

01621
2



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EFFECTO DE UN PRODUCTO DE EXCLUSION
COMPETITIVA SOBRE LA MORFOLOGIA
INTESTINAL Y GRADO DE EXCLUSION DE
Salmonella enteritidis EN POLLOS DE ENGORDA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

MARIA DOLORES / AGUILAR CRUZ

**ASESORES: MVZ MC MARCO ANTONIO JUAREZ ESTRADA
MVZ MC NESTOR LEDESMA MARTINEZ**



MEXICO, D. F.

2003

α



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.

PAGINACIÓN DISCONTINUA



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EFFECTO DE UN PRODUCTO DE EXCLUSIÓN COMPETITIVA
SOBRE LA MORFOLOGÍA INTESTINAL Y GRADO DE EXCLUSIÓN
DE *Salmonella enteritidis* EN POLLOS DE ENGORDA.**

T E S I S

**que para obtener el título de
Médica Veterinaria Zootecnista**

Presenta:

María Dolores Aguilar Cruz

Asesores:

MVZ MC Marco Antonio Juárez Estrada

MVZ MC Nestor Ledesma Martínez

DEDICATORIA

A mi familia: María, Abel, Lilis, Yanis, Simoncito y Dianis por apoyarme e impulsar todos mis sueños.

A Julio Octavio Malvido Valverde y Mario Javier Sánchez Ésquivel por darme una oportunidad y creer en mí.

A todos mis amigos que siempre estuvieron conmigo en las buenas y en las malas.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por darme la vida.

A mis queridos asesores MVZ MC Marco Antonio Juárez Estrada y MVZ MC Nestor Ledesma Martínez por enseñarme y apoyarme en todos los aspectos relacionados con el presente estudio y por la paciencia que me tuvieron.

**Al D.P.A.: Aves por las facilidades que me brindaron para realizar el presente estudio dentro de sus instalaciones.
A todo el personal académico, administrativo y técnico del D.P.A.: Aves por su ayuda y su amistad.**

Al laboratorio Boehringer Ingelheim Vetmedica por las facilidades que nos otorgaron para el presente estudio.

Al MVZ José Jesús Cabriales Jiménez que sin su ayuda no se habría logrado realizar el presente estudio.

Al Dr. Marquito que siempre estuvo a mi lado para enseñarme y corregir todo los errores y por darme la oportunidad de trabajar con él.

A Lorenzo A. R. Que siempre me apoyo en los momentos de desesperación y me dio mucha serenidad para realizar todos mis sueños.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MATERIAL Y METODOS.....	9
RESULTADOS.....	13
DISCUSIÓN.....	15
CONCLUSIONES.....	22
LITERATURA CITADA.....	23
TABLAS	30

RESUMEN

AGUILAR CRUZ MARÍA DOLORES. Efecto de un producto de exclusión competitiva sobre la morfología intestinal y grado de exclusión de *Salmonella enteritidis* en pollos de engorda. (Bajo la asesoría de Marco Antonio Juárez Estrada y Nestor Ledesma Martínez).

Se efectuó un experimento con pollos de engorda de un día de edad criados en baterías eléctricas, con la finalidad de evaluar la adición de un producto de exclusión competitiva de tipo definido (PECD) sobre la morfología intestinal y grado de exclusión ante un desafío con un inóculo de 1×10^8 UFC de *Salmonella enteritidis* (SE)/ave. Cuatro grupos de 40 pollos fueron desafiados con SE a los 12 días y otros cuatro grupos a los 19 días de edad. El grupo uno fue el testigo negativo, el dos recibió el PECD al día de edad. El grupo tres recibió el PECD al día de edad y se desafío a los 12 y 19 días de edad. El grupo cuatro fue el testigo positivo al desafío. Al día 13 y 20 de edad se efectuó en la recuperación de SE a partir de hígado-bazo y tonsilas cecales, se obtuvieron además 10 aves de cada grupo, a partir de cada ave se procesaron histológicamente muestras de duodeno, yeyuno, ileon y saco ciego. A los 13 días de edad el PECD incrementó el tamaño de la vellosidad del duodeno en el grupo sin desafiar el cual difirió ($p < 0.05$) con el testigo negativo y positivo. Esta tendencia se conservó para yeyuno, ileon y saco ciego que fueron diferentes ($p < 0.05$) a los grupos desafiados. El tamaño de la vellosidad del duodeno al día 20 de edad en el grupo con el PECD fue mayor y diferente ($p < 0.05$) al testigo negativo, no fue diferente al resto de los dos grupos. El tamaño de la vellosidad en yeyuno e ileon del grupo desafiado, fue mayor y diferente ($p < 0.05$) al resto de los grupos. En esta fecha el testigo negativo presentó el menor tamaño de vellosidad del saco ciego. En las dos fechas de evaluación el grupo testigo positivo presentó mayor número ($p < 0.05$) de aves positivas a SE en tonsilas cecales que el grupo suplementado con el PECD. No hubo diferencia en la recuperación de SE a partir de hígado-bazo. El PECD ejerce un efecto positivo sobre el crecimiento de las vellosidades intestinales; posiblemente a través de la producción de metabolitos secundarios y debido al rápido establecimiento de la microbiota nativa intestinal (MNI). El PECD administrado al día de edad en pollos de engorda ejerce un nivel adecuado de protección en epitelio cecal, excluye significativamente la presencia de SE.

INTRODUCCIÓN

La *Salmonella* spp., es la causa más frecuente por la cual los humanos sufren de enteritis por ingerir insumos alimenticios contaminados.¹ Durante las dos décadas pasadas, se ha observado en muchos países del mundo el aumento de brotes por *Salmonella enteritidis* (SE) por ejemplo, entre 1980 y 1989 los aislamientos de SE aumentaron 13 veces en el Reino Unido.² En 1987 debido a una gran difusión de la prensa en Estados Unidos sobre éste hecho hubo una reducción inmediata sobre el consumo de carne de pollo cercano al 50 %, lo cual ocasionó una pérdida económica a largo plazo del 10 al 20%.^{1,2,3}

En nuestro país esta enfermedad representa un riesgo permanente para la avicultura tanto en productividad zootécnica como en el riesgo potencial para la salud pública.^{1,4} El riesgo potencial se debe en gran parte a la afección por paratifoideas, como las producidas por *S. enteritidis* las cuales pueden llegar a ser mortales en niños, ancianos y pacientes inmuno-comprometidos, además de llegar a producir baja productividad en las aves domésticas.^{2,3,5}

El impacto económico, aunque no es claramente visible, no deja de ser importante ya que prácticamente cada ración de alimento para pollo de engorda tiene incorporado un nivel fijo de antibióticos o promotores de crecimiento, los cuales aumentan el costo del alimento por tonelada.¹ En las aves como en muchas de las especies seleccionadas para la producción intensiva (vacas lecheras, cerdos magros, cabras lecheras) la microbiota nativa intestinal (MNI) desempeña un papel importante en la digestión de algunos nutrientes de la dieta, además de constituir una barrera de primer orden que ayuda a inhibir la colonización por agentes patógenos entéricos.^{6,7,8,9,10}

El avance creciente de la legislación internacional (*World Health Organization*, WHO) propone cada vez con mayor intensidad el retiro paulatino de los antibióticos que se han empleado por décadas como promotores de crecimiento, dando como opción la suplementación del alimento con otro tipo de aditivos inocuos que ayuden a evitar la transmisión de resistencias bacterianas y que pudieran consecuentemente disminuir la

eficacia de los antibióticos de uso humano, lo cual paulatinamente se ha convertido en una realidad.^{1,11}

Ante la necesidad de productos inocuos y naturales que proporcionen los mismos beneficios que se han atribuido a los antibióticos empleados rutinariamente como promotores de crecimiento, actualmente se están efectuando estudios con cultivos bacterianos benéficos conocidos como probióticos.^{1,9,12,13,14}

La alta susceptibilidad a agentes patógenos entéricos en las aves jóvenes y su falta de MNI fue señalada inicialmente por el profesor Esko Nurmi en Finlandia hace más de 25 años.¹⁵ Su grupo de estudio mostró que la colonización por *Salmonella* spp., en los pollitos recién nacidos, podía ser prevenida por medio de la administración oral de bacterias procedentes de la flora bacteriana de aves adultas sanas.^{1,15}

La propuesta de Nurmi ha sido ampliamente adoptada en diferentes países para el control de la salmonelosis en aves y se conoce genéricamente como "Concepto de Nurmi" o "Exclusión Competitiva" (EC).^{1,15}

La EC involucra una interacción dinámica entre los niveles y especificidad de la población de MNI y el ambiente ecológico de cada una de las secciones del aparato gastrointestinal de las aves domésticas.^{1,7,14,16}

Desde hace tiempo se ha efectuado investigación con bacterias como *Lactobacillus* spp., y *Bifidobacterium* spp. Las cuales han mostrado su utilidad en la reducción de la contaminación por *Salmonella* spp., en las granjas de producción y durante el procesamiento de las parvadas.¹⁷ Actualmente existen varios tipos de cultivos bacterianos que se utilizan como fuentes de MNI, este tipo de microbiota benéfica debe poblar el tracto digestivo de las aves desde el primer día de vida. Este tipo de cultivos bacterianos se dividen genéricamente en dos tipos, los definidos y los indefinidos; un cultivo de tipo definido es aquel que contiene microorganismos bien identificados y son inocuos para el hombre y las aves, mientras que uno de tipo indefinido es aquel que aunque aparentemente ejerce efectos benéficos de EC, no se conoce exactamente que microorganismos contiene el inóculo primario o si estos son completamente inocuos para las aves y el hombre.^{1,8}

No todos los productos empleados hoy día cumplen con los requerimientos especificados por los productores para lograr la optimización de los parámetros productivos y la exclusión efectiva de agentes patógenos específicos; ya que la función de protección (bacteriocinas, colicinas) y la bioquímica de cada una de las bacterias que los componen se encuentran reguladas por procesos interactivos multifactoriales que actualmente no se encuentran completamente entendidos ni aclarados.^{1,15}

Algunos de los factores que influyen en la formación definida de comunidades o nichos ecológicos por parte de la MNI en el intestino se pueden explicar posiblemente por la edad del huésped, el grado o intensidad de estrés productivo, la finalidad zootécnica, composición del alimento, calidad microbiológica del alimento, empleo de fármacos y las condiciones medio ambientales de crianza y producción.^{1,2,3,6,7,10,11,13} Sin embargo, se requiere estudiar cada uno de estos factores por separado y posteriormente integrarlos en forma conjunta para determinar las principales causas de acción por parte de este tipo de productos que utilizan MNI de tipo benéfico.

Bajo las condiciones actuales de presión económica, alta productividad, bajos costos de producción y rápida amortización de instalaciones, la producción del pollo de engorda debe ocupar el menor tiempo las instalaciones productivas. Actualmente el pollo destinado para roscería permanece únicamente de 35 a 42 días en granja y el destinado a supermercado únicamente 49 días. Bajo estas condiciones de producción intensiva los pollitos obtenidos de las incubadoras nacen con el tracto gastrointestinal inmaduro y sin MNI, ésta última en condiciones naturales de crecimiento la adquieren a partir de la convivencia con la madre, sin embargo, en condiciones intensivas de producción el pollito jamás convive con la gallina, por lo cual para favorecer una rápida madurez del tracto gastrointestinal es imprescindible proporcionar una MNI conocida a partir del primer día de edad.¹

Cuando se utilizan alimentos conocidos actualmente como funcionales en la alimentación animal, los cuales generalmente han sido complementados con prebióticos, probióticos o simbióticos la productividad se mejora.^{1,7,9,13} Esto se logra al modificar la ecología gastrointestinal y promover el mejor aprovechamiento de los nutrientes de la dieta, además de disminuir la cantidad de microorganismos patógenos en el tracto

gastrointestinal, ya que se genera un ambiente restrictivo por la producción de metabolitos bacterianos secundarios, de ácidos orgánicos, disminución del pH intestinal y por la producción de sustancias bactericidas.^{1,8,9,10}

Se ha observado que la aplicación de cultivos de MNI experimentales y comerciales en las aves recién nacidas, facilita el rápido establecimiento de la MNI, manteniendo un buen estado de salud en las aves y un incremento en los parámetros de producción.^{9,10,15}

Se ha reportado que el establecimiento de la MNI en el sistema digestivo del ave se encuentra relacionada con un incremento en la concentración de ácidos orgánicos y la subsiguiente disminución en el pH intestinal, sin embargo, se han observado además cambios estructurales e histológicos de la mucosa cecal.^{3,10,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29}

Lupton *et al.*,²⁴ sugiere que la fermentación de carbohidratos no digeribles en el intestino grueso del ave, puede ser un factor importante en la proliferación de las células de la mucosa intestinal. Estos cambios en la mucosa intestinal han sido asociados con un buen estado de salud y con un incremento de los parámetros productivos del ave.^{1,3,26,27} Algunos autores han reportado que en cerdos, las vellosidades y criptas intestinales de tamaño pequeño, están relacionadas con una pobre absorción de nutrientes.^{23,25}

Bi Yu *et al.*,³⁰ al administrar probióticos a pollos de un día de edad observaron un aumento significativo de los parámetros productivos en pollos de engorda en el periodo crítico de desarrollo (0 a 3 semanas). También se ha observado que la suplementación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) pueden incrementar los parámetros de producción en gallinas de postura.³¹

La intensa selección genética a la que el pollo de engorda ha sido sometido en las últimas cinco décadas, ha resultado en una selección indirectamente desfavorable, donde la presentación de problemas principalmente de tipo fisiológico ha aumentado.^{29, 32,33,34,35} Por ejemplo a pesar de que el ave ha incrementado su precocidad en cuanto al peso al mercado, se ha optimizado su conversión alimenticia y su rendimiento en canal, el largo del intestino a disminuido paulatinamente.^{29,34} Por lo cual en los últimos años, ha aumentado el interés de los nutriólogos y fisiólogos avícolas para combatir las limitaciones

del tracto gastrointestinal en los procesos físicos y químicos de la digestión y absorción de nutrientes.^{29,34} Hoy en día se sabe que la digestión y absorción de nutrientes en las primeras horas de vida del pollo recién nacido, constituyen dos funciones importantes y que si no se efectúan adecuadamente pueden llegar a ser detrimentales para su sobrevivencia y desarrollo, no solo en la primera semana de vida, sino durante todo el ciclo de producción.^{29,32,33,34,35,36}

En los últimos cinco años, se han efectuado una gran cantidad de estudios para mejorar la calidad de los nutrientes y las dietas que se ofrecen a las aves de producción, el uso de enzimas (fitasa, xilanas, proteasa, etc.) y otros aditivos (ácidos orgánicos, levaduras, carbohidratos complejos) se han implementado como una práctica cotidiana de incorporación en algunos alimentos. Sin embargo, hasta el momento no se conoce el mecanismo exacto de acción, ni el impacto que tiene el uso de estos aditivos sobre el sistema gastrointestinal del pollo de engorda. De aquí la importancia de desarrollar estudios (*in vivo* e *in vitro*) para tratar de entender algunos de los factores que alteran la fisiología gastrointestinal, la absorción de nutrientes y el desarrollo de una ecología intestinal "funcional", para entender el papel que juega la microbiota intestinal en la nutrición y la salud de los animales y desarrollar alimentos funcionales con la finalidad de remediar las posibles limitaciones de tiempo y salud.

En un estudio efectuado por Nava *et al.*²⁷ determinaron que un prebiótico tiene acción directa sobre las microvellosidades, promoviendo un crecimiento temprano; en ese estudio se determinó que al estimular un crecimiento más temprano de las mismas, el prebiótico que tiene acción directa sobre la MNI promueve un mejor aprovechamiento de los nutrientes lo cual contribuyó a obtener una mejor uniformidad del lote de aves. Se ha descrito que la producción de AGCC⁻ como metabolitos terminales de gran parte de bacterias benéficas suministradas en los productos de exclusión competitiva juegan un papel importante sobre la exclusión de patógenos entéricos y sobre el grado de maduración de la mucosa intestinal.^{1,2,8,19,38} Se ha mencionado además que los AGCC⁻ tienen un efecto regenerador sobre la mucosa intestinal de ratas, determinándose que el butirato es más efectivo que el acetato o el propionato en ésta labor.^{10,37,38,39} Además de los efectos tóxicos de los AGCC⁻ que han mostrado sobre las células bacterianas nocivas, mismos que son causados por la acumulación de aniones polares en el citoplasma y esta acumulación depende del pH que existe a través de la membrana celular, si este pH es

menor, el efecto de los AGCC' se potencializa. Otros ingredientes que se han empleado para estudiar la regeneración de la mucosa son la glutamina o algunos de sus derivados, como el ácido α -cetoglutarico (AKG) o la ornitina (α -cetoglutarato) que son precursores muy importantes para la síntesis de la proteína mucosal. Otro elemento evaluado es la arginina la cual se metaboliza dentro del enterocito a través de la arginasa transformándose en ornitina y urea.⁴⁰ Esta es capaz de estimular la replicación celular en el timo y la liberación de la hormona del crecimiento.⁴¹ Otra sustancia importante es la treonina, como factor precursor en la proliferación de células epiteliales y en la producción de mucina. Otro agente importante es este proceso regenerativo es la glutamina y los fosfolípidos de membrana los cuales interaccionan con la capa de mucus, se deben considerar también en este proceso algunos probióticos, especialmente algunos microorganismos del género *Lactobacillus* spp., y *Bifidobacterium* spp., aunque actualmente no existe suficiente información sobre su efecto en pollos.^{25,39,42,43,44}

En el presente estudio se evalúa el efecto que tiene un producto de exclusión competitiva de tipo definido sobre la integridad de la mucosa intestinal a lo largo del tracto digestivo del pollo de engorda y el grado de inhibición en la colonización de sacos ciegos e invasión de órganos internos por *Salmonella enteritidis*.

HIPÓTESIS

- La administración profiláctica de un producto de exclusión competitiva de tipo definido modificará la longitud de la vellosidad intestinal, además disminuirá la colonización por *Salmonella enteritidis* en pollo de engorda.

OBJETIVOS

- Observar el efecto de la administración profiláctica de un producto de exclusión competitiva de tipo definido sobre la longitud de la vellosidad intestinal en pollos de engorda infectados y no infectados experimentalmente con *Salmonella enteritidis*.

- Evaluar el porcentaje de inhibición en la invasividad a hígado, bazo y tonsilas cecales por *Salmonella enteritidis* en pollos de engorda tratados profilácticamente con un producto de exclusión competitiva de tipo definido.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales de experimentación.- Se emplearon pollos de engorda de un día de edad, mixtos (Ross x Ross) obtenidos de una incubadora comercial. Se mantuvieron en condiciones de manejo y bienestar de acuerdo con la NOM-069-ZOO-1999, en baterías eléctricas del Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M. Fueron alimentados con una dieta isocalórica e isoproteica en forma de harina de acuerdo con las necesidades indicadas para su edad (tablas del NRC-USA; 1994), no se les adicionó ningún tipo de antibiótico ni anticoccidiano en el alimento, se les proporcionó agua potable *ad libitum*. A su arribo a las instalaciones se tomó una muestra de 10 pollos, 80 gramos de muestra de la cama de cada caja de transporte y 500 gramos de muestras del alimento que se proporcionó durante el estudio, a estas muestras se les efectuó un estudio bacteriológico para confirmar la ausencia de *Salmonella* spp.

Inóculo.- Para el desafío se empleó una cepa de *Salmonella enteritidis* fagotipo 13a (Pt-13^a), proveniente del *National Veterinary Services Laboratory* en Ames, Iowa; con autorización para poder utilizarse en el Departamento de Producción Animal: Aves de la FMVZ-UNAM. Esta cepa es resistente (resistencia genómica) al ácido nalidixico (NA) y Novobiocina (NO). Con la finalidad de inhibir el crecimiento de otras bacterias diferentes a la cepa de referencia empleada, el medio selectivo de agar verde brillante (AVB) utilizado para su cultivo contenía 200 µg/ml de ácido nalidixico (NA) y 25 µg/ml de novobiocina (NO). El inóculo de SE fue estandarizado por espectrofotometría en solución amortiguada de fosatos (PBS) estéril. La dosis de desafío empleada fue de 1×10^8 unidades formadoras de colonia (UFC) contenidas en 250 µl por ave. La concentración óptima del inóculo se determinó mediante el conteo de UFC a partir de las últimas cuatro diluciones de ocho diluciones décuples seriadas provenientes del inóculo original, las cuales fueron sembradas en placas de agar verde brillante predosificadas con NA y NO como ya se describió anteriormente. El desafío se efectuó con una sonda de polipropileno directa a ingluvies. A las aves testigo, en cada ocasión de desafío únicamente se les proporcionó PBS estéril.

Producto de exclusión competitiva de tipo definido (PECD).- Se utilizó un probiótico de origen Europeo de tipo definido que actualmente se comercializa en el mercado

mexicano de productos avícolas, este cultivo de exclusión competitiva proviene de la microbiota de una sola ave libre de patógenos específicos (SPF), ésta microbiota es una mezcla refinada de bacterias anaerobias obligadas y facultativas. Se han obtenido 32 cultivos puros diferentes de este probiótico, los cuales ya han sido caracterizados. Los aislamientos incluyen 22 especies de bacilos y cocos aerobios representados en cinco géneros y diez especies de bacilos anaerobios facultativos y cocos que representan tres géneros. El probiótico está completamente libre de cualquier organismo formador de esporas y levaduras. Contiene una cuenta bacteriana de 1×10^{10} bacterias por gramo de polvo liofilizado. Con la finalidad de que cada ave recibiera la dosis adecuada, esta se administró por medio de una sonda de polipropileno directa a ingluvis. A las aves tratadas se les administró 1 mg/pollo del producto de exclusión competitiva al día uno de edad.

Diseño experimental.- Para la determinación de la variable de respuesta (grado de invasión por SE a hígado, bazo y tonsilas cecales) se asignaron 320 aves en 4 grupos de 20 pollos cada uno, compuestos cada grupo por dos réplicas en dos fechas distintas de desafío. Para la asignación de la variable explicativa se realizó el siguiente diseño experimental que contempló únicamente el análisis de un factor. Grupo 1, a las aves se les administró 250 μ l de PBS estéril directamente al ingluvies al día de edad, no se desafiaron. Grupo 2, a las aves se les administró el producto de exclusión competitiva (variable explicativa: cultivo definido) al día uno de edad a través de ingluvies, no se desafiaron. Grupo 3, a las aves se le administró el producto de exclusión competitiva (variable explicativa: cultivo definido) al día uno de edad a través de ingluvies, dos réplicas con tratamiento se desafiaron con SE a los 12 días de edad y otras dos réplicas con este mismo tratamiento se desafiaron al día 19 de edad. Grupo 4, aves sin producto de exclusión competitiva de tipo definido, únicamente recibieron 250 μ l de PBS estéril directamente en el ingluvies al día de edad. Dos réplicas se desafiaron con SE a los 12 días de edad y otras 2 réplicas con este mismo tratamiento se desafiaron al día 19 de edad. Para la determinación de la variable de respuesta (largo de las vellosidades intestinales) 24 horas posteriores a cada desafío con SE (12 y 19 días de edad) de cada grupo (1,2,3 y 4) se tomaron 5 aves por réplica (total por grupo de tratamiento n=10), a partir de las cuales se obtuvieron las muestras histológicas a partir de diferentes secciones del intestino.

DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO

Grupo	Tratamiento	Vía de aplicación	Desafío	Sacrificio
1	0.25 ml de PBS	Oral 1 día de edad	0.25 ml de PBS	A los 13 y 20 días de edad
2	1 mg/ave producto de EC comercial (PDEC)	Oral 1 día de edad	0.25 ml de PBS	A los 13 y 20 días de edad.
3	1 mg/ave producto de EC comercial (PDEC)	Oral 1 día de edad	0.25 ml con 1×10^8 ufc de <i>S. enteritidis</i> a los 12, 19 días de edad	A los 13 y 20 días de edad
4	0.25 ml de PBS	Oral 1 día de edad	0.25 ml con 1×10^8 ufc de <i>S. enteritidis</i> a los 12, 19 días de edad	A los 13 y 20 días de edad

PDEC = Producto de exclusión competitiva comercial con MNI definida

Evaluación del estudio.- A las veinticuatro horas post-desafío con SE, ^{3,22,45,46,47} las aves procedentes de cada grupo fueron sacrificadas por dislocación cervical de acuerdo con lo indicado en el reporte del panel sobre eutanasia organizado por la asociación americana de medicina veterinaria (Dislocación cervical: pag. 240-241 AVMA por sus siglas en inglés).⁴⁸ A partir de cada ave se obtuvieron de manera aséptica, bajo condiciones de laboratorio (mechero bunsen) una muestra de hígado, bazo y tonsilas cecales, las cuales se sembraron como una sola muestra combinada (hígado-bazo) y tonsilas cecales por separado en 10 ml de caldo tetratonato.⁹ Las muestras se incubaron durante 24 horas a 37°C de acuerdo a lo descrito por Nisbet *et al.*,⁴⁹ Después de la incubación el caldo tetratonato fue cultivado en AVB acondicionado con 25 µg/ml de NO y 200 µg/ml de NA, se incubaron durante 24 horas a 37°C. Posteriormente se buscaron las colonias lactosa negativas sugestivas de SE resistentes a NO y NA. De las colonias lactosa negativas

⁹ Difco, Ann Arbor, MI USA

se seleccionó una muestra del 20% para su identificación por medio de pruebas bioquímicas y serotificación.

Evaluación morfométrica de la mucosa intestinal.- Veinticuatro horas después del desafío con SE e inmediatamente después de la eutanasia se colectaron muestras por porciones de aproximadamente 3 cm a partir de duodeno (se seccionó un centímetro después de la curvatura de la primera asa duodenal, involucrando una porción de páncreas). Para el yeyuno se cortó primariamente de forma transversal dos centímetros anteriores al conducto de Meckel, posteriormente se tomaron 3 cm hacia la parte anterior del intestino. Del ileon se obtuvieron los tres centímetros requeridos a partir de un corte realizado dos centímetros antes de la válvula ileocecal y los tres centímetros fueron seccionados hacia la parte anterior del intestino. A partir del ciego se cortó una porción de 3 cm exactamente a la mitad, de manera equidistante hacia cada uno de los extremos de uno de los dos sacos ciegos. Los fragmentos de tejido se fijaron al menos durante 72 horas en solución de formalina tamponada al 10%. Las muestras se procesaron de acuerdo con las técnicas histológicas empleadas de rutina (con base en parafina).⁵⁰ Las secciones cortadas en el microtomo (~4µm) fueron teñidas con hematoxilina y eosina.⁵⁰ Los cortes histológicos se evaluaron en un microscopio óptico compuesto (Zeiss®). El largo de las vellosidades intestinales se midió con una cuadrícula micrométrica y la mucosa se evaluó en cinco sitios seleccionados al azar.⁸

Análisis estadístico.- La variable de respuesta (porcentaje de aves positivas a SE) se evaluó a través de la prueba de ji-cuadrada con un grado de significancia estadística de $P < 0.05$. la variable de respuesta (largo de las vellosidades en micrometros) se evaluó por medio de un análisis de varianza con un procedimiento para modelos lineales generales (GLM). Las diferencias entre los grupos se determinaron por medio de la prueba de comparación múltiple de medias de Turkey con un grado de significancia estadística para alfa de 5% respecto a la unidad.⁵¹

RESULTADOS

Las muestras de aves, alimento y cama analizadas para determinar la posible presencia de *Salmonella* spp., fueron negativas.

El PECD incrementó el tamaño de la vellosidad intestinal del duodeno a los trece días de edad en las aves que no recibieron el desafío con *S. enteritidis*, las cuales fueron diferentes ($p < 0.05$) al grupo testigo negativo y al grupo testigo positivo, sin embargo, no difirió con el grupo que recibió el PECD y fue desafiado (Tabla 1).

El tamaño de la vellosidad del yeyuno en el grupo suplementado únicamente con el PECD fue el mayor de los cuatro grupos, aunque no difirió respecto al grupo testigo negativo, los dos grupos si fueron diferentes ($p < 0.05$) con relación a los dos grupos que recibieron el desafío con *S. enteritidis*.

El grupo suplementado con el PECD al día 13 de edad mostró el mayor tamaño de vellosidad en ileon y aunque no fue diferente respecto al grupo testigo negativo, si difirió ($p < 0.05$) con relación a los grupos desafiados, ésta misma tendencia se observó con relación al tamaño de las vellosidades en el saco ciego de los diferentes grupos (Tabla 1).

El tamaño de la vellosidad del duodeno al día 20 de edad en el grupo suplementado con el PECD fue el mayor, mostró diferencia estadística ($p < 0.05$) con el grupo testigo negativo, sin embargo, no difirió con el resto de los grupos (Tabla 2).

En yeyuno el grupo desafiado mostró una fuerte tendencia al crecimiento de la vellosidad mostrando diferencia ($p < 0.05$) respecto al resto de los grupos. En ileon el grupo testigo positivo fue el de mayor tamaño difiriendo con el resto de los grupos, el grupo con suplementado con el PECD y que fue desafiado mostró ser diferente a los dos grupos restantes que mostraron menor tamaño de la vellosidad.

En saco ciego el grupo con el PECD fue diferente con relación al grupo testigo negativo ($p < 0.05$) y aunque mostró una tendencia similar a la observada a los 13 días de edad, en esta ocasión no fue diferente a los grupos desafiados con *S. enteritidis* (Tabla 2).

El porcentaje de colonización a hígado-bazo por SE en los grupos desafiados al día 13 y 20 de edad no mostró diferencia estadística significativa, sin embargo, en el grupo testigo positivo el porcentaje de aves positivas a SE en tonsilas cecales en cualquiera de las dos fechas evaluadas (13 y 20 días de edad) fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que en el grupo suplementado al día de edad con el PECD (Tabla 3).

Las muestras probables de contener *Salmonella* spp., fueron verificadas por medio de pruebas bioquímicas, se determinó que el 100% correspondían a *Salmonella* spp., móvil, al efectuarse la serotipificación a partir de las mismas muestras, éstas correspondieron a *Salmonella enteritidis* serotipo *enteritidis* (grupo D1; O:1,9,12; H:g,m).

DISCUSIÓN

El PECD empleado en el presente estudio es un probiótico que funciona principalmente por medio del concepto de Nurmi, excluyendo patógenos entéricos a través de los mecanismos que anteriormente se han propuesto para explicar la funcionalidad de este tipo de productos.^{1,15,52,53,54,55} Uno de los mecanismos más factibles es la restricción ambiental que genera este tipo de microbiota nativa intestinal en el tracto digestivo, la cual en el presente estudio fue proporcionada por el PECD comercial. Otro mecanismo importante que posiblemente explica la funcionalidad de este tipo de productos es la ocupación de receptores o bien por la adhesión a las vellosidades de las células intestinales, principalmente las del saco ciego, ocupando los espacios físicos disponibles excluyendo de esta forma la adhesión de patógenos entéricos del tipo de las Salmonelas.^{1,45} En el presente estudio el efecto de exclusión competitiva se manifestó de mejor forma con la exclusión de SE a nivel de sacos ciegos, que la observada a nivel de órganos internos, de acuerdo con los hallazgos efectuados por Schneitz *et al.*,¹⁰ quien estudio este mismo producto, el PECD empleado en el presente estudio contiene microorganismos seleccionados para adherirse específicamente al epitelio cecal.

La pared intestinal es la única barrera física que existe entre un medio altamente contaminado con millones de microorganismos potencialmente patógenos y el interior de la cavidad corporal de un organismo sano y saludable. Existe una gran cantidad de estructuras químicas orgánicas, inorgánicas y biomoléculas de diferentes orígenes que interactúan homeocinéticamente para mantener un delicado equilibrio entre lo interno del organismo y lo externo del medio ambiente, además de permitir la absorción de nutrientes evitando el paso a microorganismos patógenos al interior del sistema circulatorio. En el presente estudio se determinó que el efecto de las bacterias contenidas en el PECD sobre el grado de maduración de las vellosidades intestinales del duodeno es muy importante, debido a que a los 13 y 20 días se observó que el grupo que únicamente fue suplementado con el PECD presentó anatómicamente las vellosidades intestinales más largas con relación al resto de los grupos; lo cual se puede atribuir a un efecto benéfico directo sobre esta porción del intestino por parte de las bacterias contenidas en el producto de exclusión competitiva; ya que los efectos benéficos del PECD al estimular el crecimiento de las vellosidades, ayuda a regular la función fisiológica del tracto intestinal y a tener un sano equilibrio entre las bacterias benéficas que poblan el tracto

gastrointestinal de las aves domésticas. Bahena *et al.*,⁵⁶ observó un efecto semejante en las vellosidades de yeyuno pero no del duodeno en aves de 23 días de edad suplementados con 10 ppm de avilamicina, en tanto que a los 37 días de edad observó una mayor diferencia de tamaño en la longitud de las vellosidades de duodeno y yeyuno en las aves suplementadas con la avilamicina, esta diferencia análoga al del presente estudio posiblemente se debe a la selección de un tipo específico de MNI presente en la luz intestinal y a sus efectos benéficos, sin embargo, el mecanismo exacto de este efecto aún no se encuentra totalmente explicado.

Lo que en el presente estudio fue evidente es que en el grupo suplementado con el PECD y desafiado a los 12 días de edad, el efecto de protección fue mayor al grupo positivo no suplementado y desafiado con SE, al mismo tiempo no difirió respecto al grupo testigo negativo. Observándose un efecto de falta de estímulo de crecimiento de las vellosidades en el grupo positivo. Es posible que este efecto ya no se pudiera verificar adecuadamente al día diecinueve debido al cambio de condiciones fisicoquímicas en este sitio del tracto digestivo.

En yeyuno a los 12 días del desafío el grupo suplementado únicamente con el PECD y sin desafío no es diferente al grupo negativo. Mientras que los dos grupos desafiados en esta misma fecha mostraron un tamaño de vellosidad menor, atribuyendo esto posiblemente al desafío con SE. Si bien no se puede descartar una presión negativa sobre el crecimiento de la vellosidad o sobre el desarrollo normal de la misma por parte de las bacterias del desafío (SE) debida principalmente a los efectos de colonización, para poder determinar este efecto se requería acortar los tiempos en la toma de muestras para verificar adecuadamente el comportamiento dinámico de la morfología intestinal a este nivel, además verificar en cada ocasión el grado de traslocación bacteriana existente.

Aunque se conoce muy bien que el sitio de invasión por parte de la *Salmonella* spp., es el saco ciego, en el presente estudio hubo una marcada estimulación del crecimiento de las células de la vellosidad intestinal en sacos ciegos, lugar donde se ha mostrado que la *S. enteritidis* encuentra un nicho propicio para su establecimiento. El lograr que se establezca rápidamente una microbiota conocida e inocua como la proporcionada por el PECD permite que la exclusión de patógenos entéricos como la *Salmonella* spp, sea satisfactoria, como la observada en el presente estudio.

Si bien se observó cierta tendencia de estímulo en el crecimiento de las vellosidades en duodeno y yeyuno, esta fue poco significativa desde el punto de vista de exclusión, ya que a este nivel actúan otro tipo de factores propios del ave que inhiben significativamente la adhesión y colonización por parte de bacterias del tipo de la *Salmonella* spp. No debe descartarse que la microbiota proporcionada en el PECD podría estar estimulando favorablemente la activación y maduración de las vellosidades de absorción en esta etapa temprana del ave, de acuerdo con lo reportado por Ouwehand *et al.*,⁵⁷ quien menciona un efecto importante de estimulación física y enzimática por parte de las bacterias contenidas en los productos conocidos como probióticos. Nuotio y Mead,⁵⁸ mencionan que las comunidades bacterianas del tracto gastrointestinal son metabólicamente muy poderosas, por lo cual una microbiota bien desarrollada y funcional, ayudará a mantener óptimamente la integridad morfológica y el funcionamiento del sistema digestivo.

A los trece días de edad se notó muy bien la tendencia de crecimiento de las vellosidades de sacos ciegos e ileon, sin embargo a los 20 días esta tendencia, aunque se observa, no es lo suficientemente significativa respecto a los grupos desafiados, una razón del aumento del tamaño de la vellosidad podría ser debida en cierta forma al grado de colonización severa por parte de *S. enteritidis*, ya que en estos grupos se observó además una gran cantidad de infiltrado mononuclear, aunque ésta fue menor en el grupo suplementado con el PECD. Lo cual posiblemente se debió a la acción de protección conferida por la MNI, misma que de acuerdo con Nava *et al.*,⁵⁹ favorece la producción de sustancias antibacterianas (bacteriocinas), y estimula la respuesta inmune (actividad de macrófagos, células T, interferón, interleucinas, placas de Peyer) en contra de patógenos intestinales.

En un estudio efectuado por Nava *et al.*,¹⁹ al suplementar la dieta de aves con 3% de un oligosacárido sintético comercial compuesto por fructosa y dextrano (oligosacárido) y posteriormente desafiar a las aves con *S. enteritidis* no observó ningún tipo de efecto sobre el crecimiento de las vellosidades de los sacos ciegos tanto en los grupos suplementados únicamente con el oligosacárido como en los grupos desafiados con SE, por otro lado estos autores mencionan que con la suplementación de lactosa al 10% y el desafío con *S. enteritidis* se observó una marcada reducción en el espesor de la lámina

propia del saco ciego, así como un aumento de proliferación celular, aunque esta observación fue de tipo subjetiva. En el caso de este autor el tipo celular observado es compatible con la infiltración mononuclear observada en los grupos desafiados con *S. enteritidis* del presente estudio. En el estudio de Nava *et al.*,¹⁹ estos autores mencionan que la fermentación de carbohidratos no digeribles en el intestino grueso, es un factor determinante para la proliferación de la mucosa celular, ya que gracias al continuo intercambio de gradientes de pH intracelular y extracelular se activa la división celular, aunque este efecto se atribuye actualmente con mayor relevancia a la acción que ejercen los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) producidos como metabolitos secundarios por la biota benéfica establecida previamente en los sacos ciegos, suministrada ésta a través de un probiótico.

Nava *et al.*,^{27,59} determinaron que la administración de un derivado de Harina de *Aspergillus* spp., (HA) que tiene la función especificada para los prebióticos, en pollos de engorda neonatos favoreció el desarrollo de la mucosa intestinal, ya que en aves alimentadas con la dieta suplementada con HA, estos autores observaron las vellosidades del ileon al día 20 de edad 48.9% más largas que las vellosidades del ileon del grupo control sin HA, sin embargo, no determinaron diferencias respecto a la longitud de las vellosidades en sacos ciegos, como si se realizó en el presente estudio. Además Nava *et al.*,⁵⁹ no observó diferencias en el aumento de las vellosidades del saco ciego e ileon al día 10 de edad en aves suplementadas con HA, mientras que en el presente estudio se observó una diferencia muy notoria a esta temprana edad, ya que el tamaño de las vellosidades al día 13 de edad en el grupo suplementado únicamente con el PECD fue diferente al resto de los grupos desafiados con la SE, tendencia que se observó también en las vellosidades del saco ciego, por lo cual se determinó que la suplementación con el PECD a esta edad tiene un efecto marcado sobre el tamaño de la vellosidad de ileon y saco ciego principalmente. Aunque este comportamiento no se pudo determinar a los 20 días, si se observó que las vellosidades del saco ciego del grupo con el PECD fueron mayores a las del grupo testigo que no recibió el PECD ni el desafío. Situación que es diferente con la reportada por Nava *et al.*,^{27,59} Esta situación posiblemente se deba a una diferencia en los efectos o grado de afectación (de manera favorable, por el tipo de producto que el autor utilizó fue prebiótico y lo que se usó en el presente estudio fue probiótico sin levaduras, lo cual favorece probablemente más el crecimiento de vellosidades) de las bacterias contenidas en el PECD o las bacterias inducidas a

establecerse por un prebiótico como el utilizado por Nava *et al.*,^{27,59} el cual tiene una acción general sobre una microbiota que no es específica ni es proporcionada al mismo tiempo que el prebiótico, esta microbiota se establece a partir del medio ambiente a diferencia de un probiótico definido como el empleado en el presente estudio, el cual, de acuerdo con Schneitz *et al.*,¹⁰ tiene una afinidad específica hacia mucosa cecal.

El aumento de la vellosidad del ileon, Nava *et al.*,^{27,59} lo atribuye al aumento de la actividad de la microbiota intestinal y a la síntesis específica de AGCC'. Sin embargo, esto aún no se ha podido corroborar, ya que otros autores como Yu *et al.*;²⁶ Rolls *et al.*;⁶⁰ Topping *et al.*;⁶¹ y Jamroz *et al.*,⁶² han atribuido esta acción principalmente al estímulo mecánico sobre la mucosa intestinal, observando que cuando se suplementa el alimento con partículas de mayor grosor el aumento del tamaño de la vellosidad intestinal es proporcional al aumento de la partícula alimentaria.

La HA utilizada como prebiótico por Nava *et al.*,^{27,59} se compone de hasta 45% de fibra no vegetal. El porcentaje de inclusión en la dieta de HA fue únicamente del 0.2%, el efecto de la HA sobre las vellosidades, estos autores lo atribuyen directamente al papel que ejerce este prebiótico sobre la microbiota benéfica, más que a un probable efecto mecánico, sin embargo, no lograron corroborarlo. La acción de la HA, estos investigadores la definen directamente como un factor importante de influencia sobre la MNI de tipo benéfico del saco ciego con la finalidad de producir AGCC'. Esto en concordancia con lo reportado por Sakata y Yajima;³⁹ Topping *et al.*,⁶¹ y Kripke *et al.*,⁶³ quienes han reportado que los AGCC' en roedores tienen la capacidad principal de estimular el desarrollo de la mucosa de ileon y colon. El crecimiento de vellosidades es aumentado por la MNI del PECD por lo tanto la MNI aumenta la protección contra agentes patógenos probablemente también por una producción temprana de AGCC'. De acuerdo con lo reportado por Fuller *et al.*,⁶⁴ a mayor eficiencia de la MNI, mayor aprovechamiento, mejor inmunomodulación y una adecuada contribución nutritiva para el huésped.

Koruda *et al.*,⁶⁵ observaron que la suplementación con AGCC' retarda la atrofia de la mucosa intestinal en animales alimentados únicamente por vía parenteral. En tanto que Reimer y McBurney.⁶⁶ verificaron que la alimentación de roedores con carbohidratos fermentables, promueve el crecimiento de las células de ileon y aumenta los niveles del péptido-1 mRNA, el cuál es responsable de la replicación celular. Por lo cual además de

promover el desarrollo de la mucosa intestinal, los AGCC⁺, principalmente el butirico, reducen el riesgo de transformaciones malignas en las células del intestino grueso, además de impedir algunos tipos de traslocaciones bacterianas.

Velásquez *et al.*,⁶⁷ por su parte han mencionado que en condiciones normales, el ácido butirico en una concentración de 10 a 25 mM en el lumen intestinal favorece la proliferación celular en las criptas de las vellosidades del intestino de los roedores. En experimentos previos con pollos, patos y gansos Yu *et al.*,²⁶ Furuse *et al.*,³⁷ Smits *et al.*,⁴¹ Rolls *et al.*,⁶⁰ Jamroz *et al.*,⁶² Yasar y Forbes,⁶⁵ y Langhout *et al.*,⁶⁹ han encontrado y definido que al menos existen dos factores considerados muy importantes que influyen directamente en el desarrollo e integridad de la mucosa del tracto intestinal, el primero es el tipo de dieta (suplementada con fibra fermentable) y el segundo es el incremento en la actividad de la microbiota intestinal (síntesis de AGCC⁺)

Actualmente no se conoce el mecanismo exacto a través del cual los AGCC⁺ actúan en el flujo sanguíneo de los sacos ciegos e ileon, y si bien el mecanismo de acción podría estar relacionado con efectos en las redes nerviosas locales, principalmente sobre los receptores que se pueden afectar directamente en la musculatura intestinal, la acción de los AGCC⁺ producidos en el saco ciego por una microbiota definida como la proporcionada por el PECD evaluado en el presente estudio podría estar mostrando además de un efecto benéfico sobre la exclusión competitiva, un aumento del flujo sanguíneo, de oxigenación, de transporte y de absorción de nutrientes.

Los resultados del presente estudio avalan y coinciden con el trabajo efectuado por diferentes investigadores que han mostrado el grado de protección óptimo que se obtiene contra la colonización e invasión de órganos por *Salmonella* spp., al suministrar MNI proveniente de aves maduras a pollitos de un día de edad.^{10,15,45,46,47,49,50,54,55,56,57,70}

No debe descartarse el hecho de que la EC es una opción viable a la sustitución de los antibióticos empleados como promotores de crecimiento en pollo de engorda. Pérez *et al.*,⁷¹ coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio sobre el aumento de la actividad probiótica observada en los grupos suplementados con el PECD, explicados mediante una mejora en el balance microbiano de los sacos ciegos de pollo de engorda. Lo cual constituye uno de los principales mecanismos de acción propuestos por

diferentes investigadores para los antibióticos empleados como promotores de crecimiento de aves.¹ Sin embargo, no se debe dejar de considerar como contraparte y de hecho como justificación para la elaboración de mayor investigación en esta área que de acuerdo con Orenca *et al.*,⁷² determinaron que la EC solo es una herramienta más que contribuye a tener un control sobre la microbiota patógena, más no a la eliminación total de la misma.

Se requiere efectuar más estudios que determinen el efecto directo de los metabolitos secundarios producidos por una microbiota benéfica específica definida sobre el tamaño de la vellosidad en las primeras etapas de vida del pollo de engorda, su relación con la eficiencia en los parámetros de producción y además verificar el grado de exclusión competitiva de los PECD a través de la cuantificación directa de UFC de SE presentes en los sacos ciegos, debido a que una verificación de este tipo corroboraría la fiabilidad de la metodología cualitativa de corroboración de la presencia de SE empleada en el presente estudio.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se pudo determinar que el PECD ejerce un efecto positivo sobre el crecimiento de las vellosidades intestinales, independiente del desafío efectuado con *Salmonella enteritidis*.

El PECD ejerce un nivel adecuado de exclusión competitiva en el epitelio cecal en los grupos que lo recibieron al día de edad, en comparación con órganos internos como hígado-bazo, excluyendo significativamente la presencia de *Salmonella enteritidis*.

LITERATURA CITADA

- 1.-Juárez EMA, Nava MG, Ledesma MN, Merino GI, Tellez IG. Exclusión competitiva en las aves domésticas. Memorias de las IX Jornadas Médico Avícolas. 2003 febrero 19-21; Ciudad Universitaria (DF). México (DF): División de Educación Continua y Departamento de Producción Animal:Aves. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM., 2003: 183-193.
- 2.-Urquiza BO. Situación actual de la salmonelosis aviar. Memorias de las IX Jornadas Médico Avícolas. 2003 febrero 19-21; Ciudad Universitaria (DF). México (DF): División de Educación Continua y Departamento de Producción Animal: Aves. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM., 2003:112-119.
- 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 leghom chicks. Poult Sci 1993;72:636-642.
- 4.-Gutiérrez-Gogco L, Montiel-Vázquez E, Aguilera-Pérez P, González-Andrade M. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud en México. Sal Pub Mex 2000;42:95.
- 5.-Kogut MH, Fukata T, Tellez G, Hargis BM, Corrier DE, DeLoach JR. Effect of *Eimeria tenella* infection on resistance to *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chicks inoculated with anaerobic cecal flora and fed dietary lactose. Avian Dis 1994; 38:59-64.
- 6.-Holzapfel WH, Scillinger U. Introduction to pre- and probiotics. Food Research International. 2002;35:109-116.
- 7.- Collins MD, Gibson GR. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. Am J Clin Nutr 1999;69:1052-1057.
- 8.- Nava MG. Efecto de un producto de exclusión competitiva comercial (preempt™) sobre la mortalidad y transmisión horizontal de *Salmonella gallinarum* en pollo de engorda. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. Y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF. (2000).
- 9.-Nava MG, Juárez EMA, Merino GR, Ledesma MN y Tellez IG. Prebióticos, probióticos y simbióticos en la ecología intestinal de las aves domésticas. Memorias de las VIII Jornadas Médico Avícolas. 2002 febrero 20-22; Ciudad Universitaria (DF). México (DF): División de Educación Continua y Departamento de Producción Animal: Aves. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM., 2002:174-178.

- 10.-Schneitz C, Kiiskinen T, Toivonen V, Näsi M. Effect of Broilact® on the physicochemical conditions and nutrient digestibility in the gastrointestinal tract of broilers. *Poultry Science* 1998; 77:426–432.
- 11.-Kaur IP, Chopra K, Saini A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2002;15:1–9.
- 12.- Tellez IG, Petrone GV, Escorcía SM, Rosario CC, Nava MGM, Juárez EMA, Velasco X, Calderón N, Morisihita TY, Cobb CW, Villaseñor L. Evaluación de Avian Pac soluble en la colonización cecal e invasión en los órganos por *Salmonella enteritidis* en pollo de engorda. Memorias de la XXV Convención anual ANECA; 2000 mayo 3-6; Cancún (Quintana Roo) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, A.C. 2000:344-349.
- 13.- Roberfroid MB. Prebiotics and probiotics: are they functional foods?. *Am J Clin Nutr* 2000;71:1682-1687.
- 14.- Mattila-Sandholm T, Myllärinen P, Crittenden R, Mogensen G, Fondén R, Saarela M. Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal* 2002;12:173-182.
- 15.- Nurmi E, Rantala M. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature* 1973;241:210-211.
- 16.- Gong J, Forster J, Yu H, Chambers JR, Wheatcroft R, Sabour MP, Chen S. Molecular analysis of bacterial populations in the ileum of broiler chickens and comparison with bacteria in the cecum. *FEMS microbiology ecology* 2002;1376:1-9.
- 17.- Palmu L, Camelin I. The use of competitive exclusion in broilers to reduce the level of *Salmonella* contamination on the farm and the processing plant. *Poultry Science* 1997;76:1501-1505.
- 18.- Hinton A, Corrier DE, Spates GE, Norman JO, Ziprin RL, Beier RC, DeLoach JR. Biological control of *Salmonella typhimurium* in young chickens. *Avian Dis.*1990;34:626-633.
- 19.-Nava MG, Juárez EM, Tellez 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 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.

- 20.- Tellez IG. Endogenous factors and mechanisms that confer resistance to *Salmonella enteritidis* infectivity in the intestinal tract of Leghorn chickens. (Tesis de Doctorado), Texas, U.S. A. college of Veterinary Medicine, Texas A & M University, 1992.
- 21.- 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.
- 22.-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.
- 23.- Deschner EE, Cohen BI, Raicht RF. Acute and chronic effect of dietary cholic acid on colonic epithelial cell proliferation. Digestion 1982;21:290-296.
- 24.- Lupton JR, Jacobs LR. Fiber supplementation results in expanded proliferative zones in rat gastric mucosa. Am J Clin Nutr 1987;46:980-984.
- 25.- Sigalet DL, Lees GM, Aherne F, Van Aerde JE, Fedorak RN, Keelan M, Thomson AB. The physiology adaptation to small bowel resection in the pig: an integrated study of morphological and functional changes. J Pediatr Surg 1990;25(6):650-657.
- 26.-Yu B, Tsai CC, Hsu JC, Chiou PW. Effect of different sources of dietary fiber on growth performance, intestinal morphology and cecal carbohydrases of domestic geese. Br Poultry Sci. 1998; 39:560-567.
- 27.- Nava MG, Ledesma N, Morales E, Juárez MA, Pérez G, Bahena HJ, Barri A, Andrade M, Carrillo DS, Sanguinés GL, Priego BA, Priego GC, Castillo DR, Solano ML, Sutton L, Tellez IG. Efecto de la administración de harina de *Aspergillus* sp, fitasa bacteriana y ambos productos en la dieta de pollos de engorda II: sobre los cambios en las vellosidades intestinales y parámetros químicos sanguíneos. Memorias de la XXVI Convención anual ANECA; 2001 abril 25-28; Acapulco (Guerrero) México. (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC,2001;205-208.
- 28.-Uni Z, Noy Y, Sklan D. Posthatch changes in morphology and function of the small intestine in heavy and light-strain chicks. Poultry Sci. 1995;74:1622-1629.
- 29.- Sklan D, Noy Y. Hydrolysis and absorption in the small intestine of posthatch chicks. Poultry Sci. 2000;79:1306-1310.

- 30.-Bi Yu, Hau-Yang T, Wen-Shyg C. Caecal culture enhances performance and prevents *Salmonella* infection in broilers. *J Appl Poultry Res* 1999;8:195-204.
- 31.- Grobas S, Mateos GG, Mendez J. Influence of dietary linoleic acid on production and weight of eggs components in young brown hens. *J Appl Poultry Res* 1999;8:177-184.
- 32.-Buyse J, Michels H, Vloeberghs Buyse J, Michels H, Vloeberghs J, Saevels P, Aerts JM, Ducro B, Berckmans D, Decuyper E. Energy and protein metabolism between 3 and 6 weeks of age of male broiler chickens selected for growth rate or for improve food efficiency. *Br Poultry Sci.* 1998;39:264-272.
- 33.-Whitehead CC. Nutrition: the integrative science. *Br Poultry Sci.* 2000;42:5-15.
- 34.-Uni Z, Noy Y, Sklan D. Posthatch changes in morphology and function of the small intestine in heavy and light-strain chicks. *Poultry Sci.* 1995;74:1622-1629.
- 35.- Croom WJ, Brake J, Coles BA, Havenstein GB, McBride BW, Peebles DE, Taylor IL. Is intestinal absorption capacity rate-limiting for performance in poultry. *J Appl Poultry Res* 1999;8:242-252.
- 36.- Havey O, Greva A, Barak M, Uni Z, Skan D. Early posthatch starvation decreases satellite cell proliferation and skeletal muscle growth in chicks. *J Nutr.* 2000;130:850-864.
- 37.- Furuse M, Yang SI, Niwa N, Okumara J. Effect of short chain fatty acids on the performance and the intestinal weight in germ free and conventional chicks. *Br Poultry Sci.* 1991; 32:159-165.
- 38.- Sakata T. Stimulatory effects of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic factors. *Br. J. Nutr.* 1987; 58:95-103.
- 39.- Sakata T, Yajima T. Influence of short chain fatty acids on the epithelial cell division of digestive tract. *Q J Exp Physiol.* 1984;69:639-648.
- 40.- Barbul A. Arginine: Biochemistry, physiology and therapeutic implications. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition.* 1986;10:227-238.
- 41.-Blachier F, Darcy-Vrillon B, Sener A, Duee PH, Malaisse WJ. Arginine metabolism in rat enterocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1991;1092:304-310
- 42.-Smits CH, Te Maarseen CA, Mouwen JM, Koninkx JF, Beynen AC. The antinutritive effect of carboxymethylcellulose with high viscosity on lipid digestibility in broiler chickens is not associated with mucosal damage. *J Anim Nutr.*2000; 83:239-245.

- 43.- Smits CH, Soto-Salanova M, Flores A, Ter Huurne AA. Modulación a través de la dieta del confort intestinal de los pollitos. Memorias del XV Curso de Especialización. Avances en Nutrición y alimentación animal. 1999; Casarubios Del Monte (Toledo) España. Toledo (España): Nutreco Poultry Research Center. 1999:1-25.
- 44.- Corrier E, Nisbet JD, Scalan MC, Téllez GI, Hargis BM, DeLoach R. Resistance against *Salmonella enteritidis* cecal colonization in Leghorn chicks by vent lip application of cecal culture. Poult Sci 1994;73:648-652.
- 45.- Stavric S. Microbial colonization control of chicken intestine using defined cultures. Food Tech 1987;41:93-98.
- 46.- Loyd AB, Cumming BR, Kent DR. Prevention of *Salmonella typhimurium* infection in poultry by pretreatment of chickens and poults with intestinal extracts. Aust Vet J 1977;53:82-87.
- 47.- 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.
- 48.- Andrews EJ, Bennet BT, Derrell CJ, Houpt KA, Pascoe PJ, Robinson GW, Boyce JR. 1993 Report of the AVMA panel on euthanasia. JAVMA 1993;202:229-249.
- 49.- 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.
- 50.- Estrada FE, Peralta ZL, Rivas MP. Manual de técnicas histológicas. 1ª ed. México. AGT Editor, S.A., 1982.
- 51.- Luginbue RC, Schlotzhaver SD. SAS/STAT guide for personal computers. 6th edi. USA: SAS Institute Cary, NC, 1987:555-573.
- 52.- 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
- 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.- 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.): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, 1996.
- 56.- Bahena JC, Análisis histológico de la mucosa intestinal de pollos de engorda tratados con avilamicina como promotor de crecimiento. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 2002.
- 57.- Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Shortt C, Salminen S. Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal* 1999;9:43-52.
- 58.- Nuotio L, Mead GC. An *in vitro* model for studies on bacterial interactions in the avian caecum. *Lett Appl Microbiol.* 1993;17:65-67.
- 59.- Nava MG. Alimentos funcionales: modificación de la ecología gastrointestinal del pollo de engorda neonato con la inclusión de un prebiótico en la dieta. Tesis de Maestría. Fac. de Med. Vet. Y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF. (2002).
- 60.- Rolls BA, Turvey A, Coates M. The influence of the gut microbiota and dietary fibre on epithelial cell migration in the intestine. *Br J Nutr.*1978;39:91-98.
- 61.- Topping DI, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev.* 2001;81:1031-1064.
- 62.- Jamroz D, Jakobsen K, Orda J, Skorupinska J, Wiliczekwiczka A. Development of the gastrointestinal tract and digestibility of dietary fibre and amino acids in young chickens, ducks and geese fed diets with high amounts of barley. *Comp Bioch Physiol* A.2001;130:643-652.
- 63.- Kripke SA, Fox AD, Berman JM, Settle RG, Rombeau JI. Stimulation of intestinal mucosal growth with intracolonic infusion of short chain fatty acids. *J Parent Enteral Nutr.* 1989;13:109-116
- 64.- Fuller,R. Probiotics in man and animal. *Journal of Applied Bacteriology.*1989;66:365-378
- 65.- Koruda MJ, Rolandelli RH, Zimmaro-Bliss D, Hastings J, Settle RG. Parenteral nutrition supplemented with SCFA: effect on the small bowel mucosa in normal rats. *Am J Clin Nutr.*1990;51:685-689

- 66.- Reimer RA, Mcburney MI. Dietary fibre modulates intestinal proglucagon messenger ribonucleic acid and postprandial secretion of glucagon-like-peptide-1 and insulin in rats. *Endocrinology*. 1996;37:3948-3956
- 67.- Velazquez OC, Seto RW, Bain AM, Fisher J, Rombeau JI. Deoxycholate inhibits in vivo butyrate-mediated BrdU labeling of the colonic crypt. *J Surg Res*.1997;69: 344-348.
- 68.-Yasar S, Forbes JM. Performance and gastrointestinal response of broiler chickens fed on cereal grain-based foods soaked in water. *Br Poultry Sci* 1999;40:65-76.
- 69.- Langhout DJ, Schutte JB, Van Leeuwen P, Wiebenga J, Tamminga S. Effect of a dietary high- and low-methylated citrus pectin on the activity of the ileal microbiota and morphology of small intestine wall of broiler chicks. *Br Poultry Sci*.1999;40:340-347.
- 70.- 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.
- 71.- Perez M, Laurencio M, Piad B, Milan G, Rondon AJ, Amigo S, Bocuort R, Savon L. Evaluación de la actividad probiótica de un producto de exclusión competitiva sobre indicadores microbiológicos en el ciego de pollos de ceba. *Rev Cub de Cienc Avic*. 2002;26:29-35
- 72.- Oriencia BM, Vizmanos MFC, Padilla MA. Efficacy of two preparations that controlling cecal colonization of Salmonella by competitive exclusion in broiler chicks. *Phillip J Med*. 2001;8:75-78.

Tabla 1.- Efecto de un producto de exclusión competitiva definido sobre el tamaño de la vellosidad intestinal de duodeno, yeyuno, ileon y sacos ciegos de pollos de engorda de 13 días de edad infectados 24 horas antes con *Salmonella enteritidis* (PT-13^a).

Grupo	- Duodeno -	- Yeyuno -	- Ileon -	- Ciegos -
1 (Testigo -)	1,394.40±104.84 BC*	832.00±156.31 A	653.80±79.51 AB	258.86±36.44 AB
2 PECD-MNI	1,488.67±160.19 A	852.25±159.22 A	714.00±130.51 A	264.00±52.71 A
3 PECD-MNI +Se	1,463.00±107.74 AB	694.17±71.26 B	548.33±116.38 C	220.67±41.53 C
4 (Testigo Se+)	1,344.00±116.08 C	702.33±195.83 B	595.00±130.96 BC	236.67±41.56 BC

Valores en $\mu\text{m} \pm \text{D.E.}$ de cada columna con diferente literal (mayúscula) son estadísticamente diferentes por medio de la prueba de Tukey ($p < 0.05$) $n=10$. Valores provenientes de cinco lecturas por sitio anatómico de evaluación.

Tabla 2.- Efecto de un producto de exclusión competitiva definido sobre el tamaño de la vellosidad intestinal de duodeno, yeyuno, ileon y sacos ciegos de pollos de engorda de 20 días de edad infectados 24 horas antes con *Salmonella enteritidis* (PT-13^a).

Grupo	- Duodeno -	- Yeyuno -	- Ileon -	- Ciegos -
1 (Testigo -)	1,473.50±167.72 B*	904.00±175.10 C*	626.50±162.39 C*	233.25±54.55 B*
2 PECD-MNI	1,622.25±222.43 A	997.50±161.46 B	696.50±123.76 C	289.50±46.84 A
3 PECD-MNI +Se	1,573.25±175.79 AB	938.00±162.27 BC	783.79±139.58 B	284.25±59.60 A
4 (Testigo Se+)	1,583.75±105.96 A	1,163.75±126.50 A	846.36±156.25 A	290.25±58.19 A

* Valores en $\mu\text{m}\pm\text{D.E.}$ de cada columna con diferente literal (mayúscula) son estadísticamente diferentes por medio de la prueba de Tukey ($p<0.05$) $n=10$. Valores provenientes de cinco lecturas por sitio anatómico de evaluación.

Tabla 3.- Efecto de un producto de exclusión competitiva definido sobre el porcentaje de invasividad a hígado-bazo y tonsilas cecales de pollos de engorda infectados con *Salmonella enteritidis* PT-13.**

Grupo	13 días	13 días	20 días	20 días
	Hígado-Bazo	Tonsilas- cecales	Hígado-Bazo	Tonsilas- cecales
1 (Testigo -)	0/40 (0.00%) B*	0/40 (0.00%) C*	0/40 (0.00%) B*	0/40 (0.00%) C*
2 PECD-MNI	0/40 (0.00%) B	0/40 (0.00%) C	0/40 (0.00%) B	0/40 (0.00%) C
3 PECD-MNI +Se	4/40 (9.52%) A	9/40 (21.43%) B	10/40 (25.0%) A	17/40 (42.5%) B
4 (Testigo Se+)	1/40 (2.5%) A	17/40 (42.5%) A	11/40 (27.5%) A	31/40 (73.81%) A

* Valores en cada columna con diferente literal (mayúscula) son estadísticamente diferentes a través de la prueba de χ^2 ($p < 0.05$) - Valores reales de las dos réplicas presentadas por separado. Los valores dentro de paréntesis indican el porcentaje de invasión a hígado-bazo

**Pruebas efectuadas en batería: La recuperación bacteriana a partir de hígado bazo y tonsilas cecales se efectuó 24 horas después del desafío.