

01621
35



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE UN PREBIÓTICO (HARINA DE
ASPERGILLUS sp) EN EL ALIMENTO SOBRE LA
INMUNIDAD HUMORAL INTESTINAL DE LOS POLLOS
CONTRA SALMONELLA ENTERITIDIS Y EIMERIA spp.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Médico Veterinario Zootecnista

P R E S E N T A

DULCE ANGÉLICA GRAJEDA GÓMEZ

Asesores: Rubén Merino Guzmán

Marco Antonio Juárez Estrada

México D.F. Abril de 2003



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas
UNAM a difundir en formato electrónico a internet
el contenido de mi trabajo, recibo

NOMBRE: Dulce Angélica Grajeda Gómez

FECHA: 04/04/03

SIRMA: [Firma]



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

PAGINACION DISCONTINUA

DEDICATORIA

A mi querida Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

A mi maestro y amigo, Rubén Merino que compartió su tiempo y esfuerzo conmigo..

A Marco Antonio Juárez Estrada por compartir su conocimiento.

A Alberto, por llenar cada segundo de mi vida de amor, por ser mi amigo y cómplice de mis sueños y por ser la persona que más amo.

A mis padres Lolita y Fernando que no sólo me dieron la vida, sino la llenaron de amor, comprensión, confianza y apoyo. Los amo.

A mis papás segundos, Finita y Ramón, por todo el apoyo y cariño.

A mis hermanos, Nandín, Angélica, Paola, Josie, Daniel, Ramón y Ana, por su cariño y amistad.

A mis niñas, Andrea, Karen, Sofía y Mariana por hacerme participe de sus sonrisas.

A Marta por cuidarme y amarme desde el cielo.

A Alvaro, por compartir su experiencia conmigo.

A ustedes que aunque no estén presentes los llevo en el corazón.



AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al Departamento de Producción Animal: Aves, de mi querida Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la honorable Universidad Nacional Autónoma de México, y a todos aquellos profesores que dejaron huella en mi y me ayudaron a formarme profesionalmente:

Rubén Merino Guzmán

Marco Antonio Juárez Estrada

Fernando Córdova

Pablo Pérez Espina

Francisco Trigo Tavera

Irene Joyce Blank Hamer

Carlos Esquivel Lancroix

José Fernando Núñez Espinosa

Jesús Marín Heredia

Carlos A. López Díaz

Héctor Sumano López

Marcela Figueroa Ochoa

Edgardo Canizal Jiménez

Humberto Troncoso Altamirano

Javier Flores Covarrubias

Alfonso Arzave Barrera

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MATERIAL Y MÉTODOS.....	7
RESULTADOS.....	10
DISCUSIÓN.....	12
LITERATURA CITADA.....	19
TABLAS Y FIGURAS.....	22

RESUMEN

GRAJEDA GÓMEZ, DULCE ANGÉLICA. Efecto de la adición de un prebiótico (harina de *Aspergillus* sp) en el alimento sobre la inmunidad humoral intestinal de los pollos contra *Salmonella enteritidis* y *Eimeria* spp (bajo la dirección de Rubén Merino Guzmán y Marco Antonio Juárez Estrada).

Se cuantificó IgA en diferentes regiones intestinales de pollos ($n = 5$) de 28 y 18 días suplementados con el prebiótico harina de *Aspergillus* sp durante 20 y 17 días, desafiados con *Eimeria acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella* o desafiados con *Salmonella enteritidis*, respectivamente. Los pollos con el prebiótico y no desafiados con coccidias tuvieron menor concentración de IgA (613, 633, 667 y 733 ng / ml en el duodeno, yeyuno, ileo y ciego respectivamente) que los pollos sólo desafiados (1012, 1110, 1158 y 1142 ng / ml en el duodeno, yeyuno, ileo y ciego respectivamente), $P < 0.05$. La concentración de IgA en los pollos que recibieron el prebiótico y fueron desafiados no fue diferente a la de los grupos no desafiado y sin prebiótico o desafiado y sin prebiótico, ($P > 0.05$). El testigo negativo del experimento con *Salmonella* tuvo menor concentración de IgA (91 ng/ml) en el duodeno ($P < 0.05$) que los grupos con prebiótico-sin desafío y prebiótico-desafío (699 y 805 ng / ml respectivamente). No hubo diferencia ($P > 0.05$) en la concentración de IgA en el duodeno entre los grupos desafiado, con prebiótico y con prebiótico-desafío, tampoco en la concentración de IgA en el ileo de todos los grupos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la industria avícola se encuentra en un contexto de alta competitividad, por lo cual la protección contra diferentes agentes virales, bacterianos, parasitarios y dietéticos que afectan continuamente la integridad de la mucosa digestiva de las aves, es de suma importancia para obtener una buena productividad.^{1,2} Por esta razón a nivel mundial recientemente se ha incrementado el estudio de la anatomía y fisiología del tracto digestivo aviar. Dentro de los modelos para este estudio se encuentran los de tipo físico (tiempo de tránsito gástrico, análisis morfométrico, peso de las aves, uniformidad, peso de intestinos y grado de viscosidad), biológicos (desafío ante *Salmonella enteritidis*, enteritis necrótica y coccidias) y químicos (pH, ácidos grasos volátiles, aminoácidos, análisis químico proximal, minerales del hueso, calcio y fósforo en heces, química sanguínea e inmunidad humoral), dentro de este último modelo se incluye la detección y cuantificación de la inmunoglobulina A secretoria (IgA).³ Esta inmunoglobulina es sintetizada por linfocitos B diferenciados en células plasmáticas que se encuentran en el tejido linfoide de la submucosa intestinal, dicha diferenciación, se realiza gracias a la Interacción del inmunógeno con la célula presentadora de antígeno, evento que al llevarse a cabo, estimula a el linfocito T colaborador para producir interleucinas. Estas por un lado inician la respuesta inmune celular, y por el otro participan en la maduración de linfocitos B (la interleucina 4 es el factor de crecimiento de linfocitos B y la interleucina 5 es el factor de diferenciación de estas células), para la producción de anticuerpos.⁴ La IgA sintetizada en forma de dímero, es el isotipo predominante en las secreciones de las mucosas, el cual juega un papel muy importante en contra de algunos patógenos potenciales, como *Salmonella* spp., y Eimerias.⁵ Esta IgA es nominada IgA secretoria, ya que a diferencia de la IgA sérica, contiene un componente secretorio (cadena polipeptídica adicional) que confiere a esta IgA secretoria importantes ventajas biológicas, tales como la resistencia a la degradación proteolítica y ayuda en la fijación de la inmunoglobulina a la mucosa del epitelio. Estas propiedades aseguran un aporte constante y estable de anticuerpos a la superficie mucosa. La capacidad de los anticuerpos para impedir la fijación de diversos patógenos al epitelio intestinal, puede darse mediante la aglutinación de microorganismos formando retículos, haciendo, así más fácil su eliminación por peristalsis. También los anticuerpos pueden revestir los receptores de las bacterias impidiendo, por lo tanto, que éstos se fijen al epitelio. Específicamente la

IgA secretoria tiene como principal función la exclusión inmune, es decir, evitar el ataque y la colonización de patógenos en la mucosa intestinal.⁶

La coccidiosis es una enfermedad causada por parásitos del genero *Eimeria*. Las especies más importantes son: *Eimeria maxima*, *E. tenella* y *E. acervulina*. La presentación de esta enfermedad es de suma importancia económica, debido a la mala eficiencia alimenticia, mayor tiempo para alcanzar el peso deseado al mercado, elevadas mortalidades, presentación de enteritis necrótica, decomisos, problemas de procesamiento y mala apariencia final del producto relacionada con la pigmentación. Todo esto es debido al daño que ocurre cuando los esporozitos penetran a las células epiteliales del tracto intestinal, para poder transformarse en esquizontes y después en merozoitos, que son fases del ciclo biológico.^{7, 8} Cada una de las especies de *Eimeria* antes mencionadas, tiene diferentes sitios de infección y las lesiones también se diferencian entre ellas. Por ejemplo: *E. acervulina*, se desarrolla primordialmente en el duodeno, provoca principalmente una pérdida de pigmentos carotenoides y xantofilas de la sangre y la piel, debida a la reducida absorción en el intestino delgado. La parte media del intestino delgado desde el asa duodenal hasta el divertículo de Meckel a menudo es parasitada por *E. maxima*, las aves afectadas por esta especie, pueden presentar diarrea, emaciación extrema, palidez y aspereza de las plumas. *E. tenella* se encuentra en los sacos ciegos, lo que origina una grave enfermedad porque hay sangrado, alta morbilidad y mortalidad, pérdidas en la ganancia de peso y emaciación. Desde el punto de vista económico, el problema de esta enfermedad no se encuentra solamente en los daños inducidos por la coccidia, sino también por el gasto en su prevención por concepto de los anticoccidianos, los cuales se tienen que incluir durante toda la fase de iniciación, crecimiento y desarrollo del pollo.^{7, 9, 10}

La salmonelosis es una enfermedad causada por un bacilo Gram negativo, productor de citotoxinas causantes de daño epitelial a nivel intestinal. Esta enfermedad causa grandes pérdidas por la alta mortalidad en aves jóvenes. Debido a su naturaleza crónica y la dificultad de su erradicación la salmonelosis es capaz de terminar con programas reproductivos en los cuales se han invertido grandes cantidades de dinero. Las aves de cualquier edad, sobrevivientes a la infección se debilitan y se incrementa su susceptibilidad a muchas enfermedades.¹¹

La microflora intestinal es un factor clave para elevar al máximo la salud y rendimiento de las aves. El pollo y su microflora intestinal constituyen un ecosistema complejo. Cuando las condiciones de producción no son adecuadas, la capacidad protectora de la microflora se puede ver reducida, por lo que requiere un apoyo adicional mediante mejor manejo, higiene y nutrición.¹² Con respecto a lo anterior, es conocido el efecto que tiene la microflora intestinal sobre una buena salud, al reducir la oportunidad de colonización de patógenos por medio de la exclusión competitiva, esto se ha comprobado a través de los años. Es el experimento de Nurmi del que mejor se conocen los resultados, en el cual fueron inoculados pollitos recién nacidos con contenido intestinal de animales adultos, lo que les ayudó a tener una mejor respuesta contra la invasión por microorganismos patógenos.⁸

Con el propósito de mejorar la digestión y utilización de los nutrientes, se han desarrollado alimentos funcionales, que son consumidos como parte de una dieta normal, los cuales benefician a una o varias funciones del organismo o generan un efecto fisiológico mayor al de una nutrición tradicional. Dentro de este tipo de alimentos se encuentran los probióticos, que son suplementos alimenticios compuestos de microorganismos viables como: *Lactobacillus* sp, *Bifidobacterium* sp, *Bacillus* sp, *Streptococcus* sp, *Pediococcus* sp, *Enterococcus* sp, *Saccharomyces* sp, *Aspergillus* sp y *Turoloopsis* sp.¹³ Estos probióticos han mostrado que ejercen un papel benéfico en contra de patógenos potenciales como *Clostridium perfringens* y *Salmonella* sp. Los lactobacilos han sido ampliamente reconocidos como estimulantes del sistema inmune, incrementan la resistencia contra enfermedades por la liberación de péptidos de bajo peso molecular, lo cual induce una activación inmune. Un probiótico comercial llamado Preempt[®] administrado por vía oral al día de edad y 48 horas previas a un desafío con *S. gallinarum*, tuvo un efecto importante en la prevención de la mortalidad, colonización intestinal e invasión de órganos, además de haber conferido una protección cuando la transmisión se realizó de manera horizontal, por el efecto de la acción competitiva.^{14, 15}

Existen también los prebióticos, suplementos alimenticios no digeribles por el hospedador, los cuales son un sustrato selectivo para una o varias bacterias específicas del tracto intestinal. El aumento de la actividad de la microflora intestinal resulta benéfico para el huésped. Los simbióticos son la combinación de un probiótico y un prebiótico, es decir, un tipo de microorganismo vivo y su

respectivo sustrato específico, esta combinación aumenta el número de microorganismos que sobreviven en el tracto intestinal.^{15, 16, 17}

El prebiótico compuesto por harina de *Aspergillus* sp. (HA) es un producto obtenido de una fermentación primaria de un *Aspergillus* no tóxico. Está compuesto de 12% de proteína y 45% de fibra. Esta fibra no es un recurso vegetativo normal ya que es fibra de micelios, la cual actúa como un agente catalítico que auxilia en la proliferación de *Lactobacillus* spp. dentro del intestino delgado de especies monogástricas. Debido a la estabilidad natural al calor de la HA, su uso es muy práctico y no requiere de equipo especial para su utilización. Algunos de los beneficios que se obtienen por el uso de la HA son la promoción del desarrollo de microflora benéfica, la probable estimulación de la respuesta inmune en contra de patógenos intestinales, mayor absorción de minerales, aumento del tamaño de las vellosidades intestinales y producción de bacteriocinas por parte de la microflora seleccionada, competencia por receptores intestinales, conservación de la integridad de la mucosa intestinal, aumento del tiempo de tránsito gastrointestinal, aumento de la digestión enzimática y aumento de la absorción intestinal. Todos estos beneficios se ven reflejados en un incremento en la uniformidad de tallas y pesos de las aves.^{5, 13, 16} Se ha probado por ejemplo que la HA previene la ocurrencia de enteritis necrótica en pollos alimentados con una dieta alta en trigo cuando son desafiados con coccidias patógenas.¹⁹ Con respecto al beneficio en la absorción de minerales que ofrece la HA, se ha demostrado que ésta ayuda al depósito de Ca y P en tibia de pollos neonatos, así como a la digestibilidad de proteína y energía.²⁰ También se ha demostrado que pollos alimentados con una dieta a base de trigo más HA, después de un desafío con coccidias tienen una mejor uniformidad y un incremento numérico en el tiempo de tránsito intestinal.¹⁶

De acuerdo con lo anterior, aunque no se ha estudiado el efecto de la HA sobre la concentración de IgA en la mucosa intestinal, es posible que la HA tenga un efecto positivo sobre la respuesta inmune humoral del intestino. La falta de estudios sobre este aspecto sugiere la realización de una investigación sobre la cuantificación de IgA en el tracto gastrointestinal de aves alimentadas con HA y desafiadas con agentes patógenos de gran importancia en la avicultura como son la *Salmonella enteritidis* y *Eimeria* spp.

Un método útil para la identificación de anticuerpos en el suero y secreciones es la prueba ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), la cual es simple, segura, sensible y rápida. El espectrofotómetro empleado para determinar las densidades ópticas de las placas ELISA, facilita el manejo de los resultados para los estudios estadísticos que se requieren.^{21, 22}

HIPÓTESIS

Si los prebióticos mejoran la fisiología intestinal de las aves, entonces al suplementar animales con HA se incrementará el grado de inmunidad humoral de las mucosas frente a un desafío con patógenos entéricos.

OBJETIVOS

- Estandarizar una técnica de ELISA para la cuantificación de IgA en intestino de pollos.
- Medir la concentración de IgA en tracto intestinal de aves suplementadas con un prebiótico y desafiadas con diferentes especies de *Eimeria* sp.
- Medir la concentración de IgA en el tracto intestinal de aves alimentadas con un prebiótico y desafiadas con *Salmonella enteritidis*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MATERIAL Y MÉTODOS

SE EFECTUARON DOS EXPERIMENTOS:

Experimento 1.

Animales de experimentación: Se utilizaron veinte pollos de engorda mixtos Ross x Ross de un día de edad, fueron mantenidos en una unidad de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M. Se les abrevó y alimentó *ad libitum* con una dieta de iniciación isocalórica e isoprotéica con base a sorgo y soya formulada de acuerdo con los requerimientos sugeridos por el NRC (1994).

Diseño experimental: Los pollitos se agruparon en cuatro grupos, cada uno con cinco pollos (1) Testigo negativo, no se desafió, ni se le administró harina de *Aspergillus* sp (HA) en la dieta; (2) Testigo positivo, recibió el desafío al día 21 de edad con *Eimeria acervulina* (6×10^4), *E. máxima* (5×10^3) y *E. tenella* (4×10^4) oocistos esporulados en un mililitro por ave; no se le agregó HA a su dieta; (3) Grupo experimental con HA al 0.2% en su dieta; (4) Grupo experimental con HA y desafío, el desafío fue idéntico al del grupo positivo y la adición de HA se efectuó a una concentración de 0.2% del total de la dieta. Las aves fueron sacrificadas de acuerdo con lo indicado en el reporte del panel sobre eutanasia organizado por la asociación americana de medicina veterinaria (Electrocución página, 244; Dislocación cervical: páginas 240-241 AVMA por sus siglas en inglés) al día veintiocho de edad.

Procedimiento: Las muestras se obtuvieron del duodeno (porción ascendente del asa duodenal), yeyuno (dos centímetros posteriores al divertículo de Meckel), ileon (dos centímetros anteriores a las tonsilas cecales) y a partir de los sacos ciegos (porción central), se tomaron 5 centímetros a lo largo del tejido y se colocaron en un tubo de ensaye con 5 ml solución amortiguadora (0.16 g KH_2PO_4 , 0.54 g Na_2HPO_4 , 8.5 g NaCl, 1 L agua destilada); las porciones de intestino fueron lavadas tres veces, utilizando el mismo PBS que las contenía, posteriormente fueron extruidas tres veces para facilitar la obtención de mucosa intestinal, el contenido se centrifugó por treinta minutos ($1000 \times g$), se obtuvo el sobrenadante, el cual se diluyó 1:10 y se conservó en refrigeración hasta el momento de su evaluación.^{1, 5, 23, 24}

Detección de IgA: Se emplearon placas ELISA de fondo plano^a, las cuales fueron sensibilizadas con la adición de anticuerpos contra IgA (anticuerpos de cabra anti IgA de pollo purificados por afinidad^b. Este reactivo fue diluido 1/100 con un amortiguador carbonatado con pH 9.6 (1.59 g Na₂CO₃, 2.93 g NaHCO₃, 1 L de agua destilada), se colocaron 100 µl en cada micropozo y se incubaron a 4° C por doce horas. Posterior a un lavado con solución salina con imidazol 0.002M con 0.02% tween 20, se añadieron 200 µl de Albúmina Sérica Bovina (BSA por sus siglas en inglés) al 1%, para la dilución se utilizó solución amortiguadora con pH 7.4 (8.0 g NaCl, 0.2 g KH₂PO₄, 2.16 g Na₂HPO₄ · 7H₂O, 0.2 g KCl, 0.5 ml tween 20 en 1L de agua destilada) y se dejó incubar por 30 minutos a temperatura ambiente. Después de realizar nuevamente un lavado, se colocaron las muestras y los estándares obtenidos de un suero de referencia en las placas sensibilizadas y bloqueadas previamente con BSA. Se empleó un suero de referencia^c con una concentración conocida de IgA (2000 ng / ml), el cual se diluyó a partir de 1:2 hasta 1:128 (diluciones doble seriadas) con BSA al 1%; a partir de cada dilución del suero de referencia se colocaron 100 µl en cada micropozo de la placa, así como de las muestras, posteriormente se incubaron por 60 minutos a temperatura ambiente, se dejaron dos micropozos como estándares negativos (blancos). Se realizó un lavado y se añadieron en los micropozos 100 µl de conjugado^d (anticuerpos de cabra anti IgA de pollo conjugados con enzima peroxidasa), previamente diluido con el mismo diluyente utilizado para las muestras y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. Posterior al lavado se agregaron 100 µl por micropozo de sustrato ABTS^e [(2, 2'-azino-dl-[3-etil-benzotiazolina sulfonato (6))], bajo condiciones similares se dejaron incubar 30 minutos. Se colocaron 100 µl de la solución inhibidora (duodecil sulfato de sodio; SDS, por sus siglas en inglés 1%) por micropozo. La lectura de las placas se llevó a cabo en un lector de placas ELISA Dynatech MR 650 con filtro de 405 nm.^{1, 5}

^a NUNC, catálogo 269787

^b Bethyl Laboratories Inc., Montgomery TX, USA, Catálogo E30-103

^c Bethyl Laboratories Inc., Montgomery TX, USA, Catálogo RS10-102

^d Bethyl Laboratories Inc., Montgomery TX, USA, Catálogo E30-103

^e Syntibotics Corporation, San Diego CA, USA, Catálogo 02-3850-0800

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuantificación de la concentración de IgA: Para llevar a cabo el cálculo de la concentración de IgA en ng/ml, se construyó una curva de calibración con los estándares diluidos, que tomó en cuenta las densidades ópticas (DO) y sus concentraciones correspondientes. Con la DO de las muestras, se calculó la concentración de IgA contenida en cada porción intestinal expresada en ng/ml, con un análisis de regresión² con base en la curva de calibración.

Análisis estadístico: Las concentraciones de IgA se transformaron a través de logaritmo base 10 y se efectuaron comparaciones entre grupos por medio de un análisis de varianza, para determinar diferencias entre las medias grupales, se utilizó la prueba múltiple de comparación de medias de Tukey con un grado de significancia estadística para alfa menor que 0.05.

Experimento 2.

Animales de experimentación: Se utilizaron veinte pollitos de engorda mixtos Ross x Ross de un día de edad, mantenidos y alimentados de la misma manera que en el experimento 1.

Diseño experimental: Los pollitos fueron separados en cuatro grupos, cada uno tuvo cinco pollitos: (1) testigo negativo, al cual no se le realizó desafío ni se le administró HA en la dieta; (2) testigo positivo, se le aplicó un desafío con *Salmonella enteritidis* (SE) 1×10^8 unidades formadoras de colonia (UFC)/0.25 ml al día 17 de edad; no se les adicionó HA en la dieta; (3) grupo experimental, no se desafió, se le agregó 0.2% de HA a su dieta; (4) grupo experimental, se desafió (SE) de manera idéntica al grupo positivo, además se le adicionó 0.2% de HA a su dieta. Las aves se sacrificaron a los dieciocho días de edad.

Detección de IgA: Se tomaron 5 cm de longitud de duodeno e ileon, se procedió de la misma manera que en el experimento 1.

Cuantificación de la concentración de IgA y análisis estadístico: Se llevó a cabo de la manera descrita en el experimento 1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

Se construyó una curva de calibración con los estándares del suero conocido para cuantificar las concentraciones de IgA de cada muestra de los dos experimentos, a través del análisis de regresión. Las densidades ópticas de estos estándares fluctuaron entre 0.169 y 1.9, como se muestra en la tabla uno. La figura 1 muestra la curva de calibración, en el eje de las X se muestra la densidad óptica obtenida en el lector ELISA y en el eje de las Y se presenta la concentración de IgA en ng por mililitro.

Experimento 1

Las concentraciones de IgA obtenidas en cada porción del intestino a partir de los cuatro grupos del experimento 1, expresadas como el promedio de 5 muestras, se presentan en la tabla 2. En el duodeno la menor concentración de IgA, 613 ng/ml, se presentó en el grupo 3 (experimental con HA) la cual fue diferente ($P < 0.05$) con respecto al grupo 2 (1,012 ng/ml) el resto de los grupos no presentaron diferencia estadística entre ellos o con los grupos 2 y 3. En el yeyuno la concentración de IgA del grupo 3 (experimental con HA) fue de 633 ng/ml, diferente ($P < 0.05$) con relación al grupo 2 (1,110 ng/ml), los grupos 1 y 4 no presentaron diferencia estadística entre ellos y no fueron diferentes de los grupos 2 y 3. Las concentraciones de IgA en el ileon del grupo 3 (experimental con HA) fue de 667 ng/ml, en el grupo 4 (experimental con HA y desafío) de 749 ng/ml, en el grupo 1 (testigo negativo) de 1,054 ng/ml y de 1,158 ng/ml en el grupo 2 (testigo positivo), no hubo diferencia estadística entre los grupos 1, 2 y 4, pero sí entre los grupos 2 y 3 ($P < 0.05$). En el ciego las concentraciones de IgA fueron de 733 ng/ml para el grupo 3 (experimental con HA), de 817 ng/ml para el grupo 1 (testigo negativo), de 853 ng/ml para el grupo 4 (experimental con HA y desafío) y de 1,142 ng/ml para el grupo 2 (testigo positivo), no hubo diferencia estadística entre los grupos 1, 3 y 4, pero sí entre los grupos 2 y 3 ($P < 0.05$).

Experimento 2

La tabla 3 muestra la concentración de IgA en duodeno e ileon por grupo. El grupo 1 no recibió HA, ni desafío, el grupo 2 sólo se desafió con *Salmonella enteritidis*, el grupo 3, recibió HA al 2% en su dieta y el grupo 4, recibió tanto el desafío como la HA. En el duodeno las concentraciones de IgA

fueron de 91 ng/ml en el grupo 1, 205 ng/ml en el grupo 3, 699 ng/ml en el grupo 2 y 805 ng/ml en el grupo 4. El grupo 4 presentó mayor concentración de IgA ($P < 0.05$) comparado con el grupo 1, pero no fue estadísticamente diferente de los grupos 2 y 3. Los grupos 2 y 3 no mostraron diferencia estadística entre ellos, pero si se observó diferencia ($P < 0.05$) entre el grupo 2 y el grupo 1. En el ileon las concentraciones de IgA fueron de 151 ng/ml en el grupo 3, 212 ng/ml en el grupo 2, 325 ng/ml en el grupo 1 y 587 ng/ml en el grupo 4. No hubo diferencia estadística entre grupos.

DISCUSIÓN

El ensayo ELISA usado en este experimento demostró ser útil para cuantificar la concentración de IgA en el contenido intestinal de una manera simple. Esta técnica es similar a la descrita por Piquer y colaboradores (1991), en la cual se usaron 10 cm de yeyuno con 10 ml de PBS y diluciones de 1:1000 – 2000 para bilis, 1:2 para yeyuno y 1:4 para suero. A diferencia de su estudio, en este trabajo se usaron sólo 5 cm de cada región intestinal, colocadas en 5 ml de PBS y con una dilución 1:10

La construcción de la curva de calibración permitió tener mediciones en nanogramos por mililitro, lo más cercanas a la distribución discreta del dato real respectivo, uniformando los probables errores aleatorios atribuidos a la ejecución de la técnica en la medición respectiva de todas y cada una de las muestras. Es imprescindible contar con valores de referencia como los representados en el presente estudio por el suero de pollo de referencia que contenía una cantidad estandarizada de IgA y sin la cual no se hubiera podido efectuar la calibración correlativa de la curva respecto a las densidades ópticas registradas.

La necesidad de crear sistemas que protejan a las aves de enfermedades de gran importancia económica como la coccidiosis y la salmonelosis, ha promovido la realización de experimentos como el que aquí se presenta. Gibson y Roberfroid (1995) describieron por primera vez a un prebiótico como un "ingrediente alimenticio no digestible que afecta benéficamente al hospedador mediante la estimulación selectiva del crecimiento o la actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon, para mejorar la salud del hospedador".

Comúnmente, la quimioterapia se ha utilizado extensivamente para el control de la coccidiosis, sin embargo, el aumento de resistencia por parte de algunas cepas de campo ha conducido al desarrollo de métodos alternativos de control (Juárez y Téllez, 2000). Las estrategias que incluyen aspectos moleculares e inmunológicos como las vacunas y aditivos no antibióticos parecen ser la alternativa futura en el control de esta enfermedad (Nava, 2002).

Algunos autores han reportado que la interrelación entre la infección por *Eimeria tenella* y *Salmonella enteritidis* presenta de cierta forma una exacerbación en el grado de invasión por *S. enteritidis* en el saco ciego, sin que disminuya el grado de invasividad a órganos internos por efectos de la coccidiosis en sí. Estos autores utilizaron la bacteria *Lactobacilos acidophilus* como un

probiótico y no observaron disminución en la población de *S. enteritidis* en sacos ciegos, mientras que la utilización de la harina de *Aspergillus* si ha mostrado cierto grado de disminución de la cantidad de *S. enteritidis* en este órgano (Nava, 2001). A diferencia de esta observación, en el presente estudio se encontró la menor concentración de IgA en el grupo que contenía el prebiótico, misma que se esperaría que fuera protectora a este nivel, y aunque no difirió del grupo que contenía en la dieta harina de *Aspergillus* y que recibió además el inóculo de *E. tenella*, tampoco fue diferente del grupo testigo negativo que no fue suplementado con prebiótico ni recibió el desafío con coccidias, sin embargo si mostró ser diferente al grupo que únicamente recibió el desafío con los tres tipos de coccidia, incluida *E. tenella*.

La mayor concentración de IgA (1,142 ng/ml) en el grupo desafiado únicamente con coccidias probablemente se deba a que la lectura se efectuó exactamente siete días post-inoculación, momento post-desafío en el que *E. tenella* causa el mayor daño al epitelio cecal. La IgA detectada seguramente es de tipo inespecífica y debida a los efectos vasculares del proceso inflamatorio y hemorrágico que permitieron que existiera en este trasudado la gran cantidad de IgA observada en este grupo. Es interesante que, aunque en el grupo que recibió el desafío y la harina de *Aspergillus* en la dieta el resultado no fue diferente al grupo testigo positivo, si presentó una aparente menor cantidad de IgA, además tampoco difirió del grupo que únicamente recibió harina de *Aspergillus*, lo cual sugiere que la harina de *Aspergillus* provoca cierto grado de protección contra los efectos detrimentales inducidos por la infección con *E. tenella*, o bien que la microflora promovida por este prebiótico en particular no tiene efectos detrimentales tan severos como los observados en el grupo dos, que sólo recibió el desafío y ningún aditivo de tipo prebiótico. Estas suposiciones las respaldan las observaciones de autores como Kimura *et al* quien encontró que las poblaciones de bacterias lácticas (lactobacilos y bifidobacterias) disminuyen progresivamente a partir del día cinco post-infección con *E. tenella*, mientras que al mismo tiempo se incrementa la cantidad de bacterias nocivas (Clostridia y Enterobacterias) las cuales para el día siete post-infección llegan a su nivel más alto de proliferación, en tanto que las primeras disminuyen significativamente, los mismos autores observaron que los niveles de recuperación de las bacterias lácticas se obtiene hasta el día diez post-inoculación, presentándose incluso disturbios en la microflora intestinal debidos a la infección con *E. tenella* hasta

el día 17 post-inoculación. Ellos determinaron con base en estas observaciones, y coinciden con otros autores, en que existe un probable antagonismo entre lactobacilos y enterobacterias, se explican de esta forma porque en el presente estudio el grupo que recibió harina de *Aspergillus* además del desafío con *E. tenella*, presentó pocos efectos detrimentales sobre la mucosa, factor que impidió que hubiera una mayor cantidad de IgA en el ciego. En el caso del grupo testigo positivo, la respuesta de IgA como un proceso inflamatorio general y no en una respuesta de tipo inmune-específica.

Algunos autores como Bradley y Radhakrishnan (1973); Clark *et al* (1961,1962); Visco *et al* (1972) han observado que aves convencionales sin protección inmune primaria, ante un desafío moderado con oocistos de *E. tenella* altamente patógena presentan una mortalidad moderada, mientras que en aves gnotobióticas, sin bacterias en el tracto digestivo, no llega a perecer ni una sola ave a pesar de lo aparatoso que se observan las hemorragias ocasionadas con un desafío semejante con oocistes de *E. tenella* altamente patógena. En el presente estudio, la medición de IgA en los grupos con harina de *Aspergillus*, sin harina y en los grupos desafiados confirma que existe interacción entre la microflora del saco ciego de las aves domésticas y los efectos detrimentales debidos a un desafío moderado con 40,000 oocistos de *E. tenella* por ave. De acuerdo con Kimura en el resto de los sitios anatómicos evaluados en el presente estudio se observó una tendencia similar a la observada en la mucosa cecal. En el duodeno, sitio de replicación de *E. acervulina*, el grupo testigo positivo que recibió el desafío presentó la mayor cantidad de IgA, en tanto que el grupo suplementado con harina de *Aspergillus* mostró la menor concentración de IgA, mientras que el grupo suplementado con harina de *Aspergillus* y además desafiado no difirió estadísticamente con relación al grupo testigo positivo, pero si mostró una menor concentración de IgA que aquel, por lo cual se presume que el efecto protector de la harina de *Aspergillus* se haya manifestado de esta forma en este caso, en tanto que en el testigo positivo la concentración de IgA se debió al proceso inflamatorio. La porción del yeyuno donde se replicó principalmente *E. maxima* mostró una tendencia similar, al igual que el ileon, sitio donde no se replicó aparentemente ninguna de las coccidias inoculadas, manifestando únicamente una mayor cantidad de IgA para el grupo testigo negativo que fue similar a la del grupo desafiado. Los resultados de este segmento probablemente se deban a que la IgA proveniente del duodeno o del yeyuno se encontraba en el lumen del ileon al momento de colectar las muestras del presente

estudio, también es posible que la IgA del grupo testigo negativo, de concentración de IgA similar al grupo testigo positivo, pueda tratarse de IgA de tipo secretoria. Sin embargo, en el presente estudio no se determinó si se trataba del tipo de dímero con porción secretoria o bien de monómeros liberados por las células plasmáticas presentes en la lámina propia y que pudieron estar contenidas en el trasudado debido al proceso inflamatorio ocasionado por *E. acervulina* y *E. maxima* en sus respectivos sitios de replicación. Otra posible explicación para esta semejanza en el tipo de secreción del ileon es que existiera una infección activa en esta porción del tracto intestinal por parte de *E. tenella*, ya que se ha reportado que *E. tenella* puede replicarse en sitios circunvecinos a la porción anatómica de los sacos ciegos, sitio considerado como específico para la replicación de *E. tenella*.

Yun *et al* (2000) mencionan que es imprescindible mayor cantidad de investigación al respecto ya que comprender la interrelación que existe entre el huésped y la coccidia en el intestino es crucial para el diseño de nuevos esquemas o formas de protección contra este patógeno.

Aunque el incremento en el uso de probióticos y prebióticos como factores de protección contra agentes patógenos es mayor cada día, actualmente se ha efectuado poca investigación acerca de la interacción de estos productos con algunos agentes patógenos como la coccidia o *Salmonella enteritidis* en las aves domésticas y el grado de inmunidad que puede generarse en su presencia, lo cual puede constituir materia para próximos estudios.

El intestino es el órgano inmunológico más grande del cuerpo. Este contiene aproximadamente del 70 al 80% de las células productoras de inmunoglobulinas y produce más IgA secretoria (IgAs) (50-100 mg/kg/día) que el total de IgG (IgY de las aves) producidas por el ave (aproximadamente 30 mg/kg/día).

De acuerdo con Giraud *et al*, en aves infectadas la producción de anticuerpos específicos del tipo IgA e IgM, es significativamente más alta en áreas infectadas que en áreas donde los parásitos no se replicaron; en el presente estudio la cantidad observada de IgA en ileon presentó un perfil similar a los sitios donde sí se replicaron las coccidias empleadas en el desafío (*Eimeria acervulina*: duodeno; *E. maxima*: yeyuno; *E. tenella*: sacos ciegos); el ileon aparentemente no es usado como sustrato de replicación por ninguna de las especies inoculadas. Hay que considerar que Giraud *et al* empleó sitios específicos para cultivar *in vitro* y posteriormente obtener el sobrenadante y constatar la cantidad y

especificidad de inmunoglobulinas por medio de ELISA, mientras que en el presente estudio se trabajó a partir de sitios específicos pero sin cultivar, las inmunoglobulinas se obtuvieron únicamente por procesos de lavados y extrusión manual. Es importante considerar el desarrollo de un modelo que involucre estas dos metodologías para obtener la cantidad total de IgA específica e inespecífica, o bien utilizar dos tipos de ELISA, una que identifique a la IgA genérica como el empleado en el presente estudio, y una metodología de ELISA que emplee la identificación del idiotipo específico de la especie de coccidia que se requiera identificar. Además se debe considerar ampliar el periodo de medición, ya que en el presente estudio únicamente se consideró la medición a los siete días post-inoculación, mientras que estudios como el de Giraud contemplan tres mediciones, a los siete, catorce y veintiún días.

La literatura científica ha dado suma importancia a la protección inmune de tipo humoral contra enfermedades de origen bacteriano incluso más que de tipo parasitario debido a protozoarios del género *Eimeria*.

La salmonelosis es una enfermedad de origen microbiano que afecta significativamente la economía de las empresas avícolas y es un riesgo potencial para la salud humana, razón suficiente para evaluar los suplementos alimenticios que puedan tener algún efecto intestinal contra el desafío por *Salmonella enteritidis*. Por diversos medios se ha tratado de encontrar una herramienta que refuerce la respuesta inmune a nivel intestinal, en esta ocasión se aprovecharon las cualidades que ha reportado el uso de aditivos de tipo no-antibacteriano y se evaluó el efecto de un prebiótico (harina de *Aspergillus* sp).

En el análisis de resultados, se puede observar que existe una diferencia estadística en la concentración de IgA en el duodeno a las veinticuatro horas post-desafío entre los grupos 4 y 1, este último sirvió como testigo negativo y con menor concentración de IgA. Estos resultados coinciden con los de Liu (2001), quien demostró un aumento en la producción de IgA en el tracto gastrointestinal cuando vacunó a pollos con microesferas de bacterias muertas de *S. enteritidis* por vía oral, para ver la respuesta inmune por parte del huésped. Sin embargo Liu detectó este incremento en la concentración de IgA después de dos y tres semanas post-vacunación. Los resultados obtenidos en el presente trabajo pueden estar influidos por la presencia de HA, ya que el grupo que presentó la

mayor concentración de IgA fue aquel que fue desafiado, pero también se le administró harina de *Aspergillus* a su dieta. La mayor concentración de IgA encontrada en el duodeno, comparada con la IgA detectada en el ileo, probablemente está influida por la IgA proveniente de la vesícula biliar, ya que este órgano ha demostrado ser una fuente importante de esta inmunoglobulina durante los primeros días de vida, de acuerdo con los trabajos de Piquer y colaboradores (1991) realizados en pavipollos.

Los antecedentes que se tienen acerca de la identificación de IgA en tracto gastrointestinal por medio del método ELISA, sugieren la posibilidad de un estímulo directo del agente patógeno sobre el tejido linfoide que actúa sobre la producción de anticuerpos, principalmente IgM e IgA. Alderton (1991) evaluó la respuesta humoral y la protección contra la salmonelosis en gallinas inoculadas con una cepa mutante de *S. typhimurium* dependiente de una vitamina, y detectó una respuesta en la producción de IgA tanto en suero como en intestino a los días 21 y 28 de edad; estos resultados no difieren de los de Hassan (1991), quien estudió la respuesta inmunológica en la infección y reinfección de pollos con *S. typhimurium* y observó una producción alta de IgA en suero, en intestino y en bilis, infectados el día cuatro de edad y re infectados diez semanas después. Las muestras tomadas antes de cuatro semanas post-infección no reflejaron cambios en la concentración de IgA, sin embargo aquellas a partir de la cuarta semana post-infección demostraron un aumento representativo en la producción de IgA e IgG en el suero, tanto en el intestino como en la bilis, la IgA fue el isotipo más importante encontrando en intestino y su pico de producción se dio en la semana 5 post-infección. Así como en la infección primaria la IgA fue el anticuerpo con mayores concentraciones en el intestino, la bilis lo fue en la reinfección en donde tuvo concentraciones mayores a las ya observadas post-infección. La rápida respuesta en la producción de IgA en el duodeno de los pollos que consumieron harina de *Aspergillus sp* en el alimento, puede deberse al incremento en el peso del intestino de los pollos que han recibido este prebiótico en la dieta, de acuerdo con el trabajo de Nava y colaboradores (2002) quienes demostraron este efecto del prebiótico. Este mayor peso intestinal se debe al aumento de tamaño de las vellosidades intestinales y en general de todas las estructuras del intestino. Es en la lámina propia intestinal donde se encuentra el "Tejido Linfoide Asociado al Intestino" (GALT por sus siglas en inglés), por lo tanto se

presume que hay un mayor número de células plasmáticas en la submucosa, específicamente en las placas de Peyer, que son capaces de secretar IgA en respuesta al estímulo de agentes potencialmente patógenos, incluida *S. enteritidis* sobre este tejido linfoides.

Los resultados de Hassan indican que la diferencia encontrada en el grupo 4 con respecto al grupo 1 se pudo deber a la inclusión de la harina de *Aspergillus*, la cual pudo favorecer la producción de IgA.

Los resultados obtenidos de ileon no fueron estadísticamente diferentes entre ellos. La razón de estos resultados puede ser anatómica, de acuerdo a la disposición de las dos regiones intestinales, y el tiempo de la toma de muestras. A las 24 horas post desafío, *S. enteritidis* tiene tiempo suficiente para llegar a regiones posteriores del intestino, pero no puede contrarrestar todos los mecanismos de defensa del hospedador, como el pH del tracto intestinal, las secreciones de mucina por parte de las células calciformes en la mucosa intestinal, la propia descamación de las células epiteliales, la inhibición de la adhesión por la peristalsis intestinal, la capa de células epiteliales por sí, y la competición entre *Salmonella* y la microflora intestinal, como lo describe Nava (2002) al demostrar que la harina de *Aspergillus* sp. favorece la exclusión de *Salmonella enteritidis* en el intestino.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

LITERATURA CITADA

- 1) Piquer FJ, Sell JL, Al-Batshan HA, Mallarino EG. Posthatching changes in the immunoglobulin A concentration in the jejunum and bile of turkeys. *Poult Sci* 1991; 70:2476-83
- 2) Muir WI, Bryden WL, Husband AJ. Immunity, vaccination and the avian intestinal tract. *Developmental and comparative immunology* 2000; 24:325-342
- 3) Tellez G, Dean CE, 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. *Poult Sci* 1993; 72: 636-642.
- 4) Levinson W, Jawets E. *Medical Microbiology and Immunology*. 6th ed., Mc Graw Hill. U.S.A. 2000
- 5) Grajeda D, Merino R. Método ELISA para la detección de IgA en intestino de pollos. VIII Jornadas Avícolas. México. 2002
- 6) Woolcock JB. *Infección Bacteriana e Inmunidad de los Animales Domésticos*. Acribia. España. 1984
- 7) Moreno R. *Coccidiosis Aviar*. ANECA Temas Selectos de Producción Avícola e Industria de Alimentos Balanceados. México. 1998
- 8) Vega C. *Terapéutica Anticoccidiana*. VIII Jornadas Médico Avícolas. México. 2002
- 9) Gordon RF. *Enfermedades de las Aves*. Manual Moderno. México. 1985
- 10) Calnek BW. *Enfermedades de las Aves*. Manual Moderno. México. 1995
- 11) Téllez G, Ortega D. El Impacto de *Salmonella enteritidis* en la avicultura comercial. XIII Curso Avimex. México 2001
- 12) Spring P. La microflora intestinal. Un factor clave para la salud del intestino y del animal. XIII Curso Avimex. México 2001
- 13) Nava G, Juárez M, Merino R, Ledesma N, Téllez G. Prebióticos, probióticos y simbióticos en la ecología intestinal de las aves domésticas. VIII Jornadas Médico Avícolas. México. 2002
- 14) García D. Evaluación de un probiótico para la prevención de la infectividad y mortalidad por *Salmonella gallinarum* en pollos de engorda de un día de edad. FMVZ, UNAM. México 1995

- 15) Calderón ML. Evaluación de un probiótico comercial y de linfocinas obtenidas de aves inmunizadas con *Salmonella enteritidis* en la inmunopprofilaxis contra la infección de *Salmonella gallinarum* en pollos de engorda. FMVZ, UNAM. México 1996
- 16) Macfarlene GT, Cummings JH. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefic health? *British Med J* 1999; 318: 999-1003
- 17) Roberroid MB. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 1682-1687
- 18) Juarez MA, Ortega D, Carlin C. Effect of *Aspergillus* sp. meal on a high-wheat-based diet and coccidia challenge on body weight, gastrointestinal transit time, and total intestinal weight in broiler chickens. *International Poultry Scientific Forum*. Atlanta, Georgia 2002
- 19) Grace B, Nava G. The addition of *Aspergillus* sp. meal does not induce the occurrence of necrotic enteritis in broiler chicks fed a high-wheat-based diet and coccidia challenge. *International Poultry Scientific Forum*. Atlanta, Georgia 2002
- 20) Nava G, Juarez MA, Ledesma N, Merino R. *Aspergillus* sp. Meal improves development of intestinal digestion, absorption and body weight uniformity, in neonatal broiler chickens. *International Poultry Scientific Forum*. Atlanta, Georgia 2002
- 21) Merino R. Interpretación de resultados serológicos. ANECA Temas Selectos de Producción Avícola e Industria de Alimentos Balanceados. México. 1998
- 22) Thayer SG, Charles WB. Serological procedures. A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. Fourth edition. American Association of Avian Pathologists. USA 1998
- 23) Withanage G, Sasai K, Fukata T, Miyamoto T, Baba E. Secretion of *Salmonella*- specific antibodies in the oviducts of hens experimentally infected with *Salmonella enteritidis*. *Vet Immunol Immunopathol* 67 1999 185-193
- 24) Zigterman G, Van de Ven W, Van Geffen C, Loeffen A, Panhuijzen J, Rijke EO, Vermeulen AN. Detection of mucosal immune responses in chickens after immunization or infection. *Vet Immunol Immunopathol* 1993; Apr 36:3 281-91

- 25) Gibson GR and Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* (1995) 125: 1401-1412.
- 26) Juárez EMA, Téllez IG. La Inmunidad celular en la inmunoprofilaxis de la coccidiosis aviar. Memorias del curso "INMUNOPARASITOLOGIA Y BIOLOGIA MOLECULAR": 2000 noviembre 13 y 14; Ciudad Universitaria (DF). México (DF). Departamento de Parasitología, La División de Educación Continua, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM, 2000:18-28.
- 27) Nava G. Alimentos funcionales: modificación de la ecología gastrointestinal del pollo de engorda neonato con la inclusión de un prebiótico en la dieta. UNAM, México D.F. 2002
- 28) Bradley RE, Radhakrishnan CV. Coccidiosis in chickens: obligate relationship between *Eimeria tenella* and certain species of ceca micro flora in the pathogenesis of the disease. *Avian Dis* 1973; 17: 461-476.
- 29) Clark DT, Smith CK. *Eimeria tenella* Infection in gnotobiotic chickens. *J Protozool* 1961; 8: 10-11.
- 30) Clark DT, Smith CK, Dardas RB. Pathological and immunological changes in gnotobiotic chickens due to *Eimeria tenella*. *Poultry Sci* 1962; 41: 1635-1636.
- 31) Visco RJ, Burns WC. *Eimeria tenella* in bacteria-free and conventionalized chicks. *J Parasitol* 1972; 58: 323-331.
- 32) Visco RJ, Burns WC. *Eimeria tenella* in bacteria-free chicks of relatively susceptible strains. *J Parasitol* 1972; 58: 586-588.
- 33) Yun C, Lillehoj H, Lillehoj E. Intestinal immune responses to coccidiosis. *Developmental and Comparative Immunology* 2000; 24: 303-324
- 34) Girard F, Fort G, Yvoré P, Quéré P. Kinetics of specific immunoglobulin A, M and G production in the duodenal and caecal mucosa of chickens infected with *Eimeria tenella*. *International Journal of Parasitology*. 1997; 27:7 803-809.
- 35) Alderton M, Fahey K, Coloe P. Humoral responses and salmonellosis protection in chickens given a vitamin-dependent *Salmonella typhimurium* mutant. *Avian Diseases* 1991; 35: 435-442
- 36) Hassan J, Mockett P, Catty D, Barrow P. Infection and reinfection of chickens with *Salmonella typhimurium*: bacteriology and immune responses. *Avian Diseases* 1991; 35: 809-819

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Concentración de IgA (ng/ml) en el suero de referencia diluido y su densidad óptica correspondiente.

Concentración IgA (ng / ml)	Densidad óptica
31.25	0.169
62.5	0.219
125	0.326
250	0.467
500	0.719
1000	0.997
2000	1.9

Tabla 2. Concentración de IgA (ng/ml) en diferentes segmentos del intestino de pollos a los 28 días de edad, siete días después del desafío con tres especies patógenas de coccidia (6×10^4 de *E. acervulina*, 5×10^3 de *Eimeria maxima* y 4×10^4 de *Eimeria tenella* ave).

Grupos**	Duodeno*	Yeyuno*	Ileon*	Ciego*
1	979 ^{ab}	927 ^{ab}	1,054 ^{ab}	817 ^{ab}
2	1,012 ^a	1,110 ^a	1,158 ^a	1,142 ^a
3	613 ^b	633 ^b	667 ^b	733 ^b
4	878 ^{ab}	789 ^{ab}	749 ^{ab}	853 ^{ab}

*Diferentes literales en la misma columna muestran diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) $n=5$

** (Grupo 1) Testigo negativo, sin desafío y sin HA en la dieta; (Grupo 2) Testigo positivo, con desafío y sin HA en la dieta; (Grupo 3) 0.2% de HA en la dieta sin desafío; (Grupo 4) 0.2% de HA en la dieta con desafío.

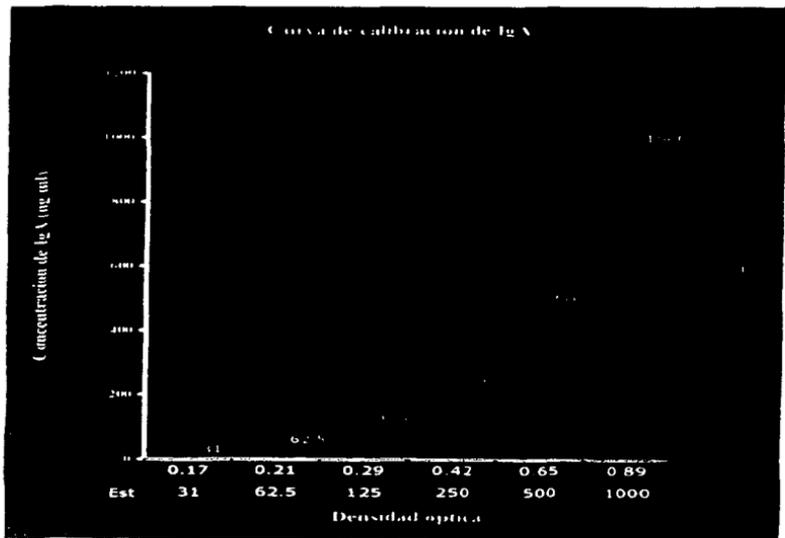
Tabla 3. Concentración de IgA (ng/ml) en duodeno e ileon de pollos desafiados al día 17 de edad con 1×10^8 ufc/0.25 ml/ave de *Salmonella enteritidis*.

Grupos	Duodeno	Ileon
1	91 ^a	325 ^a
2	699 ^{ab}	212 ^a
3	205 ^{abc}	151 ^a
4	805 ^a	587 ^a

*Diferentes literales en la misma columna muestran diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) $n=5$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 1. Concentraciones de IgA con respecto a la curva de calibración estándar.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN