



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EFECTO DE UN PRODUCTO DE EXCLUSION
COMPETTIVA COMERCIAL DE TIPO DEFINIDO E
INDEFINIDO SOBRE LA INFECCION POR *Salmonella*
enterica SEROVARIEDAD *enteritidis* EN AVES
LEGHORN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

LOURDES GONZALEZ SOTO

ASESORES: MVZ MC MARCO ANTONIO JUAREZ ESTRADA
MVZ MC RUBEN MERINO GUZMAN



MEXICO, D. F.

2004



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.

DEDICATORIA

A mis Padres Ma. de Lourdes Soto Ramírez y Víctor González Ramírez por brindarme todo su amor, cariño y comprensión, por sus consejos y apoyo en todas mis decisiones ya que sin su esfuerzo no hubiera podido culminar esta etapa en mi vida, los amo. Este triunfo es de ustedes y de todo corazón Gracias...

A mi hermano Víctor por que siempre estuvo conmigo, apoyándome y resolviendo mis dudas, Te quiero mucho "osito".

A Papá Chon, Mamá Toñis y Abuelita Cuquín porque parte de este triunfo se los debo a ustedes...

A mi amiga Sonia López C. por estar conmigo cuando más la necesité, en los buenos y malos momentos, por tus consejos. Por ser mi mejor amiga... Te quiero.

A mi madre laboral Marisol Rivera H. por impulsarme a culminar mi licenciatura, por su apoyo como amiga y compañera de trabajo, te quiero Ma.

A mis amigos: Gaby Boneta, Gogo Medellín, Lilia Zarzosa, Lucy Favila, Memo Garrido, Miguelito García, por todo lo que me brindaron durante la carrera, por estar conmigo siempre.

A mi gran Amor Abel Herrera G. por todo el amor que me has dado, por darle sentido y esa chispa que le faltaba a mi vida, TE AMO.

A ti Marquito por el apoyo y cariño que me has dado, además de ser mi asesor te has convertido en un gran amigo para mí. Te quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

A ti Diosito, por que me permitiste cumplir esta meta, por todo tu apoyo, GRACIAS...

A mi Universidad Nacional Autónoma de México, por que me dio la oportunidad de llevar la camiseta PUMA.

A mi Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por todos los conocimientos que adquirí en ti. Mi segunda casa...

A toda mi familia Abuelos, Padres, Hermano, Tíos, Primos, por que gracias a ustedes cumplí mi sueño.

A mis jefes y compañeros de trabajo, MVZ. Ciro Lomelí F., M en C. Isabel Gracia M., MVZ. Marisol Rivera H., MVZ. Santiago Rojas, MVZ. Mabel Tinoco, Lic. Adriana Mandujano, EMVZ. Salvador Rivera, MVZ. Héctor Rico, MVZ. Lucía Macías y Leonel Angón, por su apoyo y consejos tanto para la realización de la tesis como para mi desarrollo profesional.

A los miembros de mi jurado, MVZ Gabriela Gómez, MVZ. José Gutierrez, MVZ. Edgar Alfonseca, MVZ. Néstor Ledesma, MVZ. Marco A. Juárez.

A mis asesores MVZ. MC. Marco Antonio Juárez Estrada y MVZ MC. Rubén Merino Guzmán, por sus consejos, apoyo y confianza para la realización de este trabajo de tesis.

A mi amiga Sonia López por su colaboración en la realización de esta tesis, además de que sin tu ayuda no hubiera obtenido mi beca.

Al Dr. José A. Quintana López y a todos los miembros del Departamento de Producción Animal: Aves por las facilidades proporcionadas para la elaboración del presente estudio.

A Teresa Olivares del DPA:AVES y a Nestor Ledesma Martínez por toda la ayuda proporcionada en los estudios previos y en este.

Agradezco el apoyo económico otorgado al programa de becas de tesis de Licenciatura (PROBETEL), especialmente a la Dra. María de Jesús Tron

Un agradecimiento especial al Ing. Alejandro Romero del grupo I.D.I.S.A y al Dr. José Luis Aviles de I.M.S.A. Tehuacán, Puebla. Sin su valiosa colaboración no se hubiera podido efectuar el presente estudio.

A mis niñas Pelusa y Totoya porque gracias a ellas reafirmé mi vocación profesional... Las amo pequeñuelas....

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MATERIAL Y METODOS.....	8
RESULTADOS.....	12
DISCUSIÓN.....	13
CONCLUSIONES.....	19
LITERATURA CITADA.....	20
TABLAS	24

RESUMEN

GONZALEZ SOTO LOURDES. Efecto de un producto de exclusión competitiva comercial de tipo definido e indefinido sobre la infección por *Salmonella enterica* serovariedad *enteritidis* en aves Leghorn (bajo la asesoría de Marco Antonio Juárez Estrada y Rubén Merino Guzmán).

Con la finalidad de evaluar la adición de un producto de exclusión competitiva de tipo definido (PECD) y uno de tipo no definido (PECND) sobre un desafío con *Salmonella enterica* serovariedad *enteritidis* fagotipo 13^a (SE PT13^a), se efectuó un experimento con aves Leghorn de un día de edad criadas en baterías eléctricas. Se utilizaron cuatro grupos de 20 pollos con tres réplicas por grupo en dos fechas de desafío. El grupo A fue el testigo negativo, no se desafío y únicamente recibió PBS al primer día y posteriormente cada uno de los días de desafío. El grupo B recibió al día de edad 1 mg de PECD/ave, el grupo C recibió en la misma fecha 12.5 mg de PECND/ave, el grupo D fue el grupo testigo positivo únicamente recibió al día de edad PBS estéril, se desafío cada fecha de evaluación. Al día 11 y 19 de edad los grupos B, C y D recibieron un desafío con SE PT13^a (1×10^8 UFC/ave). A los 12 y 20 días de edad se sacrificaron 60 aves de cada uno de los grupos evaluados, el aislamiento de SE PT13^a se realizó a partir de hígado, bazo y tonsilas cecales. La tasa de reisolamiento de SE PT13^a en el grupo B al día 20 de edad a partir de hígado y bazo mostró un porcentaje de aves positivas a SE PT13^a de 21.7%, diferente ($P < 0.05$) al grupo D el cual mostró un mayor porcentaje de invasión de SE PT13^a (51.7%) en órganos internos. No hubo diferencias en la tasa de recuperación de SE PT13^a entre los grupos desafiados en cualquiera de las dos fechas de evaluación a partir de tonsilas cecales. No se determinó ningún aislamiento de *Salmonella* spp., a partir del grupo testigo negativo. Aunque no hubo diferencia en el grado de protección a órganos internos entre el grupo que recibió el PECD y el que recibió el PECND, el grupo que recibió el PECD mostró un mayor margen de protección. Se observó que la microbiota nativa intestinal de tipo definido (MNI) tarda más de tres semanas en establecerse en el tracto intestinal, por lo cual sus efectos de protección se retrasan, éste efecto protector se observó únicamente hasta el día 20 de edad. Para complementar la evaluación del probable efecto protector por parte del PECND se requiere efectuar además de evaluaciones proporcionales, cuantificaciones de la cantidad más probable de UFC de SE PT13^a directamente a partir del contenido cecal.

INTRODUCCIÓN

La salmonela es la causa más frecuente por la cual los humanos sufren de intoxicaciones por ingerir insumos alimenticios.^{1,2} En la avicultura comercial de nuestro país es de reporte obligatorio y se encuentra en campaña permanente de erradicación.^{2,3}

Las campañas para la erradicación de *Salmonella enterica* serovariedad *gallinarum* (SG) que se han efectuado en muchas partes del mundo, incluido México han resultado un éxito.⁴ Se ha determinado que SE se mantuvo excluida de las aves comerciales durante la primera mitad del siglo XX y parte de la segunda mitad, debido principalmente a la exclusión que ejercía SG sobre SE, sin embargo, de acuerdo con las observaciones efectuadas por Rabsch *et al.*,⁴ actualmente al ocupar SE el nicho ecológico que ha dejado SG, se ha convertido en el principal agente patógeno asociado a la producción de huevo y carne de pollo.⁴

En 1984 se detecta por primera vez en el Reino Unido la presencia de SE fagotipo 4 (PT4), la cual es altamente patógena para los seres humanos.⁵ La presencia de SE PT4 se incrementó de 14,000 casos anuales en 1984 a casi 32,000 en 1991.⁵ En diciembre de 1988 la declaración de Edwina Carrie, secretaria de estado para la salud del Reino Unido, acerca de que todos los huevos de las gallinas británicas estaban contaminadas con SE PT4, lo cual no era del todo cierto, provocó la hecatombe inmediata de la avicultura comercial de ese país.⁵ En 1989 se implementó la legislación que empezó a controlar sistemáticamente la presencia de SE PT4 a través del sacrificio obligatorio de los lotes positivos. Al efectuar una evaluación del programa en 1994 se determinó que el plan de erradicación no había tenido el éxito que se esperaba ya que algunas granjas y salas de incubación aún estaban contaminadas. Por lo cual inmediatamente se implementó la vacunación de todas las parvadas. Para 1996 se determinó que la incidencia de SE PT4 disminuyó en el Reino Unido, sin embargo, actualmente el alimento se considera aún una fuente potencial de contaminación.⁵

En 1987 en Estados Unidos debido a una gran difusión de la prensa acerca del peligro potencial de contaminación de productos avícolas con salmonela, hubo una reducción inmediata sobre el consumo de cerca del 50 % de carne de pollo, reportando una pérdida a largo plazo del 10 al 20%.⁶ Las pérdidas atribuidas a la salmonelosis en los

Estados Unidos se han estimado en cerca de un billón de dólares anuales.⁶ En nuestro país no se ha estimado puntualmente ésta pérdida, sin embargo, representa un riesgo permanente para la avicultura en cuanto a productividad y como un riesgo potencial para la salud pública.^{1,2,3}

Las causas directas de este riesgo potencial se deben en gran parte a la pérdida de ingresos, al costo de tratamientos médicos, a la afección por paratifoideas como las ocasionadas por SE que pueden llegar a ser mortales en niños, ancianos y pacientes inmunocomprometidos, además de la baja productividad de las aves.^{1,6}

El impacto económico aunque no es claramente visible, no deja de ser importante. Esto se debe al hecho de que prácticamente cada ración de alimento de iniciación e incluso de engorda o crecimiento tiene un nivel incorporado permanente de antibióticos o promotores de crecimiento, los cuales aumentan el costo del alimento por tonelada.²

Si ha esto se agrega el aumento de restricciones vigentes actualmente en la legislación de muchos países de Europa y América, acerca del empleo de una gran gama de antibióticos que se habían estado utilizado como promotores de crecimiento, el problema en el control de salmonela se incrementa.^{2,6,7}

En los últimos años se ha estado explorando como alternativa a la utilización de antibióticos el empleo de métodos naturales que tienen la finalidad de combatir este tipo de patógenos.^{2,8,9,10,11,12,13}

Gran parte del conocimiento fundamentado en estas nuevas metodologías se ha basado en el empleo de bacterias lácticas, éstas tienen la propiedad de sintetizar como parte de su metabolismo sustancias que muestran actividad inhibitoria para bacterias filogenéticamente relacionadas y no relacionadas con ellas mismas.^{11,12,13,14,15}

Algunas bacterias del intestino estimulan al sistema inmune y aumentan la resistencia de las aves contra las infecciones por patógenos entéricos, la microbiota del intestino compete además eficientemente con diferentes organismos invasores que pueden ser dañinos para la salud aviar o humana, y pueden prevenir la colonización del tracto digestivo por parte de los agentes patógenos.^{2,8,9,10,12,13,14}

La MNI es una compleja y dinámica población de microorganismos que habitan normalmente el tracto digestivo de las aves domésticas en una estrecha relación de homeocinesis. En condiciones de crianza natural la MNI es adquirida por el pollito desde su eclosión a partir del medio ambiente, ésta coloniza el tracto digestivo de las aves jóvenes especialmente los sacos ciegos. La MNI impide que los microorganismos patógenos puedan multiplicarse a este nivel, este fenómeno se conoce como "Exclusión Competitiva" (EC) y fue planteado hace más de treinta años por el profesor Esko Nurmi en Finlandia.¹⁶

Esko Numi y sus colaboradores mostraron que la colonización por salmonelas en los pollitos recién nacidos, podría ser prevenida a través de la administración oral de bacterias procedentes de MNI de aves adultas.¹⁶ La propuesta de Nurmi ha sido ampliamente adoptada en diferentes países para el control de salmonelas en aves y se conoce como el concepto de Nurmi o EC.^{17,18,19,20}

El mecanismo por el cual la MNI protege a las aves contra la invasión de agentes enteropatógenos aún no se encuentra bien entendido, sin embargo, existen varias teorías para explicar este hecho, por ejemplo, se menciona la competencia por nutrientes limitantes, disminución de oxígeno disponible, competencia por receptores a nivel de mucosa intestinal, liberación de bacteriocinas y por la producción de metabolitos secundarios como los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) los que se menciona que cuando se encuentran en estado lipolítico son capaces de inhibir la invasión por enteropatógenos.^{18,19,20,21,22}

Se ha observado que al emplear cultivos bacterianos provenientes de aves adultas éstos muestran un control efectivo contra la colonización por salmonela en pollos.^{16,23,24} Aunque se desconoce la composición bacteriana de estos cultivos conocidos como indefinidos, en Alemania, Suecia y Finlandia se han estado empleando comercialmente desde hace ya más de 20 años.^{2,25} En muchos países es inaceptable el empleo de los mismos y de hecho se encuentra prohibida su utilización comercial debido a que existe la posibilidad de transmitir agentes patógenos a las aves o a los humanos, por lo cual se creó la necesidad del desarrollar cultivos bacterianos definidos inocuos que sean efectivos para el control de salmonela.^{26,27,28}

Actualmente se están desarrollando productos derivados de la tecnología, con la finalidad de encontrar organismos específicos con propósitos especializados, este avance se encuentra basado en el aislamiento de microorganismos potencialmente benéficos, los cuales son microorganismos y sustancias que contribuyen al equilibrio microbiano intestinal.¹¹ La palabra probiótico se utilizó por primera vez por Parker en 1974. El término "probiótico" se origina de dos palabras griegas que significan "por la vida" contrario al término antibiótico que significa "contra la vida".²

En las condiciones actuales de producción a gran escala, se ha observado que la MNI se desarrolla lentamente. Esto se debe en parte a que el pollito nace limpio y sin contacto con la madre.^{23,24} Por lo tanto, ha tenido poca oportunidad de adquirir su propia MNI, debido a esto las aves jóvenes son altamente susceptibles a las infecciones. Por lo cual pueden convertirse fácilmente en portadoras sanas de microorganismos indeseables como las salmonelas.^{5,16}

De forma general podemos definir a los probióticos como cultivos de microorganismos vivos (La mayor parte de ellos del tipo Lactobacilo) que colonizan el tracto intestinal de los animales que los consumen y cuya finalidad es asegurar un equilibrio normal entre las distintas poblaciones de bacterias beneficiosas que habitan el tracto digestivo, además de excluir y disminuir el número de bacterias patógenas que son de tipo enteroinvasivas.^{21,29,30}

El uso de probióticos en pollos de un día de edad para obtener la exclusión de *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., e incluso reducir la cantidad de *C. perfringens* se ha convertido en una práctica habitual a nivel de granja en Europa.^{8,9,10,11,12,13,14}

Frente a la inminente prohibición de los antibióticos en su utilización como promotores de crecimiento ésta práctica constituye una alternativa, sin embargo, ante la falta de información del grado de exclusión que se consigue con algunos probióticos de tipo comercial presentes en el continente americano, así como su papel en el rendimiento productivo, se requiere validar este tipo de productos con estudios que contemplen pruebas experimentales controladas, utilizando aves comerciales y alimento comercial en la forma que frecuentemente es empleado en México (harina), estas condiciones diferentes pueden alterar potencialmente el rendimiento de este tipo de productos que se

basan principalmente en el equilibrio de la MNI; la cual puede presentar oscilaciones en el tipo y número de microorganismos que se encuentran en el tracto digestivo de las aves, ésto de acuerdo a variables como son, las aves empleadas, el tipo, calidad y cantidad de los ingredientes empleados, además de considerar un diseño experimental bajo condiciones controladas en unidades de aislamiento. Condiciones diferentes a las que se han reportado en la validación de este tipo de productos.

HIPÓTESIS

- La administración profiláctica de un producto de exclusión competitiva comercial de tipo definido y un producto de tipo indefinido disminuirán la infección por *Salmonella enterica* serovariedad *enteritidis* en aves Leghorn.

OBJETIVOS

- Evaluar el efecto de la administración profiláctica de un producto de exclusión competitiva comercial de tipo definido y la de un producto de exclusión competitiva comercial de tipo indefinido sobre la infección de hígado y bazo con *Salmonella enterica* serovariedad *enteritidis* en aves Leghorn infectadas experimentalmente.

- Determinar el efecto de la administración profiláctica de un producto de exclusión competitiva comercial de tipo definido y un producto de tipo indefinido sobre la disminución de *Salmonella enterica* serovariedad *enteritidis* en tonsilas cecales de aves Leghorn infectadas experimentalmente.

- Comparar el grado de eficiencia de exclusión competitiva sobre *Salmonella enterica* serovariedad *enteritidis* entre un producto de exclusión competitiva comercial de tipo definido y un producto de exclusión competitiva comercial de tipo indefinido en aves Leghorn.

- Verificar el periodo óptimo de establecimiento de un producto de exclusión competitiva comercial de tipo definido y un producto de tipo indefinido en el tracto gastrointestinal de aves Leghorn desafiadas experimentalmente con *Salmonella enterica* serovariedad *enteritidis*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales de experimentación.- Se emplearon aves Leghorn (Babcock B-300) de un día de edad, obtenidas de una incubadora comercial, fueron alojadas en baterías eléctricas de 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 mantuvieron en condiciones de manejo y bienestar de acuerdo con la NOM-069-ZOO-1999, se alimentaron con una dieta isocalórica e isoproteica de acuerdo con las necesidades especificadas para su edad (tablas del NRC-USA; 1994), no se adicionó ningún tipo de antibiótico en el alimento, se les proporcionó agua potable *ad libitum*. A su arribo a las instalaciones y con la finalidad de descartar la posible presencia de *Salmonella* spp., se tomaron como muestra 10 aves completas, 100 gramos de la cama de transporte, 250 gramos del alimento y 250 ml del agua que se proporcionó durante todo el estudio, a estas muestras se les efectuó un estudio bacteriológico de acuerdo con la NOM-005-ZOO-1993.

Inóculo.- Para el desafío se utilizó una cepa de SE PT13^a, proveniente del *National Veterinary Services Laboratory* en Ames, Iowa; obtenida a través del *United States Department of Agriculture* (USDA) en College Station, Texas-USA.

Esta cepa es capaz de multiplicarse en presencia de ácido Nalidíxico (NA) y Novobiocina (NO). Con la finalidad de inhibir el crecimiento de otras bacterias que no fueran la cepa de referencia empleada, el medio utilizado para su cultivo contenía 200 µg/ml de NA y 25 µg/ml de NO. El inóculo de SE PT13^a fue estandarizado por espectrometría en solución amortiguada de fosfatos estéril (PBS). La dosis de desafío administrada a cada ave fue de 1×10^8 unidades formadoras de colonia (UFC) contenidas en 250 µl. La concentración óptima del inóculo se determinó mediante el conteo de UFC a partir de las últimas cuatro diluciones procedentes de ocho diluciones décuples seriadas del inóculo original, se sembraron en placas de agar verde brillante conteniendo las dosis de NA y NO referidas anteriormente. Con la finalidad de constatar la cantidad administrada, a partir del inóculo original se efectuaron ocho diluciones décuples seriadas, las últimas cuatro diluciones se sembraron en placas de petri con medio enriquecido triptosa soya agar sangre (TSAA). El desafío se efectuó *per os*. A las aves testigo negativo en cada desafío únicamente se les proporcionó PBS estéril.

Productos de exclusión competitiva.- El producto de exclusión competitiva de tipo definido comercial (PECD) empleado en el presente estudio está compuesto por una mezcla de bacterias anaerobias facultativas y obligadas. Los fabricantes describen que para la elaboración de este probiótico se han obtenido 32 cultivos puros diferentes a partir de MNI proveniente de aves adultas libres de patógenos específicos (LPE), estos cultivos ya han sido caracterizados. Los aislamientos constan de 22 tipos de bacilos y cocos que representan cinco géneros y diez tipos de bacilos anaerobios facultativos y cocos que representan tres géneros. Algunas bacterias que lo componen son *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., *Bacteroides* spp., *Bacillus* spp., *Fusobacterium* spp., *Eubacterium* spp., *Propionibacterium* spp., y cocos anaerobios Gram positivos.¹⁸ El fabricante garantiza que el PECD está completamente libre de cualquier organismo formador de esporas, contiene una cuenta bacteriana de 1×10^{10} bacterias por gramo de polvo liofilizado. A cada ave del grupo de tratamiento con el PECD se les administró 1 mg de PECD al día uno de edad *per os*.

El producto de exclusión competitiva comercial de tipo indefinido (PECND) está compuesto de MNI proveniente de aves LPE. El fabricante menciona que esta microbiota se encuentra integrada por microorganismos de los géneros *Bacteroides* spp., *Citrobacter* spp., *Clostridium* spp., *Escherichia* spp., *Enterococcus* spp., *Eubacterium* spp., *Fusobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Propionibacterium* spp., *Ruminococcus* spp., *Streptococcus* spp., y otros no identificados aún.³¹ A cada una de las aves del grupo de tratamiento correspondiente al PECND se les administraron 12.5 mg del producto de exclusión competitiva al día uno de edad *per os*.

Diseño experimental.- Para la determinación de la variable de respuesta (grado de invasión por SE PT13^a a hígado, bazo y tonsilas cecales) se asignaron 480 aves en 4 grupos de 20 pollos con tres réplicas cada uno, las aves fueron desafiadas en dos fechas. Para la asignación de la variable explicativa se diseñó el siguiente arreglo que únicamente contempló el análisis de un factor (Tipo de probiótico: definido o indefinido). Grupo A (testigo negativo) al día uno de edad a las aves de este grupo se les administró únicamente PBS estéril, no recibieron ningún tipo de desafío, tres réplicas se sacrificaron a los 12 días de edad y otras tres réplicas al día veinte de edad. Grupo B, al día uno de edad a las aves se le administró el PECD *per os*, tres réplicas se desafiaron con SE PT13^a a los 11 días de edad y otras tres réplicas al día 19 de edad. Veinticuatro horas

posteriores a la administración de SE PT13^a las réplicas desafiadas se sacrificaron. Grupo C, al día uno de edad a las aves se le administró el PECND *per os*, tres réplicas se desafiaron con SE PT13^a a los 11 días de edad y otras tres réplicas al día 19 de edad. Veinticuatro horas posteriores a la administración de SE PT13^a las réplicas desafiadas se sacrificaron. Grupo D (control positivo) al día de edad únicamente se les administró PBS estéril *per os* tres réplicas se desafiaron con SE PT13^a a los 11 días de edad y otras tres réplicas al día 19 de edad. Posteriormente 24 horas después de la administración de SE PT13^a las réplicas desafiadas se sacrificaron.

DISEÑO EXPERIMENTAL				
Grupo	Tratamiento	Vía de aplicación	Desafío	Sacrificio
A (Testigo -)	0.25 ml/ave de PBS	Oral 1 día de edad	0.25 ml/ave de PBS al día 11 y 19 de edad	A los 12 y 20 días de edad.
B (probiótico definido)	1 mg/ave producto de EC/ 0.25 ml	Oral 1 día de edad	0.25 ml/ave con 1×10^8 ufc de SE PT13 ^a al día 11 y 19 de edad	A los 12 y 20 días de edad.
C (probiótico indefinido)	12.5 mg/ave producto de EC/ 0.25 ml	Oral 1 día de edad	0.25 ml/ave con 1×10^8 ufc de SE PT13 ^a al día 11 y 19 de edad	A los 12 y 20 días de edad.
D Testigo (+)	0.25 ml/ave de PBS	Oral 1 día de edad	0.25 ml/ave con 1×10^8 ufc de SE PT13 ^a al día 11 y 19 de edad	A los 12 y 20 días de edad.

Ejecución del diseño experimental.- Veinticuatro horas post-desafío con SE PT13^a, las aves procedentes de cada grupo fueron sacrificadas por medio de 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).³² A partir de cada ave se obtuvo de manera aséptica una

muestra de hígado, bazo y tonsilas cecales, las cuales se sembraron por separado como muestra combinada (hígado-bazo) y tonsilas cecales en 10 ml de caldo tetratonato.[‡] Las muestras se incubaron durante 24 horas a 37°C.^{26,33} Después de la incubación el caldo fue sembrado en cajas de petri con agar verde brillante (AGV) a las cuales previamente se les agregó 200 µg/ml de NA y 25 µg/ml de NO, las cajas se incubaron durante 24 horas a 37°C, posteriormente las cajas se examinaron en busca de colonias lactosa negativas características de SE PT13^a resistente al NO y NA. De las colonias lactosa negativa se seleccionó el 10 % de muestras para su serotipificación con antisueros comerciales[®].^{26,33}

Análisis estadístico.- La variable de respuesta (porcentaje de aves positivas a la infección con SE PT13^a) se evaluó a través de la prueba de Ji-cuadrada con un grado de significación estadística para alfa respecto a la unidad de 5 %.³⁴

[‡] Difco®, Ann Arbor, MI. U.S.A.

[®] Difco®, Laboratories, Detroit, MI. 48232-7058 U.S.A.

RESULTADOS

No se logró aislar *Salmonella* spp., de la cama de transporte, agua, pollitos o alimentos empleados en el presente estudio.

La verificación de la cantidad de UFC efectuada a partir de las últimas cuatro diluciones de las ocho efectuadas originalmente procedentes del inóculo estandarizado dieron un conteo cercano $\pm 10\%$ de $1 \times 10^8 / 0.25$ ml.

Al día 12 de edad con relación al grupo testigo positivo no se observó inhibición en el porcentaje de invasibilidad a hígado-bazo y tonsilas cecales de SE PT13^a por parte de los dos productos de exclusión competitiva comercial empleados. No hubo crecimiento de *Salmonella* spp., a partir del grupo testigo negativo (Tabla 1).

Al día 20 de edad, el grupo que recibió el PECD mostró el mayor porcentaje de inhibición en la infección a hígado-bazo de SE PT13^a, porcentaje que fue diferente ($p < 0.05$) al observado en el grupo testigo positivo (Tabla 2). El grupo del PECND, no fue diferente con relación a cualquiera de estos dos grupos (Tabla 2). No hubo crecimiento de *Salmonella* spp., en el grupo testigo negativo (Tabla 2).

Al día 20 de edad, no hubo diferencia estadística en el porcentaje de aislamientos de SE PT13^a a partir de tonsilas cecales entre cualquiera de los grupos desafiados (Tabla 2).

Las muestras provenientes de los grupos desafiados, probables de contener *Salmonella* spp., fueron verificadas por medio de pruebas bioquímicas con base en triple azúcar y hierro, se determinó que el 100% correspondía a *Salmonella* spp., móvil, al efectuarse la serotipificación a partir de las mismas muestras, éstas correspondieron a *Salmonella enterica* serovariedad *enteritidis* (grupo D1; O:1,9,12; H:g,m).^{3,4,6}

DISCUSIÓN

Actualmente en la avicultura comercial existen dos problemáticas fuertes, por un lado hay una fuerte oposición en Europa, Estados Unidos de Norteamérica y el resto del mundo (WHO; Organización Mundial de la Salud) de seguir empleando los antibióticos como promotores de crecimiento a dosis sub-terapéuticas.^{2,7} La segunda es que la presencia de SE en la avicultura comercial se ha incrementado paulatinamente,^{4,5} lo cual puede conducir a una situación de peligro permanente para el ser humano, por lo cual para su control se deben evaluar las medidas más efectivas, inocuas y ecológicamente más convenientes, una alternativa para ello es el empleo del concepto "Nurmi" o de EC.^{10,12}

En el presente estudio se evaluaron dos tipos de probióticos uno de tipo definido y otro de tipo indefinido. Lo que se observó es que el PECD fue más efectivo para excluir SE PT13^a, sin embargo, se debe considerar que ésta acción de exclusión se obtuvo favorablemente hasta los 20 días de edad. Estos resultados son similares a los obtenidos por Schneitz *et al.*,¹⁸ estos investigadores observaron que al administrar a las aves de un día de edad una dosis idéntica del mismo PECD empleado en el presente estudio, estos investigadores observaron un buen grado de protección frente a la infección con salmonela hasta el día 19 de edad, las aves con el PECD mostraron en promedio únicamente 0.4 log₁₀ UFC/g de contenido cecal, el cual fue menor y diferente al presente en las aves testigo,¹⁸ las cuales no recibieron el PECD al día de edad (2.9 log₁₀ UFC/g de contenido cecal), y fueron desafiadas al día 15 de edad con una dosis alta de *S. enterica* serovariedad *infantis* (6 x 10⁷ UFC/ave).¹⁸ En el presente estudio el grupo que recibió el PECD al día 13 de edad mostró disminución de la invasión de SE PT13^a a sacos ciegos, misma tendencia que se observó en la infección de hígado y bazo, sin embargo, no hubo diferencia estadística respecto al grupo testigo. Mientras que en el estudio de Schneitz *et al.*,¹⁸ al administrar a las aves al día de edad una dosis idéntica del mismo PECD empleado en el presente estudio, lograron determinar un grado de protección favorable en una fecha temprana como fue al día 7 de edad, y aunque las aves mostraron cantidades elevadas de *S. enterica* serovariedad *infantis* con relación a las cantidades observadas durante el mismo experimento en una evaluación efectuada posteriormente al día 19 de edad, Schneitz *et al.*,¹⁸ lograron determinar diferencia estadística entre el grupo experimental y el grupo testigo, ya que las aves que recibieron el PECD mostraron en

promedio $2.6 \log_{10}$ UFC/g de contenido cecal, menor al determinado en las aves testigo que no recibieron el PECD al día de edad ($7.2 \log_{10}$ UFC/g de contenido cecal), y que fueron desafiadas junto con el grupo testigo al día 5 de edad con una dosis media (5.0×10^4 UFC/ave) de *S. enterica* serovariedad *infantis*.¹⁸

A pesar de la similitud de los resultados observados en el presente estudio con los obtenidos por Schneitz *et al.*,¹⁸ en un estudio efectuado por Orenca *et al.*,³⁵ donde emplearon como medio de evaluación la cantidad de UFC por gramo de contenido cecal, ellos determinaron que el mismo tipo de PECD empleado en el presente estudio fue poco eficaz cuando lo compararon con la acción del mismo tipo de PECND empleado en el presente estudio. Estos investigadores determinaron que el grupo suplementado con el PECND presentó menor cantidad de salmonela en contenido cecal ante un desafío con 3×10^4 UFC/ave de SE ($0.48 \log_{10}$ UFC/g de contenido cecal) que el presentado por el PECD ante el mismo tipo de desafío ($5.73 \log_{10}$ UFC/g de contenido cecal), mientras que el grupo control positivo presentó $7.44 \log_{10}$ UFC de SE/g de contenido cecal evaluado. Por otra parte, al efectuar Orenca *et al.*,³⁵ la evaluación proporcional de manera similar a la efectuada en el presente estudio, encontraron que aún cuando los dos productos evaluados ejercen una reducción en el número de aves infectadas por SE (PECND con 9/30 aves (30.0%); PECD 8/30 aves (26.7%) éstas no fueron diferentes estadísticamente al grupo control positivo (11/30 aves (36.7%)). Lo cual proporcionalmente indica que los resultados obtenidos por Orenca *et al.*,³⁵ fueron parecidos a los encontrados en la fecha análoga al primer experimento del presente estudio, considerando que ellos efectuaron su evaluación a los 9 días de edad, mientras que en el presente estudio la evaluación fue realizada tres días después, fecha en la cual se determinó que la proporción de aves positivas a SE PT13^a en hígado-bazo presenta una tendencia de mejor funcionamiento por parte del PECND, pero no en el número de las aves positivas a SE PT13^a en tonsilas cecales, el cual fue similar al del grupo suplementado con el PECD.

Aunque el PECND mostró una tendencia de protección a los 12 días de edad, nunca fue diferente al grupo testigo positivo. Esta baja efectividad aparente para excluir la SE PT13^a por parte del PECND fue debida posiblemente a un establecimiento inadecuado de la MNI en sacos ciegos, aún cuando existen autores como Nurmi y Rantala¹⁶ que reportan una adecuada resistencia de pollitos de engorda de un día de edad a la infección

de *Salmonella enterica* serovariedad *infantis*, dentro de un periodo de 24 horas posteriores a la administración de contenido intestinal proveniente de aves adultas.

Nurmi y Rantala¹⁶ determinaron que aunque algunas aves fueron infectadas después del desafío oral, la cantidad de *Salmonella enterica* serovariedad *infantis* en el ciego fue de 1×10^2 a 1×10^3 UFC por gramo de contenido cecal en lugar de 1×10^6 a 1×10^9 observados en las aves que no recibieron la MNI proveniente de las aves adultas. En el presente trabajo se mostró una tendencia semejante ya que los aislamientos a partir de tonsilas cecales fueron menores en los dos grupos que recibieron los dos tipos de probióticos, esto con relación al grupo testigo positivo, lo cual indica una tendencia en la disminución de la colonización por SE PT13^a en esta parte del tracto intestinal.

Una diferencia del presente estudio con relación al trabajo de Nurmi y Rantala¹⁶ fue que en las evaluaciones del día 12 y 20 se determinó el número de aves positivas a SE PT13^a y no la cantidad de UFC de SE PT13^a en el contenido de sacos ciegos, aún cuando esta metodología se encuentra avalada por diferentes investigadores;^{20,22,23,26,27,28,33,35} si se logrará complementar con análisis directos a partir de contenido cecal es factible que se enriquezca el conocimiento proporcionado por este tipo de estudios.

A los 12 días de edad el probiótico indefinido permitió una menor invasión a órganos internos (36.7%) por parte de SE PT13^a, ésto en comparación al grupo testigo positivo (45%), sin embargo, no hubo diferencia estadística en esta fecha. Nakamura *et al.*,³¹ al administrar el mismo tipo de PECND empleado en el presente estudio a pollos de un día de edad y desafiarlos 6 horas después con SE (7.5×10^6 UFC/ave) determinó que aunque el PECND no lograba reducir por completo la eliminación de SE en heces si mostraba diferencia respecto al grupo testigo, aunque esta diferencia pudo ser verificada únicamente hasta los 14 días post-administración del PECND, dos días después de la primera evaluación efectuada en el presente estudio. La diferencia de los resultados de Nakamura *et al.*,³¹ respecto a los observados en el presente estudio fue posiblemente la metodología empleada por Nakamura *et al.*,³¹ ya que las evaluaciones para determinar la presencia de SE las efectuaron a partir de hisopos cloacales mientras que en el presente estudio se realizaron por medio de la recuperación cualitativa de SE PT13^a a partir de órganos internos y tonsilas cecales. Lo cual posiblemente posee un mayor potencial para

el crecimiento exponencial de una probable pequeña cantidad de UFC que pudiera estar presentes en los órganos internos o bien en las tonsilas cecales del grupo con el PECND.

Si bien Nakamura *et al.*,³¹ efectuaron también la recuperación de salmonela a partir de los órganos internos al día 22 de edad, no encontraron diferencia en el contenido de SE entre el grupo tratado con el PECND y el grupo control positivo. Éstos resultados se encuentran acordes con los del presente estudio, donde el PECND mostró una ligera disminución en la colonización de los órganos internos aunque no fue diferente estadísticamente al grupo control positivo, mientras que el PECD si lo fue. Curiosamente el PECND muestra la misma tasa de invasión a órganos internos en las dos fechas evaluadas, en tanto que el PECD muestra una mejora en el grado de protección lo cual muestra un avance progresivo en el grado de establecimiento de esta MNI, ya que mientras a los 12 días de evaluación no mostró diferencia estadística respecto al control positivo, al día 20 de edad si se logró observar esta diferencia. Lo cual coincide con lo observado por Barnes *et al.*,²⁴ quienes determinaron que el establecimiento completo de la MNI en el tracto gastrointestinal ocurre entre las 3 y 6 semanas de vida del ave y que el establecimiento de la MNI puede depender de las condiciones de crianza y alimentación.

En otro estudio efectuado por Methner *et al.*,¹⁹ al administrar a aves Leghorn LPE de un día de edad el mismo tipo de PECND empleado en el presente estudio, a diferencia de los resultados obtenidos en el presente trabajo, ellos observaron que el probiótico indefinido funcionaba eficientemente al reducir la cantidad de SE al día 9 ($3.9 \log_{10}$ UFC/g de contenido cecal), 22 ($3.9 \log_{10}$ UFC/g de contenido cecal) y 48 de edad ($1.4 \log_{10}$ UFC/g de contenido cecal), los cuales fueron diferentes con relación a cada uno de sus respectivos grupos testigos evaluados en las mismas fechas (8.7 ; 7.2 y $4.3 \log_{10}$ UFC/g de contenido cecal).¹⁹

Si bien existen diferentes autores que mencionan un grado de protección alto por parte de los probióticos de tipo indefinido,^{19,31,35} su utilización representa un riesgo permanente, ya que al no encontrarse caracterizados los microorganismos que lo integran éstos puede dar origen a un problema infeccioso, además la variabilidad de sus resultados es alta debido a su composición heterogénea.

En algunos estudios se ha determinado que algunos PECND que contienen uno, dos o hasta tres microorganismos bien definidos, aunque aparentemente llegan a mostrar cierto grado de protección ante la colonización por SE o *Salmonella* spp., ésta no ha mostrado ser tan buena como la que proporcionan los PECND. Por ejemplo Pascual *et al.*,¹¹ al emplear un solo microorganismo definido (*Lactobacillus salivarius*) determinaron que a pesar de ser efectivo en la EC de SE, este microorganismo benéfico no llegó a colonizar adecuadamente a todas las aves durante todo el tiempo que tarda la crianza y producción.¹¹ Recomendando un suministro continuo de dosis de *L. salivarius* durante todo este periodo. Medida no muy práctica para las condiciones de explotación existentes en México. Sin embargo, algunos otros investigadores como Nisbet *et al.*,^{20,26} al emplear una mezcla de microorganismos benéficos definidos lograron obtener excelentes resultados sobre la EC de SE, SG y ST, con una sola aplicación. Aunque este producto se comercializa actualmente en Estados Unidos de Norteamérica bajo el nombre comercial de Preempt®, resulta aún demasiado caro para el mercado mexicano.

Actualmente existen pocos trabajos de investigación que evalúen los productos de exclusión competitiva de tipo definido e indefinido presentes en el mercado Mexicano.² En el presente estudio se pudo determinar que el PECND presenta cierto grado de protección, sin embargo, éste no fue suficiente. Mientras que el PECND si mostró un amplio grado de protección. La dosis empleada para el PECND recomendada por el fabricante es casi diez veces mayor a la recomendada por el fabricante del PECND. A pesar de que la dosis recomendada del PECND se encuentra establecida con base en las investigaciones del fabricante, es recomendable evaluar dosis más altas para determinar si es posible un establecimiento más temprano de la MNI, ya que en la primer fecha de evaluación del presente estudio, aunque se observa una disminución en la colonización de SE a tonsilas cecales, no se observó diferencia respecto al grupo testigo positivo en cuanto a invasión de órganos internos.

Existen diferentes trabajos que evalúan la acción específica de un probiótico frente a la acción de otro, por lo cual de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio y los obtenidos por Schneitz & Hakkinen,³⁶ es recomendable evaluar siempre el probiótico que se piensa utilizar en la práctica diaria, ya que éste puede mostrar un comportamiento diferente al esperado y observado bajo otras condiciones de evaluación.

Aunque el establecimiento de la infección por SE PT13^a después del desafío no fue excluida por completo incluso aún por el PECD, la cantidad de aves positivas y posiblemente también la cantidad de SE PT13^a en contenido cecal fue menor al grupo positivo. Lo cual desde el punto de vista epidemiológico es muy importante, ya que contribuye a disminuir la difusión de SE viables de aves tratadas con productos de exclusión competitiva a aves no infectadas.³⁵

La variación de los resultados encontrados en el presente estudio en cuanto al grado de protección contra SE PT13^a por parte de cada uno de los dos productos evaluados y los resultados encontrados en diferentes estudios efectuados por otros investigadores, puede deberse a diferencias en la metodología experimental empleada, tales como los procedimientos de dosificación, métodos de administración, fechas de evaluación y también posiblemente a variaciones intrínsecas de los productos de EC empleados, factores como la proporción de MNI anaeróbica y aeróbica, efectividad de la MNI para efectuar una adecuada EC, factores presentes en el alimento o el agua, o bien la viabilidad o fecha de caducidad del producto.

Se debe considerar que en la industria avícola la EC constituye únicamente un elemento más de control contra la salmonelosis. En el presente estudio la EC no elimina por completo la colonización de los sacos ciegos ni la invasión a órganos internos, por lo cual se debe investigar más acerca de la implementación de medidas integrales que incluyan estrategias de control de salmonelosis que consideren varios factores al mismo tiempo.¹⁰ Algunas propuestas han sido la combinación de productos de EC con antibióticos como la evaluada por Soe *et al.*,³⁷ o bien el empleo de vacunas de salmonela junto con productos como el PECND empleado en el presente estudio y que evaluó Methner *et al.*,¹⁹ estudios que hasta hoy en día han dado resultados prometedores.¹⁰

Los resultados del presente estudio muestran que el tratamiento con probióticos a aves Leghorn de un día de edad no logra excluir por completo la presencia de SE PT13^a en órganos internos o bien en tonsilas cecales, sin embargo, si disminuyen la presencia de SE PT13^a en las aves que recibieron el tratamiento con un producto de EC. El tratamiento con el PECD proporciona mejor protección en las aves contra la infección por SE PT13^a a órganos internos que el tratamiento con PECND, aunque ésta protección solo se observó a las tres semanas post-tratamiento.

CONCLUSIONES

- El probiótico comercial de tipo definido disminuye significativamente la infección experimental con *Salmonella enterica* serovariedad *enteritidis* en hígado y bazo de aves Leghorn al día 20 de edad.

- El probiótico comercial de tipo indefinido no disminuyó significativamente la infección experimental de *Salmonella enterica* serovariedad *enteritidis* a hígado y bazo, ni la colonización de tonsillas cecales en aves Leghorn a los 12 ó 20 días de edad.

- La microbiota nativa intestinal contenida en un probiótico comercial de tipo definido se encuentra establecida favorablemente en el tracto gastrointestinal de aves Leghorn al día 20 de edad.

LITERATURA CITADA

- 1.- 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.
- 2.- Juárez EMA, Nava MG, Ledesma MN, Merino GR, Téllez 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.
- 3.- 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.
- 4.- Rabsch W, Hargis BM, Tsolis RM, Kingsley RA, Hinz KH, Tschäpe, Bäumlér AJ. Competitive exclusion of *Salmonella enteritidis* by *Salmonella gallinarum* in poultry. *Emerging Infectious Diseases*. 2000;6:443-448.
- 5.- Gooderjam KR. Salmonellas: outbreaks in United Kingdom. *Filières Avicoles*. 1997;2:83-86.
- 6.- Mishu B, Koehler J, Lee LA, Rodríguez D, Brenner FH, Blake P, Tauxe V. Outbreaks of *Salmonella enteritidis* infections in the United States, 1985-1991. *J. Infect. Dis.* 1994;169:547-552.
- 7.- WHO. Report of a WHO Consultation in Gena, Germany, 1998. Oct. 5-8.
- 8.- Kaur IP, Chopra K, Saini A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European of Pharmaceutical of Sciences*. 2002;15:1-9.
- 9.- Holzapfel WH, Scillinger U. Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*. 2002; 35: 109-116.
- 10.- Bomba A, Nemcová R, Mudroňová D, Guba P. The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. *Trends in Food Sci & Technol*. 2002;13:121-126.
- 11.- Pascual M, Hugas M, Badiola JI, Monfort JM, Garriga M. *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella enteritidis* colonization in chickens. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999;65:4981-4986.

- 12.- 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.
- 13.- 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.
- 14.- Saarela M, Mogensen G, Fondén R, Mättö J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: functional technological properties. *Journal of Biotechnology* 2000; 84: 197-215.
- 15.- 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 an comparison with bacteria in the cecum. *FEMS Microbiology Ecology*. 2002; 1376:1-9.
- 16.- Nurmi EV, Rantala M. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature*. 1973;241:210.
- 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.- Schneitz C, Kiiskinen T, Toivonen V, Näsi M. Effect of Broilact® on the physicochemical conditions and nutrient digestibility in the gastrointestinal tract of broilers. *Poult Sci*. 1998;77:426-432.
- 19.- Methner U, Barrow PA, Martin G, Meyer H. Comparative study of the protective effect against *Salmonella* colonization in newly hatched SPF chickens using live, attenuated *Salmonella* vaccine strains, wild-type *Salmonella* strains or a competitive exclusion product. *Int Journal of Food Microb*. 1997;35:223-230.
- 20.- Nisbet DJ, Tellez G, Lowry V, Anderson R, Garcia G, Nava G, Kogut M, Corrier D, Stanker L. Effect of commercial competitive exclusion culture (Preempt®) on mortality and horizontal transmission of *Salmonella gallinarum* in broiler chicks. *Avian Dis*.2001;42:651-656.
- 21.- Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Shortt C, Salminen S. Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal* 1999;9:43-52.
- 22.- Nava MG, Juárez EMA, Téllez IG. Efecto de una dieta adicionada con un oligosacárido sintético comercial sobre los cambios morfológicos, de pH en el ciego e invasión a órganos por *E. coli* y *Salmonella enteritidis* en pollos de engorda de un día de edad. *Memorias de la XXIV Convención anual ANECA*; 1999 mayo 5-8; León (Guanajuato) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 1999:200-203.

- 23.- Snoeyenbos GH, Weinack MO, Smyser FC. Further studies on comparative exclusion for controlling salmonellae in chicks. *Avian Dis* 1979;23:904-914.
- 24.- Barnes EM, Impery CS, Cooper MD. Manipulation of the crop and intestinal flora of the newly hatched chick. *Clin Nutr* 1980;33:2426-2433.
- 25.- 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.
- 26.- Nisbet DJ, Corrier DE, Scanlan CM, Hollister AG, Beier RC, DeLoach JR. Effect of dietary lactose and cell concentration on the ability of a continuous-flow-derived bacterial culture to control *Salmonella* cecal colonization in broiler chickens. *Poult Sci.* 1994; 73:56-62.
- 27.- Téllez IG, Petrone GV, Escorcía SM, Rosario CC, Nava MGM, Juárez EMA, Velasco X, Calderón N, Morishta 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, AC, 2000:344-349.
- 28.- 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.
- 29.- Macfarlane GT, Cummings JH. Probiotics and prebiotics: can regulate the activities of intestinal bacteria benefic health?. *British Med J* 1999; 318: 999-1003.
- 30.- Roberfroid MB. Prebiotics and probiotics: are they functional foods?. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 1682-1687.
- 31.- Nakamura A, Ota Y, Mizukami A, Ito T, Ngwai B, Adachi Y. Evaluation of Aviguard, a commercial competitive exclusion product for efficacy and after-effect on the antibody response of chicks to *Salmonella*. *Poult Sci.* 2002;81:1653-1660.
- 32.- 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.
- 33.- Aguilar CMD. Efecto de un producto de exclusión competitiva sobre la morfología intestinal y grado de exclusión de *Salmonella enteritidis* en pollos de engorda. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 2003.

- 34.- Montgomery DC. Design and analysis of experiments. John Wiley & Sons, Inc. Belmont, CA, 1991: 45-81.
- 35.- Orenca MB, Vizmanos MFC, Padilla MA. Efficacy of two preparations for controlling cecal colonization of *Salmonella* by competitive exclusion in broiler chicks. *Phillipp. J. Vet. Med.* 2001;38:75-78.
- 36.- Schneitz C, Hakkinen M. Comparison of two different types of competitive exclusion products. *Letters in Applied Microbiology.* 1998;26:338-341.
- 37.- Soe KH, Holt PS, Gast RK, Hofacre CL. Combined effect of antibiotic and competitive exclusion treatment on *Salmonella enteritidis* fecal shedding in molted laying hens. *Journal of Food Protection.* 2000;63:545-548.

Tabla 1.- Efecto de un producto de exclusión competitiva comercial definido e indefinido sobre el porcentaje de invasibilidad a hígado-bazo y tonsilas cecales de aves Leghorn infectadas con *Salmonella enterica* serovariedad *enteritidis* PT-13^a al día 11 de edad.

Grupo	12 días* Hígado-Bazo	12 días* Tonsilas- cecales
A (Testigo -)	0/60 (0.00%) ^b	0/60 (0.00%) ^b
B Probiótico Definido	30/60 (50.0%) ^a	41/60 (68.3%) ^a
C Probiótico Indefinido	22/60 (36.7%) ^a	41/60 (68.3%) ^a
D (Testigo +)	27/60 (45.0%) ^a	51/60 (85.0%) ^a

* Los valores dentro del paréntesis indican el porcentaje de invasión a hígado-bazo o tonsilas cecales. Valores en cada columna con diferente literal son estadísticamente diferentes a través de la prueba de χ^2 ($p < 0.01$).

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

Tabla 2.- Efecto de un producto de exclusión competitiva comercial definido e indefinido sobre el porcentaje de invasibilidad a hígado-bazo y tonsilas cecales de aves Leghorn infectadas con *Salmonella enterica* serovariedad *enteritidis* PT-13^a al día 19 de edad.

Grupo	20 días* Hígado-Bazo	20 días* Tonsilas- cecales
A (Testigo -)	0/60 (0.00%) ^c	0/60 (0.00%) ^b
B Probiótico Definido	13/60 (21.7%) ^b	43/60 (71.7%) ^a
C Probiótico Indefinido	22/60 (36.7%) ^{ab}	50/60 (83.3%) ^a
D (Testigo +)	31/60 (51.7%) ^a	52/60 (86.7%) ^a

* Los valores dentro del paréntesis indican el porcentaje de invasión a hígado-bazo o tonsilas cecales. Valores en cada columna con diferente literal son estadísticamente diferentes a través de la prueba de χ^2 ($p < 0.01$).

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