mecanismo de defensa ante la inoculación de *Salmonella* spp intracloacal, aunque el mecanismo de incremento de estos microorganismos es desconocido, los autores sugieren que el incremento en la población de lactobacilos se debe a un efecto de protección contra una infección ascendente de *Salmonella* spp.⁽¹⁰⁴⁾ Se han realizado muchos estudios acerca del uso de *Lactobacillus* sp como microorganismo protector de patógenos. Watkins y Miller demostraron el efecto de *Lactobacillus acidophilus* para inhibir el número de *Salmonella* spp y *Staphylococcus aureus* en ingluvies, pero no en el ciego de pollos gnotobióticos.⁽¹⁰⁵⁾ Nurmi reportó protección en aves convencionales contra *Salmonella* spp al administrar mezclas de cultivos puros de lactobacilos. Pero en otros estudios no se observó protección con los mismo cultivos.⁽³¹⁾ Al igual que estos autores⁽³¹⁾ se puede inferir que los lactobacilos ayudan a conferir una mejor protección cuando son administrados, al igual que en el presente ensayo, junto con otros microorganismos de la MNI del ave.

Las primeras investigaciones acerca del uso de cultivos definidos, se realizaron con bacterias por separado. Una de estas fue *Enterococcus faecalis* que protegió a pollos contra desafíos con *Salmonella* spp. También se observó una protección temporal contra *Salmonella* spp al utilizar una cepa no identificada de *Clostridium* sp.⁽³¹⁾ Barnum en 1984 realizó algunos estudios acerca de un cultivo de EC comercial con características muy similares al utilizado en el presente estudio (mezcla de 20-30 bacterias provenientes de MNI de ciego de aves adultas, preparado comercial, fácil de almacenar, transportar y administrar) el cual logró disminuir la transmisión horizontal de *Salmonella typhimurium* ante un desafío con 10^3 ufc, en pollos que se alojaron en el mismo corral que los desafiados directamente. Pero desafortunadamente esta información no está bien detallada, debido a que no ha sido publicada.⁽³¹⁾

Stavric *et al.* observaron un buen nivel de protección al utilizar tres diferentes mezclas bacterianas provenientes de MNI de aves adultas, estas mezclas contenían *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp, *Bacteroides* sp, *Bacillus* sp, *Fusobacterium* sp, *Lactobacillus* sp, *Eubacterium* sp, *Propionibacterium* sp, *Clostridium* sp, *Bifidobacterium* sp y anaerobios Gram positivos. Estos cultivos también demostraron ser efectivos para disminuir el grado de colonización a órganos internos por salmonela, ⁽³¹⁾ como ocurrió en el presente estudio, con la diferencia de que el cultivo definido de EC comercial^o ha demostrado un buen nivel protección ante desafíos con dosis más altas del patógeno, además de que en la mezcla bacteriana no se incluye *Bacillus* sp, *Clostridium* sp, *Bifidobacterium* sp bacterias que podrían ser patógenas para el hombre y otros animales,⁽⁹²⁾ por lo que las bacterias contenidas en el producto de EC utilizado en el presente ensayo, ejercen un buen nivel de competencia en el SGI del ave y con esto un buen nivel de protección como se observó en los resultados de esta prueba.

Nurmi *et al.* seleccionaron un cultivo de EC, con base en su capacidad para adherirse a células epiteliales de el sistema alimentario del aves. Es un cultivo bacteriano proveniente de ciego y ingluvies que contiene *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp, *Bacteroides* sp, *Bacillus* sp, *Fusobacterium* sp, *Eubacterium* sp, *Propionibacterium* sp y cocos anaerobios Gram positivos. Pero Nurmi indicó la existencia de algunos problemas con la fermentación y liofilización en la producción a gran escala, y no se ha publicado información acerca de la efectividad de este producto.⁽³¹⁾

García *et al.* observaron una disminución en la transmisión horizontal de *Salmonella gallinarum* al utilizar una mezcla de bacterias provenientes de MNI de pollos adultos, el producto de EC utilizado su estudio contenía microorganismo de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus avium*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus* sp., *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* sp, *Pseudomonas* sp., *Serratia liquefaciens*, *Propionibacterium* sp., *Propionibacterium* sp., *Eubacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Fusobacterium* sp., *Veillonella* sp., *Bacteroides* sp. A

^o Nombre comercial Preemt™, BioScience Inc. Madison, WI, U.S.A.

diferencia del presente estudio, los autores no observaron diferencia estadística significativa en la mortalidad, esto se debe a que el desafío con *Salmonella gallinarum* utilizado en su ensayo, fue muy elevado (0.25 ml de inóculo conteniendo 10^8 ufc/ml),⁽¹⁰⁶⁾ comparándolo al que se utilizó en el presente estudio que fue de 0.25 ml de inóculo conteniendo 10^6 ufc/ml.

La importancia de la MNI en el SGI y los mecanismos con los que esta puede afectar la colonización de otras bacterias, posiblemente no sólo se deba por la competencia directa de nutrientes, factores de crecimiento, competencia por receptores celulares en común, exclusión por producción de sustancias bactericidas y exclusión por generación de un ambiente restrictivo sin embargo, hasta hoy son las únicas de las que tenemos conocimiento.

La disminución de la colonización por *Salmonella* spp con cultivos de EC también ha sido reportada en estudios de campo sin embargo, los resultados no son tan convincentes como los resultados en ensayos a pequeña escala. Las diferencias en condiciones higiénicas, instalaciones, calidad del agua pueden en parte, responder a estas diferencias.⁽⁶⁶⁾ Ensayos realizados en Finlandia, que involucrando 600 parvadas, mostraron una disminución en el porcentaje de positividad a salmonela del 21% al 6.5%, y de 55% al 11% con tratamientos con productos de EC. En Holanda, utilizar aspersión de cultivos de EC en la incubadora, mostró una disminución de parvadas positivas salmonela del 15.9 % al 5.2 %.⁽⁶⁶⁾ Camacho *et al.* evaluaron el efecto de un producto de EC sobre la productividad de 8 parvadas de pollo de engorda, en diversas regiones de México y observaron una mejora en la productividad, menores complicaciones respiratorias, digestivas y mejor uniformidad de la parvada.⁽¹⁰⁷⁾

La administración del cultivo de EC comercial^o en el presente trabajo se realizó por inoculación oral, obviamente esta vía de administración no es la adecuada bajo condiciones de campo en las explotaciones avícolas, sin embargo, debido al diseño de los experimentos de transmisión horizontal y tipo de instalaciones utilizadas, se tenía que evitar que el grupo control y el no tratado

^o Nombre comercial Preemt™; BioScience Inc. Madison, WI, U.S.A.

con EC, consiguieran artificialmente la MNI del producto de EC; por lo que el producto de EC comercial no pudo ser administrado en el agua de bebida. De igual forma si se hubiera aplicado en aspersión, el grupo no tratado con EC podría ser expuesto artificialmente a la MNI. Por otro lado, Corrier *et al.* compararon la respuesta de pollos tratados con productos de EC por diferentes vías como: sonda al ingluvies, en agua de bebida, en aspersión y en cápsulas liofilizadas; obteniendo resultados muy similares al utilizar cualquiera de las tres primeras vías de administración; pero al utilizar cápsulas liofilizadas, se confiere una protección menor comparada con las otras tres vías.⁽⁷⁰⁾ Por lo que la elección de la vía de administración de cultivos de EC, dependerá de las especificaciones del fabricante para la aplicación de la misma.

La importancia de todos estos estudios, no se debe limitar solamente a determinar que microorganismos son capaces de disminuir el grado de colonización de enteropatógenos, sino además conocer la capacidad que tienen estos para transmitirse rápidamente a otras aves, la resistencia para sobrevivir en cama o poder ser administrados por otras vías como agua de bebida, aspersión, o en el alimento y quizá, la más importante, que sean inocuas para el hombre y otros animales.

Muchos mecanismos complejos de control se encuentran involucrados en la regulación de la MNI y en la exclusión de enteropatógenos. El conocimiento profundo de la composición de la microflora, sus mecanismos de acción y las fuerzas que ejercen dentro de su entorno, es esencial para la comprensión de la fallas de la MNI para excluir patógenos y buscar la medida más adecuada para solucionar este desbalance en el organismo.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados de este experimento, se puede concluir que la administración profiláctica de microflora nativa intestinal de aves adultas por medio del producto de exclusión competitiva comercial^o administrado por vía oral a pollos de un día de edad y tres días después desafiados experimentalmente con *Salmonella gallinarum* (0.25×10^6 ufc/ pollo), tiene un efecto importante en la disminución de la mortalidad, también confiere un buen nivel de protección para disminuir la transmisión horizontal de este mismo patógeno.

Las características de protección que ofrece este producto, podrían ser de gran importancia en la práctica avícola, para disminuir los problemas causados por las enfermedades digestivas de las aves; principalmente las causadas por el género *Salmonella*, enfermedades que generan grandes pérdidas económicas en las producciones avícolas del país y que son de gran importancia en salud pública.

^o Nombre comercial Preemt™, BioScience Inc. Madison, WI, U.S.A.

REFERENCIAS

1. John E, Archer D. Economic impact of colonization control on foodborne disease. *Food Tech* 1987;41:77-81.
2. Archer D, Kvenger J. Incidence and cost of food-borne diarrheal disease in the United States. *J Food Protec* 1985;48:877-886.
3. Archer D. Enteric microorganism in rheumatoid diseases: causive agents and possible mechanisms. *J Food Protec* 1985;48:538-544.
4. Gast RK, ShivaprasaHL. *Salmonella* infections: Pullorum disease and Fowl typhoid. In Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald RL, Saif YM, editors. *Diseases of poultry 10th edition*. U.S.A.: Ames (Ia): Iowa State University Press, 1997:81-96.
5. Padrón NM. Generalidades sobre pullorosis y tifoidea aviar. *Memorias del VII Curso Sobre el Control y Erradicación de la Tifoidea Aviar*; 1987 agosto 12-14; Monterrey (N L) México. México (D F): Comisión Permanente para el Control y Erradicación de la Pullorosis y Tifoidea Aviar, 1987:24-26.
6. Godoy O, Téllez G, Urquiza O, Quintana JA, Hargis BM, Salado R. Patogenicidad de una cepa de campo de *Salmonella gallinarum* en pollos de engorda de un día de edad, en una infección experimental. *Memorias de la XX Convención Anual ANECA*, 1995 mayo 3-7; Acapulco (Guerrero) México. México (D F): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas A.C., 1995:144-147.
7. Urquiza BO. Salmonelosis aviar. En Hernández VX, Bächtold GE, Rivera VO. Editores Rivera VO, Zavala RJ. *Sistema de producción animal 1 aves. Vol II*. México (D F): Sistema de Universidad Abierta, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 1998:137-144.
8. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Norma oficial mexicana. NOM -005 -ZOO-1993: campaña nacional contra Salmonelosis Aviar. México (D F): SARH, 1994.
9. Padrón NM. Bacteriología y serología diagnóstica de tifoidea aviar. *Memorias del Curso Sobre Diagnóstico de Laboratorio Para la Campaña de Enfermedad de Newcastle y Salmonelosis Aviar*; 1993 junio 16; México (D F). México (D F): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas A.C., 1993:36-38.

10. Hall WJ, Legenhausen DH, Macdonald AD. Studies on fowl typhoid. I. Nature and dissemination. *Poultry Sci* 1949;28:344-353.
11. Hall WJ, Legenhausen DH, Macdonald AD. Studies on fowl typhoid. II. Control of the disease. *Poultry Sci* 1949;28:354-362.
12. Roa B, Narayanan S, Rammani DR, Das J. Avian salmonellosis: studies on *Salmonella gallinarum*. *Indian J Vet Sci* 1952;22:199-208.
13. Bouzoubaa K, Nagaraja KA, Newman J, Pomeroy B. Use of membrane proteins from *Salmonella gallinarum* for prevention of fowl typhoid infection in chickens. *Avian Dis* 1987;31:669-704.
14. Alfaro CJ. Inmunoprofilaxis contra infecciones por *Eimeria tenella* y *Salmonella enteritidis* mediante el uso de linfocinas (tesis de licenciatura). México (D F) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1997.
15. Calderón HM. Evaluación de un probiótico comercial y de linfocinas obtenidas de aves inmunizadas con *Salmonella enteritidis* en la inmunoprofilaxis contra la infección de *Salmonella gallinarum* en pollos de engorda (tesis de licenciatura). México (D F) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1996.
16. Cox NA, Bailey JS, Blankenship L, Meinersmann RJ, Stem R, McHan F. Fifty percent colonization dose for *Salmonella typhimurium* administered orally and intracloacally to young broiler chicks. *Poultry Sci* 1990;69:1809-1812.
17. Sorvari R, Naukkarinen A, Sorvary TE. Anal sucking-like movements in the chicken and chick embryo followed by the transportation of environmental material to the bursa of Fabricius, caeca and caecal tonsils. *Poultry Sci* 1997;56:1426-1429.
18. Bohnhoff M, Miller CP, Martin WR. Resistance of the mouse's intestinal tract to experimental *Salmonella* infection I.- Factors which interfere with the initiation of infection by oral inoculation. *J Exp Med* 1964;120:805-816.
19. Corrier E, Nisbet JD, Scalan MC, Tellez GI, Hargis BM, DeLoach R. Resistance against *Salmonella enteritidis* cecal colonization in Leghorn chicks by vent lip application of cecal culture. *Poultry Sci* 1994;73:648-652.
20. Duncan DL. The Physiological effects of lactose. *Nutr Abstr Rev* 1995;25:309-320.

21. Morishita Y, Fuller R, Coates ME: Influence of dietary lactose on the gut flora of chicks. *Poultry Sci* 1982;23:349-359.
22. Nava MG, Juárez EM, Téllez IG. Efecto de una dieta adicionada con un oligosacárido sintético comercial sobre los cambios morfológicos, de pH en el ciego e invasión a órganos por *E. coli* y *Salmonella enteritidis* en pollos de engorda de un día de edad. Memorias de la XXIV Convención Anual ANECA; 1999 mayo 5-8; León (Gto) México. México (D F): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas A.C., 1999:200-203.
23. Tellez IG. Endogenous factors and mechanisms that confer resistance to *Salmonella enteritidis* infectivity in the intestinal tract of Leghorn chickens (tesis de doctorado). College Station, Texas: College of Veterinary Medicine, Texas A & M University, 1992.
24. Tellez IG, Corrier E, DeLoach R, Hargis BM. Prolonged administration of dietary lactose alters cecal morphology, chemistry and susceptibility to *Salmonella enteritidis* organ invasion in Leghorn chicks. *Poultry Sci* 1993;72:636-642.
25. Kogut M, Fukata T, Tellez GI, Hargis M. Effect of *Eimeria tenella* infection on resistance to *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chicks with anaerobic cecal flora and feed dietary lactose. *Avian Dis* 1994;38:59-64.
26. Tellez GI, Jaeger L, Dean CE, Corrier E, Williams JD, DeLoach R, Hargis BM. Prolonged administration of dietary capsaicin reduces *Salmonella enteritidis* in Leghorn chicks. *Avian Dis* 1993;37:143-148.
27. Deschner EE, Cohen BI, Raicht RF. Acute and chronic effect of dietary cholic acid on colonic epithelial cell proliferation. *Digestion* 1982;21:290-296.
28. Lupton JR, Jacobs LR. Fiber supplementation results in expanded proliferative zones in rat gastric mucosa. *Am J Clin Nutr* 1987;46:980-984.
29. Cox NA, Bailey JS, Mauldin JM, Blankenship LC. Presence and impact of *Salmonella* contamination in commercial broiler hatcheries. *Poultry Sci* 1990;69:1606-1609.
30. Goren E, Dejong WA, Doornenbal P, Bolder NM, Mulder AW, Jansen A. Reduction of *Salmonella* infection of broilers by spray application of intestinal microflora; a longitudinal study. *Vet Q* 1988;10:249-255.

31. Stavric S. Microbial colonization control of chicken intestine using defined cultures. *Food Tech* 1987;41:93-98.
32. Barnes EM, Mead GC, Barnum DA, Harry EG. The intestinal flora of the chicken in the period 2-6 weeks of age with particular reference to the anaerobic bacteria. *Poultry Sci* 1972;13:311-326.
33. Mead G, Adams BW. Some observations on the caecal microflora of the chicks during the first two weeks of life. *Br Poultry Sci* 1975;16:169-176.
34. Soerjadi AS, Stehman SM, Snoeyenbos GH, Weinack OM, Smyser CF. Some measurements of protection against paratyphoid *Salmonella* and *E. coli* by competitive exclusion in chickens. *Avian Dis* 1981;25:706-712.
35. Leitner G, Heller DE. Colonization of *Escherichia coli* in young turkeys and chickens. *Avian Dis* 1992;36:211-220.
36. Lee A. Neglected niches, the microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Adv Microb Ecol* 1985;8:115-124.
37. Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Ann Rev Microbiol* 1977;31:107-115.
38. Savage DC. Role of the gastrointestinal microflora in mammalian nutrition. *Ann Rev Nutr* 1986;6:155-163.
39. Savage DC. Factors influencing biocontrol of bacterial pathogens in the intestine. *Food Tech* 1987;41:82-87.
40. Savage DC. Mechanisms by which indigenous microorganism colonize gastrointestinal epithelial surfaces. *Prog Food Nutr Sci* 1983;7:65-71.
41. Mueller RE, Asplund JM, Iannotti EL. Successive changes in the epimural bacterial community of young lambs revealed by scanning electron microscopy. *Appl Environ Microbiol* 1984;47:715-723.
42. Freter R, Brickner H, Botney M, Clean D, Aranki A. Mechanisms that controls bacterial populations in continuous-flow culture models of mouse large intestinal flora. *Infect Immun* 1983;39:676-685.

43. Farner DS. Gastric hydrogen ion concentration and acidity in the domestic fowl. *Poultry Sci* 1943;22:79-87.
44. Winget CM, Ashton GC, Cawley AJ. Changes in gastrointestinal pH associate with fasting in the laying hen. *Poultry Sci* 1962;41:1115-1125.
45. Sturkie PD. *Fisiología aviar*. Zaragoza, España: Acribia, 1968.
46. Forsythe SJ, Parker DS. Nitrogen metabolism by the microbial flora of the rabbit caecum. *J Appl Bacteriol* 1985;58:363-370.
47. McCarthy DM, Jenq W, Savage DC. Mitochondrial DNA in *Candida pinotlopesii*, a yeast indigenous to the surface of the secreting epithelium of the murine stomach. *Appl Environ Microbiol* 1987;53:345.
48. Savage DC. Adherence of the normal flora. In: Boedeker EG, editor. Attachment of organisms to the gut mucosa. Boca Ratón (FI) CRC Press, 1984:3-4.
49. Stanton TB, Savage DC. Motility as a factor in bowel colonization by *Roseburia cecicola*, an obligately anaerobic bacterium from the mouse caecum. *J Gen Microbiol* 1984;130:173-183.
50. Savage DC. Morphological diversity among members of the gastrointestinal microflora. *Int Rev Cytol* 1983;82:305-311.
51. Loyd AB, Cumming BR, Kent DR. Prevention of *Salmonella typhimurium* infection in poultry by pretreatment of chickens and poults with intestinal extracts. *Austr Vet J* 1977;53:82-87.
52. Nurmi E, Rantala M. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature* 1973;241:210-211.
53. Snoeyenbos GH, Weinack MO, Smyser FC. Further studies on comparative exclusion for controlling salmonellae in chicks. *Avian Dis* 1979;23:904-914.
54. Barnes EM, Impery CS, Cooper MD. Manipulation of the crop and intestinal flora of the newly hatched chick. *Clin Nutr* 1980;33:2426-2433.
55. Barnes EM. The intestinal microflora of poultry and gamebirds during life and after storage. *J Appl Bacteriol* 1972;46:407-419.
56. Que JV, Casey WS, Hentges JD. Factors responsible for increased susceptibility of mice to intestinal colonization after treatment with streptomycin. *Infect Immun* 1986;53:116-123.

57. McCormick EL, Savage DC. Characterization of *Lactobacillus* sp strain 100-37 from murine gastrointestinal tract: ecology, plasmid content, and antagonistic activity toward *Clostridium ramosum* H1. *Appl Environ Microbiol* 1983;46:1103-1112.
58. Dominic MA, Jensen AE. Colonization and persistence of *Escherichia coli* in axenic and monoaxenic turkeys. *Am J Vet Res* 1984;45:2331-2335.
59. Harry EG, Hemsley DC. The association between the presence of septic strains of *Escherichia coli* in the respiratory and intestinal tracts of chickens and the occurrence of colisepticemia. *Vet Rec* 1965;77:35-40.
60. Leitner G, Heller DE. Colonization of *Escherichia coli* in young turkeys and chickens. *Avian Dis* 1992;36:211-220.
61. Wooley RE, Brown J, Gibbs PS, Nolan LK, Turner KR. Effect of normal intestinal flora of chickens on colonization by virulent colicin V-producing, avirulent, and mutant colicin V-producing avian *Escherichia coli*. *Avian Dis* 1994;38:141-145.
62. Cox Na, Bailey JS. Salmonella en la Avicultura. El problema y la intervención de la investigación. Memorias del Curso de Actualización Sobre *Salmonella enteritidis* y *Campylobacter* en las Aves Domésticas; 1991 marzo 13; México D F México (D F): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas A.C., 1991:12-14.
63. Nisbet JD, Corrier DE, Scalan MC, Hollister GA, Beier RC, DeLoach RJ. Effect of dietary lactose and cell concentration on the ability of a continuous-flow derived bacterial culture to control *Salmonella* cecal colonization in broiler chickens. *Poultry Sci* 1994;73:56-62.
64. Corrier DE, Nisbet JD, Scalan MC, Hollister GA, DeLoach RJ. Control of *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chicks with a continuous-flow characterized mixed culture of cecal bacteria. *Poultry Sci* 1995;74:916-924.
65. Bailey JS. Factors affecting microbial competitive exclusion in poultry. *Food Tech* 1987;41:88-92.
66. Spring P. El concepto de exclusión competitiva y la microflora intestinal avícola. Memorias del 10º Curso de Actualización Avimex: Salud y Productividad Aviar; 1998 julio 31; México (D F). México (D F): Laboratorio Avimex, S.A. de C.V., 1998:41-59.

67. Primm ND, Kristen V, Wykle L, Hofacre CL. Application of normal avian gut flora by prolonged aerosolization onto turkey hatching eggs naturally exposed to salmonella. *Avian Dis* 1997;41:455-460.
68. Reid CR, Barnum DA. Evaluation of turkey cecal microflora in protecting day-old poults from *Salmonella typhimurium* challenge. *Avian Dis* 1983;23:442-446.
69. Blanchfield B, Stavric S, Gleeson T, Pivnjck H. Minimum intestinal inoculum for Nurmi cultures and a new method for determining competitive exclusion of *Salmonella* from chicks. *J Food Protec* 1984;47:542-545.
70. Corrier DE, Hollister AG, Nisbet DJ, Scanlan CM, Beier RC, DeLoach JR. Competitive exclusion of *Salmonella enteritidis* in Leghorn chicks: comparison of treatment by crop gavage, drinking water, spray, or lyophilized alginate beads. *Avian Dis* 1994;38:297-303.
71. Blankenship LC, Bailey JS, Cox NA, Stern R, Brewer R, Williams O. Two step mucosal competitive exclusion flora treatment to diminish salmonellae in commercial broiler chickens. *Poultry Sci* 1993;72:1667-1672.
72. Weinack OM, Snoeyenbos GH, Soerjadi-Liem AS, Smyser CF. Therapeutic trials with native intestinal microflora for *Salmonella typhimurium* infections in chickens. *Avian Dis* 1985;29:1230-1234.
73. McReynolds JL, Caldwell DY, Bamhart ET, DeLoach JR, McElroy AP, Hargis BM, Caldwell DJ. Administración *in ovo*, subcutánea o de antibióticos maternos y establecimiento de cultivos de exclusión competitiva en pollos neonatales. Memorias de la XXIV Convención Anual ANECA, 1999 mayo 5-8; León (Gto) México. México (D F): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas A.C., 1999:322-327.
74. Bailey JS, Blankenship LC, Stern NJ, Cox NA, McHan FM. Effect of anticoccidial and antimicrobial feed additives on prevention of *Salmonella* colonization of chicks treated with anaerobic cultures of chickens feces. *Poultry Sci* 1986;65:8-13.
75. Nisbet JD, Corrier DE, Scalan MC, Hollister GA, Beier RC, DeLoach RJ. Effect of defined continuous-flow derived bacterial culture and dietary on *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chickens. *Avian Dis* 1993;37:1017-1025.

76. Hume ME, Nisbet DJ, DeLoach JR. *In vitro* ¹⁴C-amino acid fermentation by CF3™, characterized continuous - flow competitive exclusion culture of caecal bacteria. J Appl Microbiol 1997;83(2):236-242.
77. Corrier DE, Nisbet DJ, Scalan CM, Hollister A, DeLoach JR. Control of *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chicks with a continuous fowl characterized mixed culture of cecal bacteria. Poultry Sci 1995;74:916-924.
78. Nisbet DJ, Corrier DE, DeLoach JR, inventors. College Station Texas, owners. Probiotic for control of salmonellae in fowl produced by continuous-culture of fecal/cecal material. U.S. Patent 5,604,127. 1997 February 18.
79. United States Department of Agriculture. Animal and plant health inspection service. Maryland, U.S.:NPIP, 1989.
80. Zar J. Biostatistical analysis. 2nd ed. Englewood Cliffs (N J): Prentice-Hall Inc, 1984.
81. Snoeyenbos GH, Soerjadi SA, Weinack OM. Gastrointestinal colonization by *Salmonella* and pathogenic *Escherichia coli* in monoxenic and aloxenic chicks and poults. Avian Dis 1982;26:266-275.
82. Konisky J. Colicins and other bacteriocins whith established modes of action. Ann Rev Microbiol 1982;36:125-144.
83. Snoeyenbos GH, Weinack OM, Soerjadi-Liem AS, Miller BM, Woodward DE, Weston CR. Large-scale trials to study competitive exclusion of *Salmonella* in chickens. Avian Dis 1985;29:1004-1010.
84. Corrier DE, Hinton A, Hargis B, DeLoach JR. Effect of used litter from floor pens of adult broiler on *Salmonella* colonization of broiler chicks. Avian Dis 1992;36:897-902.
85. Manning JG, Hargis BM, Hinton A, Corrier DE, DeLoach JR, Creger CR. Effect of selected antibiotics and anticoccidials on *Salmonella enteritidis* cecal colonization and organ invasion in Leghorn chicks. Avian Dis 1994;38:256-261.
86. Duchet-Suchaux M, Mompert F, Berthelot F, Beaumont C, Léchopier P, Pardon P. Differences in frequency, level, and duration of cecal carriage between four outbred chicken lines infected orally with *Salmonella enteritidis*. Avian Dis 1997;41:559-567.

87. Craven SE, Williams DD. Inhibition of *Salmonella typhimurium* attachment to chicken cecal mucus by intestinal isolates of *Enterobacteriaceae* and *Lactobacilli*. *Avian Dis* 1997;41:548-558.
88. Ricke SC, Nisbet DE, Corrier DE, DeLoach JR. Ecology of *Salmonella* spp competitiveness under anaerobic and gastrointestinal growth conditions. *Memorias de la XXI Convención Anual ANECA y Proceedings of the Fourty- Fifth Western Poultry Disease Conference*; 1996 mayo 1-5; Cancún (Quintana Roo) México. México (D F): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas A.C.,1996:280-285.
89. Ushijima T, Seto A. Selected fecal bacteria and nutrients essential for antagonism of *Salmonella thyphimurium* in anaerobic continuous flow cultures. *J Med Microbiol* 1991;35:111-117.
90. Soerjadi SA, Rufner R, Snoeyenbos GH, Weinack OM. Adherence of salmonellae and native gut microflora to the gastrointestinal mucosa of chicks. *Avian Dis* 1982;26:576-584.
91. Barrow PA, Simpson JM, Lovell MA. Intestinal colonization in the chick by food-poisoning *Salmonella* serotypes; microbial characteristic associated with faecal excretion. *Avian Pathol* 1988;17:571-588.
92. Davis BD, Dulbecco R, Eisen NH, Ginsberg HS. *Tratado de microbiología*. 3ª ed. Barcelona, España: Salvat, 1984.
93. Dávila IM, Téllez IG, García EG, Hargis BM. Exclusión competitiva entre *Salmonella enteritidis* y *Salmonella gallinarum* en pollitos de 1 día de edad infectados simultánea o consecutivamente. *Vet Méx* 1996;27:295-298.
94. Craven SE, Cox NA, Bailey JS, Stern NJ, Meinersmann RJ, Blankenship LC. Characterization of *Salmonella californica* and *S. typhimurium* strains with reduced ability to colonize the intestinal tract of broiler chicks. *Avian Dis* 1993;37:399-348.
95. Craven SE, Cox NA, Bailey JS, Blankenship LC. Binding of *Salmonella* strains to immobilized intestinal mucosal preparations from broiler chickens. *Avian Dis* 1992;36:296-303.
96. Spencer RJ, Chesson A. The effect of *Lactobacillus* sp. on the attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated porcine enterocytes. *J Appl Bacteriol* 1994;77:215-220.

97. Snoeyenbos GH, Weinack OM, Smyser FC. Protecting chicks and poults from salmonellae by oral administration of "normal" gut microflora. *Avian Dis* 1978;22:273-287.
98. Nisbet DJ, Corrier DE, DeLoach JR. Effect of mixed cecal microflora maintained in continuous culture and of dietary lactose on *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chicks. *Avian Dis* 1993;37:528-535.
99. Nisbet DJ, Corrier DE, Ricke SC, Hume ME, DeLoach JR. Maintenance of a competitive exclusion culture by continuous-flow fermentation. *Memorias de la XXI Convención Anual ANECA y Proceedings of the Forty- Fifth Western Poultry Disease Conference*; 1996 mayo 1-5; Cancún (Quintana Roo) México. México (D F): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas A.C., 1996:275-278.
100. Ziprin RL, Corrier DE, DeLoach JR. Control of established *Salmonella typhimurium* intestinal colonization with in vivo-passaged anaerobes. *Avian Dis* 1993;37:183-188.
101. Hudault S, Bewa H, Bridonneau C, Raibaud P. Efficiency of various bacterial suspensions derived from cecal floras of conventional chickens in reducing the population level of *Salmonella typhimurium* in gnotobiotic mice and chicken intestines. *Can J Microbiol* 1985;31:832-838.
102. Hernández X, Vicente JL, Téllez IG, López C, Hargis B. Efecto de la adición del ácido cápsico, proveniente de la semilla de paprika en la dieta de pollo de engorda infectado experimentalmente por *Salmonella gallinarum*. *Vet Méx* 1996;27:309-313.
103. Tellez IG, Corrier DE, DeLoach JR, Jaeger L, Hargis BM. Effect of dietary lactose on cecal morphology, pH, organic acids and *Salmonella enteritidis* organ invasion in Leghorn chicks. *Poultry Sci* 1993;72:636-642.
104. Miyamoto T, Horie T, Fukata T, Sasai K, Baba E. Changes in microflora of the cloaca and oviduct of hens after intracloacal or intravaginal inoculation with *Salmonella enteritidis*. *Avian Dis* 1998;42:536-544.
105. Watkins BS, Miller BF. Competitive exclusion of avian pathogens by *Lactobacillus acidophilus* in gnotobiotic chicks. *Poultry Sci* 1983;62:1772-1777.
106. García DL, Téllez GI, Nisbet D, Corrier D, DeLoach J, Hargis B, Paasch M. Evaluación de un probiótico para la prevención de la infectividad y mortalidad por *Salmonella gallinarum* en

pollos de engorda de un día de edad. Memorias de la XXI Convención Anual ANECA y Proceedings of the Fourty- Fifth Western Poultry Disease Conference; 1996 mayo 1-5; Cancún (Quintana Roo) México. México (D F): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas A.C.,1996:285-288.

107. Camacho FE, Soto PE, Gómez DM, González J. Efecto de un producto de exclusión competitiva sobre la productividad de parvadas comerciales de pollo de engorda. Memorias de la XXIV Convención Anual ANECA, 1999 mayo 5-8; León (Gto) México. México (D F): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas A.C.,1999:28-29.

Cuadro 1.- Algunos factores que probablemente influyen sobre los microorganismos autóctonos en el SGI*

FACTOR	ÁREA DEL SISTEMA DIGESTIVO	PARÁMETRO
Dieta del hospedador	Boca; esofago, ingluvies, proventrículo, molleja, intestino delgado.	Componentes nutricionales de la dieta modificados por enzimas (amilasa, ptialina), HCl, u otras enzimas del hospedador o de las bacterias; la modificación física en molleja, modificación por enzimas pancreáticas, intestinales y de las bacterias, la absorción epiteal, los componentes nutricionales no digeridos, ni absorbidos; modificaciones por bacterias de áreas proximales, síntesis de sustancias en ciego.
Urea	Todas las áreas	Recurso de nitrógeno
Temperatura	Todas las áreas	Temperatura corporal del ave (40-43 c)
pH	Ingluvies Proventrículo Molleja Intestino delgado Intestino grueso Del SGI en general	4.57 4.17 2.6 6.67 7.09 Es más alto en aves jóvenes.
Oxígeno	Todas las áreas	Proveniente del alimento, ingesta de aire y oxigenación celular
Motilidad	Intestino grueso	Poco movimiento y el tiempo que permanece el contenido antes de ser vaciados.
Bilis	Intestino delgado	Es ácida (pH 5.0 - 6.8)
Competencia bacteriana	todas las áreas	Competencia bacteriana por nutrientes y superficies celulares.
Ácido láctico	Intestinos	Inhibe ciertos géneros bacterianos y disminuye pH del contenido.
Ácidos grasos volátiles	Intestino grueso	Inhibe ciertos géneros bacterianos y disminuye pH del contenido.
Bacteriocinas	todas las áreas	Efectos desconocidos, inhibe ciertos géneros bacterianos.
Ácido sulfhídrico	Intestino grueso	Inhibe el crecimiento de algunos microorganismos y disminuye pH del contenido.

* Sistema gastrointestinal

Modificado de Savage C. 1987,⁽³⁸⁾ y Sturkie P. 1968⁽⁴⁴⁾

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 2.- Bacterias presentes en el cultivo Bacteriano Preemt™, aisladas de microflora cecal nativa de pollos adultos y mantenida en flujo continuo ⁽⁴⁸⁾

Bacteria	Anaerobio facultativo	Anaerobio obligado
<i>Enterococcus faecalis</i> (cepa M)	+	
<i>Enterococcus faecalis</i> (cepa N)	+	
<i>Enterococcus faecalis</i> (cepa O)	+	
<i>Enterococcus faecalis</i> (cepa X)	+	
<i>Enterococcus faecalis</i> (cepa Z)	+	
<i>Enterococcus avium</i>	+	
<i>Lactococcus lactis</i>	+	
<i>Lactococcus</i> sp	+	
<i>Escherichia coli</i> (cepa CC-3A)	+	
<i>Escherichia coli</i> (cepa CC-3B)	+	
<i>Citrobacter freundii</i>	+	
<i>Enterobacter</i> sp	+	
<i>Pseudomonas</i> sp	+	
<i>Serratia liquefaciens</i>	+	
<i>Propinobacterium</i> sp ^{1,2}		+
<i>Propinobacterium</i> sp ^{1,2}		+
<i>Propinobacterium</i> sp ^{1,2}		+
<i>Propinobacterium</i> sp ^{1,2}		+
<i>Propinobacterium</i> sp ^{1,2}		+
<i>Eubacterium</i> sp ¹		+
<i>Eubacterium</i> sp ^{1,2}		+
<i>Eubacterium</i> sp ¹		+
<i>Lactobacillus</i> sp		+
<i>Fusobacterium</i> sp ¹		+
<i>Veillonella</i> sp ^{1,2}		+
<i>Bacteroides</i> sp ¹		+

¹ Anaerobios obligados que producen ácidos grasos volátiles: ácido acético, ácido propiónico y/o ácido butírico

² Anaerobios obligados que producen ácido propiónico.

Cuadro 3.- Efecto del producto de exclusión competitiva comercial^o sobre la mortalidad de pollos de engorda infectados con *Salmonella gallinarum*

Grupo	Número de pollos muertos/total (%)
A Testigo (+)	14.7/20 (73.7)^a
B MNI	1.5/20 (7.5)^b

*Valores de cada columna con diferente literal son estadísticamente diferentes ($p < 0.001$)

Valores promedio de las cuatro réplicas obtenidos a partir de la suma total de la mortalidad en las cuatro réplicas, dividido entre el número de réplicas realizadas.

Valores dentro del paréntesis indican el porcentaje de mortalidad.

Grupo A: desafiado con 0.25 ml de inóculo conteniendo 10^6 ufc de *Salmonella gallinarum*/ml

Grupo B: tratado con 0.25 ml de producto de exclusión comercial^o.

^o Nombre comercial Preemt™; BioScience Inc. Madison, WI, U.S.A.

Cuadro 4.- Efecto del producto de exclusión competitiva comercial^o sobre la mortalidad y la invasión de órganos internos de pollos de engorda en la transmisión horizontal de *Salmonella gallinarum*

Grupo	Número de pollos muertos/total (%)	Número de aislamientos de hígado y bazo positivos a <i>Salmonella gallinarum</i>/total (%)
C	16.0/20 (80.0)^a	17.2/20 (86.2)^a
D	10.7/20 (53.7)^a	16.7/20 (83.7)^a
E	1.7/20 (8.7)^b	7.0/20 (35.0)^b

*Valores de cada columna con diferente literal son estadísticamente diferentes (p<0.005)

Valores promedio de las cuatro réplicas obtenidos a partir de la suma total de la mortalidad en las cuatro réplicas, dividido entre el número de réplicas realizadas
Valores dentro del paréntesis indican el porcentaje de mortalidad

Grupo C= desafiado con 0.25 ml de caldo de cultivo conteniendo 10⁶ ufc de *Salmonella gallinarum*/ml

Grupo D= no desafiado con *Salmonella gallinarum*, no tratado con el producto de exclusión competitiva comercial^o

Grupo E= tratado con el producto de exclusión competitiva comercial^o

^o Nombre comercial PreemtTM; BioScience Inc. Madison, WI, U.S.A.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**