



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

EVALUACIÓN DE UN SIMBIÓTICO PARA MEJORAR
LA EFICIENCIA ALIMENTICIA Y LA PREVENCIÓN
DE INFECCIONES EN POLLOS DE ENGORDA
(Gallus gallus domesticus)

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

Blanca Zuamí Villagrán de la Mora

La Paz, Baja California Sur, marzo de 2020.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 24 del Mes de febrero del 2020, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"EVALUACIÓN DE UN SIMBIÓTICO PARA MEJORAR LA EFICIENCIA ALIMENTICIA Y LA PREVENCIÓN DE INFECCIONES EN POLLOS DE ENGORDA (*Gallus gallus domesticus*)"


Presentada por el alumno:

Blanca Zuamí Villagrán de la Mora

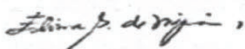
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



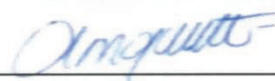
Dra. Angélica Villarruel López
Director/Co-Director de Tesis



Dra. Elvira González de Mejía
Co-Tutor



Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Co-Director/Co-Tutor



Dra. Karla Janette Nuño Anguiano
Co-Tutor


Carlos Angulo (Mar 2, 2020)

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Co-Tutor

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

Conformación de comités

Comité tutorial

Dra. Angélica Villarruel López
Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías
Co-Director de Tesis

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Director de Tesis

Dra. Elvira González de Mejía
University of Illinois
Co-Tutor

Dra. Karla Janette Nuño Anguiano
Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Tonalá
Co-Tutor

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Tutor

Comité revisor de tesis

Dra. Angélica Villarruel López
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Dra. Elvira González de Mejía
Dra. Karla Janette Nuño Anguiano
Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez

Jurado de examen

Dra. Angélica Villarruel López
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Dra. Elvira González de Mejía
Dra. Karla Janette Nuño Anguiano
Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez

Suplentes

Dra Thelma Rosa Castellanos Cervantes
Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra

Resumen

La industria avícola tradicionalmente ha hecho uso de antibióticos para obtener mayores rendimientos de producción y control de microorganismos patógenos, sin embargo, su uso ha sido asociado a efectos nocivos. Encontrar tratamientos alternativos que permitan obtener resultados similares a los antibióticos es indispensable, por lo que objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de un simbiótico sobre la eficiencia productiva, la microbiota y la estructura del intestino y órganos linfoides de pollos de engorda infectados con *Salmonella* Typhimurium y *Clostridium perfringens*.

Los pollos fueron divididos en ocho tratamientos: Control; Simbiótico; Simbiótico + *S. Typhimurium*; Simbiótico + *C. perfringens*; Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens*; *S. Typhimurium*; *C. perfringens*; *S. Typhimurium* + *C. perfringens*. El simbiótico se administró el primer día de vida y los patógenos el 17. El bioensayo duró seis semanas, con seis muestreos con tres réplicas cada uno. Después de medir los parámetros zootécnicos, los pollos fueron sacrificados y eviscerados, tomando muestras para análisis microbiológicos e histológicos.

No hubo diferencias significativas en la ganancia de peso, ingesta y conversión alimenticia entre tratamientos ($p > 0.05$).

El análisis microbiológico confirmó la presencia del probiótico administrado (*Lactobacillus rhamosus*). En la 6ª semana los grupos tratados con simbiótico mostraron 6.2 log UFC/g de bacterias ácido lácticas y las enterobacterias mostraron 7.6 log UFC/g durante las seis semanas del experimento. La frecuencia de aislamiento de *S. Typhimurium* fue menor ($p < 0.05$) en grupos tratados con simbióticos en comparación con grupos no tratados. No hubo diferencia significativa con respecto a la frecuencia de aislamiento de *C. perfringens* entre tratamientos ($p > 0.05$).

Por su parte, el análisis histopatológico reveló que el simbiótico promovió cambios en la mucosa (vellosidades más largas, criptas menos profundas y un mejor índice vellosidad-cripta). Los pollos tratados con el simbiótico, infectados o no con patógenos, mostraron una mucosa duodenal más sana y con menor frecuencia e intensidad de lesiones histopatológicas, al ser comparados con los grupos infectados con patógenos más no tratados con el simbiótico.

Con respecto a los órganos linfoides, las aves tratadas con el simbiótico mostraron menor frecuencia de lesiones y mayor número de linfocitos en bolsa de fabricio y timo al ser comparados con los grupos infectados con patógenos más no tratados con el simbiótico.

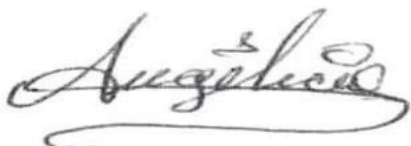
De acuerdo al análisis de componentes principales, a los 18 días de vida la mucosa, longitud de vellosidades, índice vellosidad - cripta, profundidad de las criptas y la

ingesta de alimento se vieron afectadas por las enterobacterias; sin embargo, al final del bioensayo (39 días de vida), dichos parámetros fueron influenciados por las bacterias ácido lácticas.

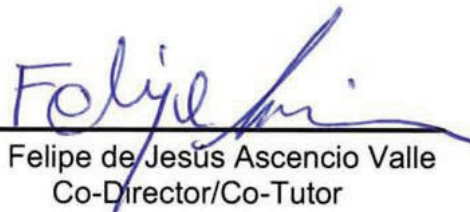
El simbiótico influyó en las modificaciones morfológicas de la mucosa duodenal, lo que a su vez dio a los pollos la capacidad de resistir las infecciones causadas por *S. Typhimurium* y *C. perfringens*, inhibiendo su crecimiento y disminuyendo la intensidad y frecuencia de las lesiones histopatológicas

Palabras clave: simbiótico, microbiota, *Salmonella* Typhimurium, *Clostridium perfringens*, mucosa intestinal, bolsa de Fabricio, bazo, timo

Vo.Bo.



Dra. Angélica Villarruel López
Director/Co-Director de Tesis



Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Co-Director/Co-Tutor

Summary

The poultry industry has traditionally made use of antibiotics to obtain higher performance and control of pathogenic microorganisms, however, their use has been associated with harmful effects. Finding alternative treatments that permit similar results to antibiotics is indispensable, therefore the objective of the present study was to evaluate the effect of a synbiotic mix on the growth performance, microbiota and the morphology of the intestine and lymphoid organs of broilers infected with *Salmonella* Typhimurium and *Clostridium perfringens*.

The chickens were divided into eight treatments: Control; Synbiotic; Synbiotic + *S. Typhimurium*; Synbiotic + *C. perfringens*; Synbiotic + *S. Typhimurium* + *C. perfringens*; *S. Typhimurium*; *C. perfringens*; and *S. Typhimurium* + *C. perfringens*. The synbiotic was administered on the first day of life and the pathogens on the 17th. The bioassay ran for six weeks, with six samples with three replicates each. After measuring the zootechnical parameters, broilers were slaughtered and eviscerated, taking samples for microbiological and histological analysis.

There were no significant differences in weight gain, feed intake and feed conversion ratio among treatments ($p > 0.05$).

Microbiological analysis confirmed the presence of the administered probiotic (*Lactobacillus rhamnosus*). In the 6th week the groups treated with synbiotic mix showed 6.2 log CFU/g of Lactic Acid Bacteria and the enterobacteria showed 7.6 log CFU/g throughout the six weeks of the experiment. The isolation frequency of *S. Typhimurium* was lower ($p < 0.05$) in groups treated with synbiotic mix compared to untreated groups. There was no significant difference in the frequency of isolation of *C. perfringens* between treatments ($p > 0.05$).

Histopathological analysis revealed that synbiotic mix promoted mucosal changes (longer villi, less deep crypts and better villi - crypt ratio). Chickens treated with the synbiotic, infected or not with pathogens, showed a healthier duodenal mucosa and with less frequency and intensity of histopathological lesions, when compared with groups infected with pathogens but not treated with the synbiotic mix.

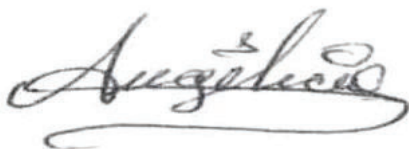
For lymphoid organs, birds treated with the synbiotic mix showed less frequent lesions and more lymphocytes in the bursa and thymus when compared to groups infected with pathogens none treated with the synbiotic. According to the analysis of main components, at 18 days of life the mucosa, villus length, villus-crypt ratio, depth of villus and food intake were affected by enterobacteria; however, at the end of the bioassay (39 days of life), these parameters were influenced by Lactic Acid Bacteria.

The synbiotic influenced the morphological modifications in the duodenal mucosa, which in turn gave the broilers the ability to resist infections caused by *S.*

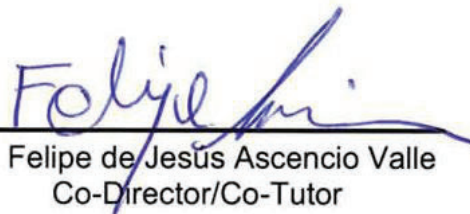
Typhimurium and *C. perfringens*, by inhibiting their growth and decreasing the intensity and frequency of histopathological injuries.

Palabras clave: synbiotic, microbiota, *Salmonella* Typhimurium, *Clostridium perfringens*, intestinal mucosa, bursa, spleen, thymus

Vo.Bo.



Dra. Angélica Villarruel López
Director/Co-Director de Tesis



Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Co-Director/Co-Tutor

Dedicatoria

A mis grandes amores Carlos, Arath y Lilith
quienes son y serán el impulso para seguir....

Agradecimientos

A la Universidad de Guadalajara, en especial al CUCEI, CUCBA y CUALTOS por facilitar los medios y espacios para continuar con mi formación académica.

Al CIBNOR y a los que en él laboran, por haberme recibido y orientado a lo largo de mi formación como estudiante de posgrado.

Al CONACyT y a la empresa Kurago Biotek, quienes a través del programa PEI/CONACyT 2015, proyecto número 220311, financiaron el proyecto "Vector aviar simbiótico para la mejora de la eficiencia alimenticia y la prevención de infecciones" del cual se desprende el presente trabajo.

Al Programa de Desarrollo Profesional Docente (PRODEP), por el otorgamiento de la beca UDG-727 – Apoyos para estudios de posgrado de alta calidad.

A mis profesores y comité tutorial, Dr. Felipe Ascencio, Dra. Angélica Villarruel, Dra. Karla Nuño, Dra. Elvira González, Dr. Carlos Angulo, gracias por su guía y paciencia durante mi estancia en el posgrado. En especial a mis Co-Directores (Dra. Angélica y Dr. Felipe), de quienes he aprendido la importancia, necesidad y actividades de un líder en un proyecto de investigación.

A mis amigos y compañeros que compartieron trabajo, risas y lágrimas durante este proceso. Luzvy, Olga, Estercita, Ana María, Ivan, gracias por qué además de ser mis profesores, me extendieron su mano amiga.

Tere, Paty, Elvia, Claudia, Anita, Fede y Fer, espero que la vida nos permita compartir un café más en "la palapa".

A mi familia, pues sin su inmenso amor, apoyo y tolerancia, nunca hubiera logrado concluir este proceso.

Contenido

| | |
|---|-----|
| Resumen..... | i |
| Summary..... | iii |
| Dedicatoria..... | v |
| Agradecimientos..... | vi |
| Contenido..... | vii |
| Lista de figuras..... | ix |
| Lista de tablas..... | xi |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. ANTECEDENTES..... | 3 |
| 2.1. Microbiota..... | 3 |
| 2.2 Probióticos, prebióticos y simbióticos..... | 4 |
| 2.3 Probióticos, prebióticos y simbióticos en la eficiencia productiva de los pollos de engorda... | 9 |
| 2.4 Microorganismos patógenos asociados al pollo de engorda..... | 10 |
| 2.4.1. Probióticos, prebióticos y simbióticos en el control de microorganismos patógenos asociados al pollo de engorda..... | 13 |
| 2.5. El intestino de los pollos de engorda..... | 14 |
| 2.5.1. Probióticos, prebióticos y simbióticos en el intestino de los pollos de engorda..... | 14 |
| 2.6. Sistema inmune de los pollos de engorda..... | 15 |
| 2.6.1 Probióticos, prebióticos, simbióticos y el sistema inmune de los pollos de engorda..... | 17 |
| 3. JUSTIFICACION..... | 19 |
| 4. HIPOTESIS..... | 20 |
| 5. OBJETIVOS..... | 21 |
| 5.1. Objetivo general..... | 21 |
| 5.2. Objetivos particulares..... | 21 |
| 6. MATERIAL Y METODOS..... | 22 |
| 6.1. Preparación de los tratamientos..... | 22 |
| 6.2. Desarrollo del bioensayo..... | 23 |
| 6.3. Sacrificio, necropsia y toma de muestras..... | 26 |
| 6.4. Eficiencia productiva..... | 28 |

| | |
|---|-----------|
| 6.5. Efecto antagónico del simbiótico | 28 |
| 6.5.1. Salmonella Typhimurium | 28 |
| 6.5.2. Clostridium perfringens..... | 29 |
| 6.5.3. Bacterias ácido lácticas | 30 |
| 6.5.4. Enterobacterias | 30 |
| 6.6. Modificaciones histopatológicas..... | 30 |
| 6.7. Efecto sobre las inmunoglobulinas | 33 |
| 6.8. Análisis estadístico | 33 |
| 7. RESULTADOS | 34 |
| 7.1. Eficiencia productiva | 34 |
| 7.2. Efecto antagónico del simbiótico..... | 35 |
| 7.3. Modificaciones histopatológicas..... | 40 |
| 7.3.1. Duodeno..... | 40 |
| 7.3.2. Bolsa de Fabricio | 46 |
| 7.3.3. Timo | 51 |
| 7.3.4. Bazo..... | 53 |
| 7.4. Efecto sobre las inmunoglobulinas | 55 |
| 7.5. Análisis de componentes principales..... | 58 |
| 8. DISCUSIÓN | 65 |
| 9. CONCLUSIONES | 75 |
| 10. LITERATURA CITADA..... | 76 |
| 11. ANEXOS | 92 |

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Esquema general del trabajo de investigación del proyecto “Evaluación de un simbiótico para mejorar la eficiencia alimenticia y la prevención de infecciones en pollos de engorda (<i>Gallus gallus domesticus</i>). | 22 |
| Figura 2. Efecto del simbiótico sobre el aislamiento de <i>Salmonella</i> Typhimurium y <i>Clostridium perfringens</i> a partir del contenido de las ramas ileocecales de pollos de engorda inoculados. A) aislamiento de <i>S. Typhimurium</i> , B) aislamiento de <i>C. perfringens</i> | 37 |
| Figura 3. Efecto del simbiótico sobre la mucosa duodenal de pollos de engorda retados con <i>Salmonella</i> Typhimurium y <i>Clostridium perfringens</i> | 40 |
| Figura 4. Efecto del simbiótico sobre la longitud de las vellosidades duodenales de pollos de engorda retados con <i>Salmonella</i> Typhimurium y <i>Clostridium perfringens</i> | 41 |
| Figura 5. Efecto del simbiótico sobre la profundidad de las criptas de la mucosa duodenal, de pollos de engorda retados con <i>Salmonella</i> Typhimurium y <i>Clostridium perfringens</i> | 42 |
| Figura 6. Efecto del simbiótico sobre el índice vellosidad/cripta de la mucosa duodenal, de pollos de engorda retados con <i>Salmonella</i> Typhimurium y <i>Clostridium perfringens</i> | 43 |
| Figura 7. Lesiones histopatológicas en duodeno de pollos retados con <i>S. Typhimurium</i> y <i>C. perfringens</i> | 45 |
| Figura 8. Bolsa de Fabricio de pollos retados con <i>S. Typhimurium</i> y <i>C. perfringens</i> (4X). | 48 |
| Figura 9. Efecto del simbiótico sobre el peso de la bolsa de Fabricio de pollos de engorda retados con <i>Salmonella</i> Typhimurium y <i>Clostridium perfringens</i> | 49 |
| Figura 10. Inmunocompetencia o inmunosupresión de acuerdo al índice morfométrico de la bolsa de Fabricio en pollos de engorda tratados con el simbiótico y retados con <i>S. Typhimurium</i> y <i>C. perfringens</i> | 50 |
| Figura 11. Timo de pollos retados con <i>S. Typhimurium</i> y <i>C. perfringens</i> | 53 |
| Figura 12. Bazo de pollos retados con <i>S. Typhimurium</i> y <i>C. perfringens</i> | 55 |
| Figura 13. Diagramas de análisis de componentes principales de pollos de engorda tratados con el simbiótico. A) Localización de diferentes variables de acuerdo al componente principal 1 y 2 a los 18 días, B) Localización de diferentes variables de acuerdo al componente principal 1 y 3 a los 18 días C) Localización de diferentes variables de acuerdo al componente principal 1 y 2 a los 39 días, D) Localización de diferentes variables de acuerdo al componente principal 1 y 3 a los 39 días. | 60 |
| Figura 14. Diagramas de análisis de componentes principales de pollos de engorda tratados con el simbiótico. A) Localización de los diferentes tratamientos de acuerdo al componente principal 1 y 2 a los 18 días, B) Localización de los | |

| | |
|--|----|
| diferentes tratamientos de acuerdo al componente principal 1 y 3 a los 18 días C) | |
| Localización de los diferentes tratamientos de acuerdo al componente principal 1 y 2 a los 39 días, D) Localización de los diferentes tratamientos de acuerdo al componente principal 1 y 3 a los 39 días. | 62 |
| Figura 15. Diagramas de análisis de componentes principales de pollos de engorda tratados con el simbiótico. A) Dendrograma del análisis jerárquico de conglomerados a 18 días, B) Dendrograma del análisis jerárquico de conglomerados a 39 días | 63 |

Lista de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla I. Número de pollos de engorda por tratamiento..... | 24 |
| Tabla II. Ingredientes y composición bromatológica de las dietas basales administradas a los pollos de engorde..... | 25 |
| Tabla III. Calendario de administración del simbiótico y microorganismos patógenos, sacrificios, necropsias y toma de muestras..... | 27 |
| Tabla IV. Protocolo de deshidratación para los tejidos de las aves en el Histokinette modelo STP – 120..... | 31 |
| Tabla V. Efecto del simbiótico sobre el peso corporal de pollos retados con <i>Salmonella</i> Typhimurium y <i>Clostridium perfringens</i> | 35 |
| Tabla VI. Efecto del simbiótico sobre la conversión alimenticia de pollos de engorda retados con <i>Salmonella</i> Typhimurium y <i>Clostridium perfringens</i> | 36 |
| Tabla VII. Efecto del simbiótico sobre recuentos de bacterias ácido lácticas duodenales de pollos de engorda retados con <i>Salmonella</i> Typhimurium y <i>Clostridium perfringens</i> | 38 |
| Tabla VIII. Especies de bacterias ácido lácticas, recuperadas de las asas duodenales de pollos tratados y no tratados con el simbiótico..... | 38 |
| Tabla IX. Efecto del simbiótico sobre recuentos de enterobacterias cecales de pollos de engorda retados con <i>Salmonella</i> Typhimurium y <i>Clostridium perfringens</i> | 39 |
| Tabla X. Efecto del simbiótico sobre el número de linfocitos por folículo de bolsa de Fabricio, de pollos de engorda retados con <i>Salmonella</i> Typhimurium y <i>Clostridium perfringens</i> | 47 |
| Tabla XI. Efecto del simbiótico sobre el número de linfocitos por folículo de timo, de pollos de engorda retados con <i>Salmonella</i> Typhimurium y <i>Clostridium perfringens</i> | 52 |
| Tabla XII. Efecto del simbiótico sobre el número de linfocitos por área de pulpa blanca de bazo, de pollos de engorda retados con <i>Salmonella</i> Typhimurium y <i>Clostridium perfringens</i> | 54 |
| Tabla XIII. Efecto de la administración del simbiótico sobre la concentración sérica de IgA en pollos de engorda retados con <i>Salmonella</i> Typhimurium y <i>Clostridium perfringens</i> (ng/mL)..... | 56 |
| Tabla XIV. Efecto de la administración del simbiótico sobre la concentración sérica de IgY en pollos de engorda retados con <i>Salmonella</i> Typhimurium y <i>Clostridium perfringens</i> (ng/mL)..... | 57 |
| Tabla XV. Efecto de la administración del simbiótico sobre la concentración sérica de IgM en pollos de engorda retados con <i>Salmonella</i> Typhimurium y <i>Clostridium perfringens</i> (ng/mL)..... | 58 |

1. INTRODUCCIÓN

La industria avícola, tradicionalmente ha hecho uso de antibióticos para modular la microbiota intestinal como parte de las estrategias para obtener mayores rendimientos de producción, sin embargo, debido a los efectos de su uso, tales como: promover la resistencia a antibióticos de los microorganismos presentes en los animales (Erdoğan *et al.*, 2010; Naghi *et al.*, 2017), la presencia de antibióticos en heces y orina que pueden diseminarse en el medio ambiente (Van Immerseel *et al.*, 2004; Erdoğan *et al.*, 2010) y en la carne de las aves (Min *et al.*, 2016; Naghi *et al.*, 2017); así como la demanda de los consumidores de acceder a productos “naturales” y libres de antibióticos (Talebi *et al.*, 2015), se tiende a la disminución e incluso erradicación por parte de algunas legislaciones (Unión Europea en el año 2006 y Estados Unidos de América en 2008) del uso de antibióticos como promotores de crecimiento (Huyghebaert *et al.*, 2011).

La exclusión de los antibióticos como promotores de crecimiento durante la producción avícola, trajo en consecuencia aumento de la relación ingesta – ganancia de peso y de la incidencia de algunas enfermedades, como la enteritis necrótica subclínica ocasionada por *Clostridium perfringens*, y la diarrea blanca, cuyo agente causal es *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Huyghebaert *et al.*, 2011).

Lo anterior ha derivado en la búsqueda de alternativas, que al ser integradas a la producción de aves de engorda brinden beneficios similares a los antibióticos como promotores de crecimiento, con respecto a la ganancia de peso y el control de enfermedades, entre las que se encuentran la administración de: probióticos, prebióticos, simbióticos, acidificadores, fitobióticos, enzimas alimenticias, inmuno – estimulantes y antioxidantes (Fallah R y Rezaei H, 2013; Yitbarek *et al.*, 2015); y cuyo empleo denota ciertas ventajas sobre los antibióticos como promotores de crecimiento, tales como: 1) no necesitar periodo de retiro, 2) no mostrar efectos residuales y, 3) no causar mutaciones en los microorganismos (Hassanein y Soliman, 2010).

Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó el efecto de un simbiótico compuesto por *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Pediococcus acidilactici* MA18/5M y fructanos de *Agave tequilana*, sobre la eficiencia productiva, antagonismo microbiano, morfología intestinal y de órganos linfoides y la concentración sérica de inmunoglobulinas, en pollos de engorda inoculados con *S. Typhimurium* y *C. perfringens*.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Microbiota*

El tracto gastrointestinal de cada especie, provee un nicho único para las comunidades bacterianas que se asentarán en él; el de los pollos de engorda no es la excepción, donde se establece un comensalismo entre ave y bacterias, siendo estas últimas, pieza fundamental para mantener la salud intestinal de los animales al reducir las infecciones intestinales e intervenir en la digestión del alimento (Choct, 2009; Lumpkins *et al.*, 2010).

Los microorganismos, inician la colonización del *cecum* de los pollos durante la etapa embrionaria tardía, en este punto, la microbiota intestinal se encuentra constituida principalmente por bacterias del género *Enterococcus*, sin embargo, también han sido aislados *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli*, *Clostridium tertium*, *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp. (Pedroso *et al.*, 2005).

Inmediatamente después de la eclosión la microbiota se modifica de acuerdo a diversos factores, tales como: medio ambiente, tipo de alimentación, línea genética, condiciones del tracto gastrointestinal y edad del ave (Haghighi *et al.*, 2005; Cisek y Binek, 2014); a las dos semanas de vida, las especies de *Lactobacillus* son las dominantes en el buche e intestino delgado, principalmente *L. aviarius* y *L. salivarius*, asociados a la mucosa del tracto gastrointestinal superior, con el tiempo, miembros del género *Bifidobacterium* spp., serán los predominantes (Cisek y Binek, 2014).

Se considera que la microbiota llega a su máximo desarrollo, entre los 30 y 40 días de vida, previo a esta fecha, es común encontrar lactobacilos, coliformes y enterococos en el *cecum*, sin embargo, conforme la microbiota evoluciona, dicho segmento es poblado por bacterias anaerobias principalmente del género *Clostridium* y anaerobias no esporuladas, tales como: *Bacteriodes*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Eubacterium*, *Gemminger*, *Faecalibacterium*

prausnitzii y *E. coli* (Haghighi *et al.*, 2005; Gong *et al.*, 2007; Chambers y Gong, 2011; Adil y Magray, 2012; Cisek y Binek, 2014).

Los sitios con mayor presencia bacteriana en el tracto gastrointestinal de los pollos son el buche y el *cecum*, sin embargo, a pesar de que el número de bacterias en el intestino delgado es inferior, su actividad metabólica es superior a la llevada a cabo en el colon (Jensen y Jørgensen, 1994; Adil y Magray, 2012).

Dicha actividad metabólica y en general la presencia de la microbiota, promueve el desarrollo funcional del tracto gastrointestinal (angiogénesis, tejidos epiteliales y mucosa) y juega un importante papel en el organismo del hospedero para evitar la colonización por parte de microorganismos infecciosos, en el caso de los pollos, la ausencia de una microbiota normal es considerado como el principal factor de susceptibilidad frente a infecciones bacterianas (Yang *et al.*, 2009).

2.2 Probióticos, prebióticos y simbióticos

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) definen a los probióticos como microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud del hospedero (Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2006).

Un probiótico debe ser resistente al ácido gástrico y la bilis, multiplicarse rápidamente en las condiciones del tracto gastrointestinal, no ser patógeno o tóxico para el hospedero, tener fuerte capacidad de adhesión y habilidades para reducir la presencia de microorganismos patógenos y modular la respuesta inmune, así como, ser resistente al proceso comercial de manufactura, procesamiento y distribución (Patterson y Burkholder, 2003; Huyghebaert *et al.*, 2011).

Estos microorganismos han sido empleados en la producción pecuaria como una alternativa al uso de antibióticos promotores de crecimiento, por su capacidad de mejorar la eficiencia productiva y reducir la mortalidad, lo que logran al modular la

composición de la microbiota intestinal mediante la competencia exitosa contra los microorganismos patógenos, a través de distintos mecanismos (Erdoğan *et al.*, 2010; Mookiah *et al.*, 2014; Talebi *et al.*, 2015):

- Disminución del pH intestinal, mediante la liberación de metabolitos tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y ácidos grasos volátiles (VFAs) (Ghasemi *et al.*, 2015).
- Competencia por sitios de adhesión en el epitelio intestinal, sobre todo en las vellosidades intestinales y criptas colónicas (Patterson y Burkholder, 2003). Las bacterias ácido lácticas muestran diversas proteínas superficiales que interactúan con las células epiteliales intestinales y el moco; tal es el caso de la proteína promotora de adhesión al moco (MapA), reportada en *L. reuteri* y *L. fermentum* y la proteína de unión al moco (MUB) presente en *L. reuteri* (Bermudez-Brito *et al.*, 2012)
- Estimulación de la producción de mucinas (MUC2 y MUC3) por parte de las células calciformes, lo que inhibe la adhesión de las bacterias enteropatógenas (Erdoğan *et al.*, 2010; Mookiah *et al.*, 2014; Talebi *et al.*, 2015).
- Disminución de la actividad intestinal de las enzimas β – glucosidasa y β – glucoronidasa, enzimas involucradas en la síntesis de toxinas por parte de los enteropatógenos (Erdoğan *et al.*, 2010; Mookiah *et al.*, 2014; Talebi *et al.*, 2015).
- Competencia por nutrimentos en el intestino, en especial hidratos de carbono, lo que disminuye las posibilidades de los patógenos, de adquirir energía para realizar las funciones esenciales para la vida (Mookiah *et al.*, 2014; Talebi *et al.*, 2015).
- Inducen la liberación de proteínas antimicrobianas (PAMs) (α y β defensinas, catelicidinas, lectinas tipo C y ribonucleasas) y enzimas (lisozima) por parte de las células epiteliales (Huyghebaert *et al.*, 2011; Bermudez-Brito *et al.*, 2012)

- Producción de moléculas antimicrobianas (PAMs y bacteriocinas: lactacina B, plantaricina, nicina, bifidocina B), ácidos orgánicos (acético y láctico) y ácidos biliares desconjugados, con efecto antagónico sobre los microorganismos patógenos (Huyghebaert *et al.*, 2011).
- Estimulación del sistema inmune mediante el incremento de la producción de linfocitos T, células CD⁺ y células secretoras de anticuerpos, así como la expresión de citocinas pro y anti inflamatorias, interferón gama, células natural killer (NK) y producción de anticuerpos, lo que eleva la respuesta humoral y celular (Van Immerseel *et al.*, 2009; Khan y Naz, 2013; Talebi *et al.*, 2015).

Diversas especies de microorganismos han sido empleadas como probióticos, entre los que se encuentran: *Bacillus coagulans*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus faecium* SF68, *Escherichia coli* Nissle 1917, *Lactococcus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus* y la levadura *Saccharomyces boulardii* (Patterson y Burkholder, 2003; Pandey *et al.*, 2015).

Lactobacillus rhamnosus ha demostrado tener características relevantes para ser empleado como probiótico, tales como: superficie especializada para interactuar con el moco intestinal y pili spaCBA para adherirse a la pared intestinal, lo que le confiere la habilidad de permanecer en el tracto gastrointestinal; biosíntesis de polisacáridos extracelulares que incrementan su capacidad de adherencia; biosíntesis de ácidos grasos (Yan y Polk, 2012a); síntesis y excreción de las proteínas solubles p40 y p75, las cuales previenen el daño epitelial intestinal y la apoptosis inducidos por citocinas y reducen la interrupción de la función de la barrera epitelial por peróxido de hidrógeno; así como producción de ácido láctico como sustancia antibacterial (Yan y Polk, 2012b).

Por su parte, *Pediococcus acidilactici* es un habitante común de productos hortofrutícolas fermentados y coloniza eficazmente el tracto digestivo del huésped (Gupta y Sharma, 2017), ejerce antagonismo contra otros microorganismos a

través de la producción de ácido láctico y de péptidos antimicrobianos conocidos como pediocinas (pA1/AcH, L50) las cuales son capaces de inhibir el desarrollo de bacterias Gram – positivas como *C. perfringens* (Lee *et al.*, 2007).

Los prebióticos son ingredientes de fermentación selectiva que permiten cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota intestinal que confieren beneficios para el bienestar y salud del hospedero (Gibson *et al.*, 2010). (El prebiótico ideal no debe ser hidrolizado o absorbido por enzimas o tejidos del hospedero, debe ser fácilmente fermentable por los microorganismos que pretende estimular sin producir gas, ser selectivo para beneficiar a un limitado número de bacterias y alterar benéficamente la microbiota intestinal y su actividad, así como los sistemas de defensa del hospedero y tener un peso molecular elevado (Patterson y Burkholder, 2003; Pandey *et al.*, 2015).

Los más populares son los manano - oligosacáridos (derivados de las paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae*), β - glucanos (derivados de paredes celulares de hongos o levaduras) y fructanos: inulina, leván y grupos ramificados (extraídos de diferentes plantas, hidrolizados a partir de polisacáridos o producidos por microorganismos) (Teng y Kim, 2018).

Diversos oligosacáridos tales como fructo – oligosacáridos (FOS), galacto – oligosacáridos (GOS), manano – oligosacáridos (MOS) e isomalto – oligosacáridos (IMO), han sido estudiados como posibles alternativas a los antibióticos promotores de crecimiento (Mookiah *et al.*, 2014), siendo la inulina y los fructo – oligosacáridos, los más comúnmente utilizados en la industria avícola (Ghasemi *et al.*, 2015) con un grado de polimerización de dos a veinte monosacáridos y extraídos de una fuente vegetal o microbiana (pared celular de levaduras) (Huyghebaert *et al.*, 2011).

Los prebióticos son capaces de reducir el crecimiento de colonias de bacterias patógenas (*Clostridium*, *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Enterobacteriaceae*, etc.) y, como consecuencia, restringir la cantidad de metabolitos tóxicos generados ellos (amoníaco, indoles, fenoles, tioles, etc.) (Buclaw, 2016).

Prebióticos, como la inulina, han sido asociados con reducción en la duración de la diarrea y disminución de la inflamación intestinal, así como con la biodisponibilidad y absorción de minerales (Pokusaeva *et al.*, 2011; Pandey *et al.*, 2015), aumento de la población de bacterias ácido lácticas en el tracto gastrointestinal (Samanta *et al.*, 2013) e inhibición de patógenos como *Escherichia coli* y *Salmonella* en el intestino (Xu *et al.*, 2003).

La inulina administrada a las aves de corral tiene efecto positivo sobre la microbiota intestinal, la histomorfología intestinal, el sistema inmunológico y el metabolismo de minerales y lípidos. Los mecanismos a través de los cuales la inulina afecta al ave en general y al tracto digestivo en particular son complejos, multidireccionales y no se comprenden completamente. Variables como el tipo de alimento, fuente y concentración de inulina en el alimento, sexo, características individuales del ave, mantenimiento de la higiene y el estrés ambiental, pueden afectar la respuesta de las aves a la inulina (Buclaw, 2016).

Por su parte, a la combinación de probióticos y prebióticos se le conoce como simbiótico; tiene el fin de lograr relación sinérgica entre sus componentes. afectando positivamente al hospedero al facilitar la implantación y supervivencia de los microorganismos probióticos en el tracto gastrointestinal (Naghi *et al.*, 2017).

La principal razón para usar un simbiótico, es que el probiótico sin el prebiótico tendrá menos posibilidades de sobrevivir en el tracto gastrointestinal, ya que mostrará menor tolerancia a la temperatura, oxígeno y bajo pH (Ghasemi *et al.*, 2015), aunado a lo anterior, la administración del simbiótico mejora la supervivencia del probiótico durante su paso por el tracto gastrointestinal superior (Peña, 2007).

Entre los beneficios del uso de simbióticos se encuentran: 1) Elevar los niveles de lactobacilos y bifidobacterias, así como del balance de la microbiota intestinal, 2) Mejorar la habilidad de inmunomodulación 3) Prevenir la translocación bacteriana (Pandey *et al.*, 2015).

En pollos de engorda se ha reportado que la suplementación dietética con productos simbióticos mejora significativamente el peso corporal, la ganancia diaria de peso promedio, la eficiencia alimenticia y el porcentaje de rendimiento de la canal en comparación con los controles o pollos alimentados únicamente con probióticos (Gadde *et al.*, 2017).

2.3 Probióticos, prebióticos y simbióticos en la eficiencia productiva de los pollos de engorda

Considerables investigaciones han evaluado el efecto de probióticos, prebióticos y simbióticos sobre la mejora del crecimiento y el rendimiento de las aves de corral. Reportando que la administración de probióticos puede mejorar la eficiencia alimenticia (Erdoğan *et al.*, 2010), obteniendo resultados similares a los antibióticos promotores de crecimiento con respecto a la ganancia de peso (Mookiah *et al.*, 2014). Dicha mejora se sustenta, en que los microorganismos tienen efecto positivo liberando y/o sintetizando metabolitos secundarios que son absorbidos por el hospedero.

Por otro lado, cuando las aves son alimentadas con dietas altas en fibra, la microbiota intestinal sintetiza cantidades sustanciales de aminoácidos. Los hidratos de carbono no digeribles para el pollo son fermentados por los microorganismos del buche y del *cecum*, produciendo ácidos grasos de cadena corta que le proveen energía extra. Gracias a la síntesis de dichos ácidos grasos, la microbiota contribuye a la absorción de sodio en el colon y también sintetiza vitaminas B, K y E, si hay ácido fólico disponible (Adil y Magray, 2012).

Diversos autores demostraron mejora en la ganancia de peso y la eficiencia alimenticia en pollos de engorda mediante la suplementación dietética de una o múltiples cepas probióticas: *E. faecium* (Cao *et al.*, 2013), *B. subtilis* (Amerah *et al.*, 2013), *L. acidophilus* (Olnood *et al.*, 2015), *L. reuteri* + *E. faecium* + *Bifidobacterium animalis*, *P. acidilactici* y *L. salivarius* (Mountzouris *et al.*, 2010); *L. reuteri* + *L. gallinarum* + *L. brevis* y *L. salivarius* (Mookiah *et al.*, 2014). Prebióticos:

pared celular de *S. cerevisiae* (Ghasemi *et al.*, 2014; Salehimanesh *et al.*, 2016). O simbióticos: *E. faecium* + fructooligosacáridos + fragmentos de paredes celulares (Hassanpour *et al.*, 2013); *E. faecium* + inulina de achicoria (Ghasemi *et al.*, 2015); *L. acidophilus* + *L. casei* + *E. faecium* + *B. subtilis* + hidratos de carbono derivados de levaduras (Yitbarek *et al.*, 2015)

Sin embargo, otros autores no han encontrado efecto positivo sobre la ganancia de peso, el consumo alimentario y/o la conversión alimenticia administrando cepas probióticas *Lactobacillus reuteri*; *L. reuteri* + *B. subtilis* + *S. cerevisiae* (Salim *et al.*, 2013). Prebióticos: hidratos de carbono derivados de levaduras (Yitbarek *et al.*, 2015). O mezclas simbióticas: *E. faecium* + fragmentos de pared celular de algas (Erdoğan *et al.*, 2010); *E. faecium* + inulina de achicoria (Naghi - Shokri *et al.*, 2016); *L. acidophilus* + *L. casei* + *B. bifidum* + *E. faecium* + pared celular de *S. cerevisiae* (Salehimanesh *et al.*, 2016)

2.4 Microorganismos patógenos asociados al pollo de engorda

La colonización intestinal por microorganismos patógenos tales como *Salmonella* Typhimurium y *Clostridium perfringens* en pollos de engorda, ocurre comúnmente alrededor de los 15 días de vida, periodo durante el cual la microbiota no se ha desarrollado en su totalidad y que coincide con el cambio de alimento (con mayor concentración de proteína) o de hábitat. Los patógenos pueden provenir del medio ambiente, la cama, el alimento, agua y otros animales (Hafez, 2011).

S. Typhimurium es un patógeno gastrointestinal, causa frecuente de enfermedades transmitidas por alimentos en todo el mundo, siendo uno de los serotipos más comúnmente aislados en brotes relacionados con los pollos (Finstad *et al.*, 2012).

Puede causar morbilidad y mortalidad tanto en humanos como en aves de corral (Li *et al.*, 2017), pero también puede vivir colonizando el *cecum* de los pollos como

miembro transitorio de la población microbiana intestinal sin causar enfermedad (Khan y Naz, 2013).

Es un patógeno emergente detectado en varios países, entre los que se encuentran: Estados Unidos, Reino Unido, Alemania, Francia, Austria y Dinamarca. Su transmisión entre las aves puede ser de manera vertical al producirse huevos infectados, o de forma horizontal, al contaminarse los huevos y / o los polluelos con heces, agua, camas, equipo o personal contaminado con el patógeno (Akpabio, 2015).

El ciclo infeccioso de *Salmonella* consiste en: ingreso del patógeno, establecimiento y multiplicación, evitar las defensas del hospedero, y finalmente, daño y salida. La invasión y evasión de las defensas del hospedero lo logra gracias a sus *islas de patogenicidad*, las cuales son grupos de genes localizados en una sección específica del genoma que codifican para factores de virulencia, dichas islas se encuentran ausentes en cepas no virulentas (Donnenberg, 2000).

Una vez que el microorganismo ha ingresado al intestino del hospedero y ha sobrevivido el tiempo suficiente para lograr adherirse y penetrar el epitelio intestinal, se inicia la infección. Dentro de las células epiteliales *Salmonella* se encuentra a salvo de los peligros que la podrían dañar, como lo son el bajo pH de tracto gastrointestinal, así como cualquier sustancia antimicrobiana o barrera física. Aprovechando su ventaja, *Salmonella* migra hacia las placas de peyer, donde se encuentra con las células M, las cuales se cree que son su ruta de invasión, y que son destruidas por el patógeno junto con el epitelio del folículo asociado (Dar *et al.*, 2017)

En algunos casos, su colonización no afecta el aumento de peso corporal ni el rendimiento de las aves y su infección asintomática puede aumentar la probabilidad de transmisión zoonótica a los seres humanos a través de la cadena alimentaria (Knap *et al.*, 2011).

La presencia de *S. Typhimurium* en los galpones de pollos de engorda, puede ser

controlada mediante diversas intervenciones coordinadas y simultaneas, entre las que se encuentran: aplicación de buenas prácticas pecuarias; control de los huevos durante la postura, programas de muestreo, prácticas de bioseguridad, medicación, administración de probióticos, prebióticos, simbióticos y vacunación (Akpabio, 2015).

Por su parte, *C. perfringens* es miembro de la microbiota común en pollos de engorda sanos, pero puede causar enfermedades mionecróticas y gastrointestinales (enteritis necrótica clínica y subclínica) en humanos, animales de abasto y en aves bajo ciertas condiciones (Van Immerseel *et al.*, 2009).

La enteritis necrótica clínica se caracteriza por aumento repentino de la mortalidad de las aves, a menudo sin signos premonitorios. Los síntomas incluyen diarrea, depresión, renuencia a moverse, plumas erizadas, somnolencia, disminución del apetito o anorexia, acurrucamiento y en algunos casos, goteo del pico y deshidratación, así como tasa de crecimiento nula y eficiencia alimenticia disminuida. Las lesiones intestinales necróticas ocurren notablemente en el yeyuno e íleon, pero también en duodeno y la *cecum* (Olkowski *et al.*, 2008; Cooper *et al.*, 2013).

Los brotes de enteritis necrótica son comunes en pollos de 2 a 6 semanas de edad, después de la disminución de los anticuerpos maternos y antes de la madurez del propio sistema inmunológico de los pollos de engorda (Cooper *et al.*, 2013).

Por su parte, la enteritis necrótica subclínica causa daños crónicos en la mucosa intestinal con el desarrollo de úlceras en la mucosa e hiperemia periférica (Cooper y Songer, 2009), lo que conduce a disminución de la digestión, absorción y el aumento de peso, aumento de la tasa de conversión alimenticia y a un consiguiente aumento de los costos de producción (Van Immerseel *et al.*, 2009).

La enteritis necrótica subclínica, puede persistir en las parvadas de pollos sin manifestación clínica, lo que aumenta el riesgo de transferencia de patógenos a

través de la cadena alimentaria y las consiguientes preocupaciones en materia de salud pública, por lo que se percibe como un problema importante entre los expertos de la industria (Olkowski *et al.*, 2008).

La presencia de *C. perfringens* en el tracto gastrointestinal de pollos de engorda, incluso en grandes cantidades, no es suficiente para producir enteritis necrótica clínica o subclínica; sin embargo, factores predisponentes como daño del epitelio intestinal, presencia del virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa de Fabricio, altos niveles dietéticos de proteínas poco digeribles y polisacáridos indigeribles, alteraciones del régimen alimentario, alteraciones de la microbiota, hacinamiento y una variedad de condiciones de manejo y climáticas, son condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad (Timbermont *et al.*, 2011; Antonissen *et al.*, 2016; Moore, 2016).

2.4.1. Probióticos, prebióticos y simbióticos en el control de microorganismos patógenos asociados al pollo de engorda

Múltiples autores han evaluado el efecto de probióticos, prebióticos y simbióticos sobre microorganismos patógenos que afectan al pollo de engorda:

Marianelli *et al.* (2010) reportaron que *L. rhamnosus* desempeñó un papel antimicrobiano contra *S. Typhimurium* 1344 in vitro, mediado por la producción de ácido láctico y la secreción de moléculas de ácido no láctico.

Por su parte, Kizerwetter-Świda y Binek (2009) lograron reducir el número de *S. enteritidis* y *C. perfringens* en el intestino de pollos de engorda, mediante la administración de *L. salivarius* 3d.

Con respecto al uso de prebióticos, se ha comprobado que, mediante la administración de inulina, fructooligosacáridos y/o mananooligosacáridos es posible reducir la población intestinal de *Salmonella* spp., *C. perfringens*, *Campylobacter* y *E. coli* en pollos de engorda (Kim *et al.*, 2011; Nabizadeh, 2012)

2.5. El intestino de los pollos de engorda

El epitelio intestinal es fundamental para mantener la función intestinal normal al ser una barrera fisiológica contra microorganismos patógenos y sustancias perjudiciales en el lumen intestinal; también regula activamente la función inmunitaria y mantiene la homeostasis intestinal. La alteración de la integridad de esta monocapa se traduce en enfermedad (Yan y Polk, 2012a).

El funcionamiento del tracto gastrointestinal de las aves, se ve importantemente afectado por los nutrimentos que ingieren, ante esta premisa se han evaluado diferentes fuentes y tipos de nutrimentos para encontrar aquellos que promuevan el desarrollo de vellosidades de mayor longitud y criptas de menor profundidad, lo que se traduce en una buena salud intestinal (Mateo *et al.*, 2005).

2.5.1. Probióticos, prebióticos y simbióticos en el intestino de los pollos de engorda

Los probióticos producen ácidos grasos de cadena corta en el intestino de las aves, mismos que pueden estimular la proliferación de células del epitelio intestinal, modificando la morfología de la mucosa, al incrementar los niveles plasmáticos de péptido – 2 – similar al glucagón (GLP-2) y del transportador de glucosa (GLUT 2) en el íleo (Adil y Magray, 2012).

En un estudio en pollos de la línea genética Ross, se obtuvieron criptas menos profundas y vellosidades más largas en los grupos tratados con un simbiótico comercial (Naghi *et al.*, 2017)

L. rhamnosus logra la mejora de la barrera epitelial, al secretar los péptido p40 y p75, que previenen la apoptosis celular inducida por citocinas al activar la protein cinasa B antiapoptótica (PKB/Akt) en la vía dependiente de la fosfatidil – inositol – 3'- cinasa, e inhibir al pro-apoptótico p38 protein cinasa – mitógeno activado (MAPK) (Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

Diversos estudios han demostrado el efecto positivo de los probióticos al disminuir las lesiones intestinales ocasionadas por *C. perfringens*, tal y como lo demostraron

Cao *et al.* (2012), al administrar *Lactobacillus fermentum* a pollos infectados con dicho patógeno y reducir significativamente la inflamación de la mucosa intestinal.

2.6. Sistema inmune de los pollos de engorda

El sistema inmunológico de los pollos está compuesto por órganos primarios (bolsa de Fabricio y timo) y órganos secundarios (bazo, glándula harderiana y tejido linfoide asociado a mucosa). Una parte importante del tejido linfoide asociado a la mucosa es el tejido linfoide asociado al intestino, que incluye, entre otros, las placas de Peyer, tonsilas cecales, divertículo de Meckel, tonsilas esofágicas y tonsilas pilóricas (Madej y Bednarczyk, 2016).

La *bolsa de Fabricio* es un saco ciego en la región dorsal de la cloaca. Microscópicamente se observan folículos linfoides que interactúan con células epiteliales y vasos sanguíneos. Este órgano crece hasta la décima semana de vida postnatal del pollo, momento en el que comienza su involución, alcanzando su máxima reducción de tamaño en la semana 23 (Barbeito y González, 2014); su peso o tamaño de es un indicador del estado de inmuno-competencia o inmunosupresión en el ave a nivel de los órganos linfoides (Torrubia, 2009).

En ella se realizan procesos de diferenciación y maduración de los linfocitos B. Tiene comunicación directa con el lumen intestinal por medio del lumen de la bolsa, lo que le permite la captación de antígenos y el consiguiente desarrollo de respuestas de anticuerpos (Gómez *et al.*, 2010).

El *timo* se ubica en el cuello, paralelo al nervio vago y la vena yugular interna. Es un órgano linfoepitelial en el que un retículo de células epiteliales unidas por sus ramificaciones (citorretículo epitelial) sostiene a células linfáticas de la línea T. En el pollo el timo crece desde el día 10 de incubación hasta la semana 17 posnatal, en que comienza a involucionar y prosigue hasta la semana 23. Es el órgano linfático primario para la selección y diferenciación de linfocitos T (Barbeito y González, 2014).

El *bazo* es un órgano linfático secundario situado en el sector derecho de la cavidad visceral, en la zona de la unión entre el estómago glandular y el estómago muscular. Durante la vida embrionaria, cumple función hematopoyética respecto de todos los elementos figurados de la sangre; además se ha descrito el reordenamiento génico de los precursores de los linfocitos B en este órgano antes de alcanzar la bolsa de Fabricio. Después de la eclosión su función principal es la linfopoyesis secundaria B y T. En general, la presentación de antígenos ocurre en la vaina periarteriolar para los linfocitos T y en la vaina elipsoide para los linfocitos B (Barbeito y González, 2014).

El *tejido linfoide asociado a mucosa* se conforma por el tejido linfoide asociado al intestino, las placas de Peyer, el divertículo de Meckel y las tonsilas esofágicas.

Tejido Linfoide Asociado al Intestino (GALT), se localiza en la submucosa y mucosa del intestino; se considera el órgano inmune efector más grande de todo el organismo, ya que en él se encuentran del 70 al 80 % de todas las células del sistema inmune, funcionando como tejido linfoide secundario (Gómez *et al.*, 2010)

Las *placas de Peyer* se encuentran situadas en la submucosa de la parte media del intestino; por su parte, las *tonsilas cecales* se localizan en la unión íleo cecal con una estructura esferoidal. Ambas estructuras son consideradas como acúmulos linfoides y presentan centros germinales con linfocitos B (ambas) y T (en tonsilas cecales). En ellas se desarrolla la respuesta inmune específica.

El *divertículo de Meckel* es un saco ciego localizado sobre el yeyuno. En él, se realiza el proceso de mielopoyesis extramedular entre las dos y siete semanas de vida del pollo. Además, durante las dos primeras semanas de vida el divertículo tiene comunicación directa con el lumen intestinal, misma que se cierra a las seis semanas (Gómez *et al.*, 2010).

Las *tonsilas esofágicas* se encuentran alrededor de la entrada del proventrículo, infiltradas por células linfoides (linfocitos T, células plasmáticas, dendríticas y macrófagos) se exponen de forma directa con el bolo alimenticio que contiene

alimento, agentes patógenos o vacunas, lo que les permite el reconocimiento de antígenos con la consiguiente respuesta inmune (Gómez *et al.*, 2010)

2.6.1 Probióticos, prebióticos, simbióticos y el sistema inmune de los pollos de engorda

Las primeras dos semanas de vida de los pollos son las de mayor importancia inmunológica, ya que desde el momento de la eclosión, el ave se encuentra expuesta a los antígenos y/o patógenos ambientales, dando como resultado, cambios en los linfocitos intestinales y el desarrollo temporal de sus funciones (Yitbarek *et al.*, 2015).

El intestino y la microbiota que en él reside, juegan un importante rol modelando el sistema inmune innato y adaptativo (Adil y Magray, 2012; Khan y Naz, 2013). Animales libres de microorganismos muestran un tejido linfoide asociado al intestino menos desarrollado, sin embargo, al inocular dichos animales con microorganismos característicos de la microbiota, resulta en la mejora y diversificación de anticuerpos mediadores de la respuesta inmune (Haghighi *et al.*, 2005).

Aún se desconocen los mecanismos exactos mediante los cuales, la microbiota modula la actividad inmune, sin embargo, se ha demostrado que los probióticos estimulan diferentes subconjuntos de células del sistema inmune para producir citocinas, que a su vez juegan un papel en la inducción y regulación de la respuesta inmune (Haghighi *et al.*, 2005).

También se tiene identificado que los probióticos interactúan con monocitos / macrófagos, linfocitos, células dendríticas y células epiteliales intestinales. Las células dendríticas y células epiteliales intestinales, pueden interactuar y responder a la presencia de patógenos intestinales a través de sus receptores de reconocimiento de patrones.

Otro mecanismo podría estar mediado por la liberación de uno o más factores solubles (ADN) que alteran la permeabilidad epitelial y protegen contra la invasión

bacteriana (Lammers *et al.*, 2003). El epitelio intestinal está constantemente expuesto a altos niveles de material genético como el ácido desoxirribonucleico (ADN) bacteriano. Estudios previos han reportado los efectos inmunorreguladores del ADN de la mezcla probiótica comercial “VSL#3” en humanos y ratones (Jijon *et al.*, 2004). También se ha demostrado que el ADN de *L. rhamnosus* mejora la expresión del TLR9, el cual ha sido identificado como atenuante del factor de necrosis tumoral (TNF), mostrando un efecto inhibitorio sobre la reducción de la resistencia transepitelial inducida por el TNF- α (Yan y Polk, 2012a).

Diversos estudios han procurado modificar la función inmune de los pollos, para dicho fin se han empleado componentes nutricionales, como ácidos grasos y vitamina E, prebióticos, probióticos y simbióticos, sin embargo, hasta el momento no se ha logrado esclarecer el efecto de dichos componentes sobre el sistema inmune, pues así como hay estudios que indican que es posible modificar la respuesta inmune mediante aditivos alimentarios, otros reportan no encontrar cambios al momento de administrarlos (Korver, 2012).

En los pollos de líneas comerciales se han descrito tres isotipos de inmunoglobulinas: IgY, IgM e IgA. Siendo la IgA el anticuerpo de mayor abundancia en las mucosas, presentando concentraciones de 3.5 – 12 mg / mL en bilis y secreciones intestinales (Gómez *et al.*, 2010); la IgA provee protección contra los patógenos intestinales y su deficiencia puede derivar en sobrecrecimiento y / o translocación bacteriana (Min *et al.*, 2016).

3. JUSTIFICACION

La industria avícola, tradicionalmente ha hecho uso de antibióticos como promotores de crecimiento como parte de las estrategias para obtener mayores rendimientos de producción, sin embargo, debido a los efectos de su uso, así como, a la demanda de los consumidores de acceder a productos “naturales” y libres de sustancias químicas, se tiende a la disminución e incluso erradicación de su empleo, lo que ha ocasionado aumento de la relación ingesta – ganancia de peso y de la incidencia de algunas enfermedades, como la enteritis necrótica subclínica ocasionada por *C. perfringens*, y la diarrea blanca, cuyo agente causal es *S. Typhimurium*, impactando fuertemente en los rendimientos económicos de la industria avícola.

Lo anterior hace necesario buscar alternativas tales como los simbióticos, que al ser administrados a pollos de engorda sean capaces de modular la microbiota intestinal con el consecuente impacto sobre la ganancia de peso, el control de enfermedades ocasionadas por *C. perfringens* y *S. Typhimurium*, la morfología intestinal y la concentración sérica de inmunoglobulinas, brindando beneficios similares a los antibióticos promotores de crecimiento.

4. HIPOTESIS

Si la administración de un simbiótico a pollos de engorda de la línea genética COBBAvian48 modifica la microbiota intestinal, entonces tendrá efecto sobre la eficiencia productiva, morfología del intestino y órganos linfoides, concentración sérica de inmunoglobulinas, y será capaz de prevenir infecciones ocasionadas por *C. perfringens* y *S. Typhimurium*.

5. OBJETIVOS

5.1. *Objetivo general*

Evaluar el efecto de un simbiótico sobre la eficiencia productiva, el antagonismo microbiano, morfología intestinal y de órganos linfoides, y la concentración sérica de inmunoglobulinas en pollos de engorda (*Gallus gallus domesticus*) de la línea genética COBBAvian48 inoculados con *S. Typhimurium* y *C. perfringens*.

5.2. *Objetivos particulares*

1. Determinar la eficiencia productiva (ganancia de peso, consumo alimenticio y conversión alimenticia) en pollos de engorda COBBAvian48, tratados con un simbiótico e inoculados con *S. Typhimurium* y *C. perfringens*.
2. Evaluar *in vivo*, el antagonismo microbiano del simbiótico frente a *S. Typhimurium* y *C. perfringens* en pollos de engorda COBBAvian48 en un galpón experimental.
3. Identificar los cambios histopatológicos en duodeno y órganos linfoides (bolsa de Fabricio, timo y bazo) en pollos de engorda COBBAvian48 inoculados con *S. Typhimurium* y *C. perfringens* y el simbiótico.
4. Analizar el efecto del simbiótico sobre la concentración sérica de inmunoglobulinas (IgA, IgM e IgY) en pollos de engorda COBBAvian48, inoculados con *S. Typhimurium* y *C. perfringens*.

6. MATERIAL Y METODOS

La investigación constó de cuatro etapas: 1) Determinación de la eficiencia productiva en pollos de engorda de la línea COBBAvian48; 2) Evaluación del efecto antagónico del simbiótico frente a *C. perfringens* y *S. Typhimurium in vivo*; 3) Efecto sobre las inmunoglobulinas; 4) Identificación de las modificaciones histopatológicas en intestino y órganos linfoides (Fig. 1).

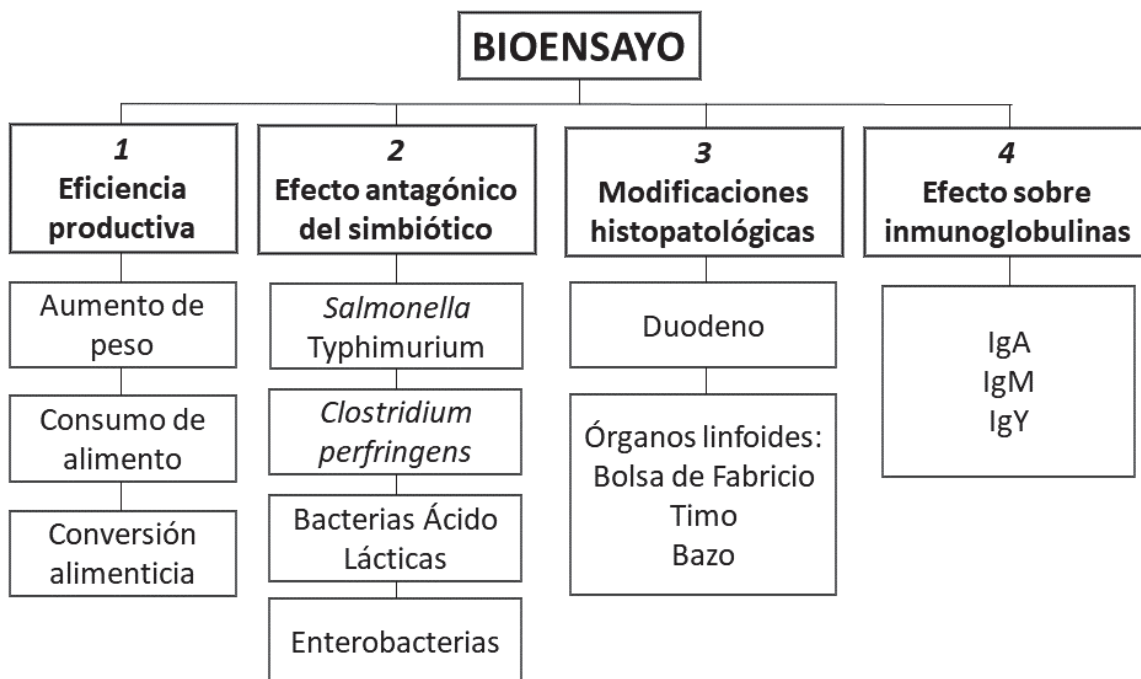


Figura 1. Esquema general del trabajo de investigación del proyecto “Evaluación de un simbiótico para mejorar la eficiencia alimenticia y la prevención de infecciones en pollos de engorda (*Gallus gallus domesticus*).

6.1. Preparación de los tratamientos

La mezcla simbiótica fue proporcionada por la compañía Kurago Biotek Holdings S.A.P.I. de C.V. (Guadalajara, Jal., Mex.); cada dosis (1 mL) contiene 7 log UFC/g de *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DUPONT – DANISCO) y *Pediococcus acidilactici* MA18/5M (BACTOCEL), más 4.5% (0.045 g) de fructanos

de *Agave tequilana* (patente WO2017105186 A1). La administración se hizo por vía oral mediante el agua de bebida.

Los microorganismos patógenos empleados fueron *Clostridium perfringens* ATCC 13124 y *Salmonella* Typhimurium, la cual fue aislada en el laboratorio de Microbiología Sanitaria – Investigación del Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías de la Universidad de Guadalajara y enviada al Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE) (Ciudad de México, México) para su identificación por serotipificación de acuerdo al esquema de White – Kauffman. Antes de la administración a los pollos de engorda, los patógenos fueron reactivados en caldo lactosado con extracto de levadura para *S. Typhimurium* y en caldo tioglicolato en condiciones de anaerobiosis para *C. perfringens*, incubando durante 24 horas a 37 °C. Las bacterias se separaron por centrifugación (3 veces a 4000 g durante 20 minutos cada vez) y se lavaron con solución salina fisiológica (solución de NaCl 0.8% p/v). Los pellets se suspendieron en solución salina fisiológica y el número de bacterias se calculó con un nefelómetro (DensiCHEK, Modelo: OA009372, bioMérieux Inc, MO).

6.2. Desarrollo del bioensayo

La presente investigación siguió los lineamientos de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales Agrícolas en Investigación y Enseñanza (ADSA *et al.*, 2010) y fue aprobada por el Comité de Bioética del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara (Oficio número: CINV.078/15). La toma de muestras se realizó bajo anestesia (pentobarbital sódico <PISA Agropecuaria, México>), y se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de las aves a lo largo del bioensayo.

Un total de 258 pollos machos (*Gallus gallus domesticus*) de la línea COBB-Avian48 (muestra calculada de acuerdo a la fórmula en base a incidencias seriadas en los procedimientos, Rojo, 2014), obtenidos de un criadero local (Avi – Inc, S.P.R. de R.L. de C.V., Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, MX) fueron ubicados en una caseta (galpón) experimental en el CUCBA, el cual fue lavado y sanitizado

con cloro a 200 ppm previo al ingreso de los pollos. Las aves fueron ubicadas en hábitats con densidad de población máxima de 30 kg/m², físicamente separados por placas de acero inoxidable para prevenir la contaminación cruzada. Se proporcionó luz continua durante las dos primeras semanas, continuando con ciclos de luz intermitente hasta el término del experimento (6 semanas). La temperatura del galpón se mantuvo a 33°C ± 1°C durante los primeros 5 días del bioensayo, y fue reducida gradualmente a razón de 1°C por día hasta alcanzar los 24°C, temperatura que se conservó hasta el final del experimento (Cobb-vantress, 2013).

Todos los experimentos se realizaron utilizando un diseño de bloques completamente aleatorizados, considerando como variables de bloqueo la unidad experimental (pollo de engorda) y el tiempo de muestreo. Las aves ingresaron al galpón el primer día de vida, fueron pesadas individualmente y divididas aleatoriamente en ocho grupos de tratamiento. El número de aves por tratamiento se determinó según Rojo (2014), considerando el número de muestreos (seis muestreos para todos los tratamientos y tres pre-muestreos para los tratamientos de Control y Simbiótico), el número de réplicas (tres para cada tratamiento) y el porcentaje de mortalidad por tratamiento (Tabla I).

Tabla I. Número de pollos de engorda por tratamiento

| Grupo | Pollos |
|--|--------|
| Control | 43 |
| Simbiótico | 35 |
| Simbiótico + <i>S. Typhimurium</i> | 25 |
| <i>S. Typhimurium</i> | 30 |
| Simbiótico + <i>C. perfringens</i> | 25 |
| <i>C. perfringens</i> | 30 |
| Simbiótico + <i>S. Typhimurium</i> + <i>C. perfringens</i> | 25 |
| <i>S. Typhimurium</i> + <i>C. perfringens</i> | 45 |

Agua y alimento fueron proporcionados *ad libitum*. La dieta basal estuvo compuesta por una fórmula de inicio, administrada hasta los 21 días de vida y otra de continuación, administrada hasta el final del bioensayo; ambas con base de

sorgo y soya y siguiendo los requerimientos nutrimentales del suplemento del rendimiento y nutrición del pollo COBBAvian48 (Cobb-vantress, 2013), (Tabla II).

Tabla II. Ingredientes y composición bromatológica de las dietas basales administradas a los pollos de engorde

| Nutrimento (%) | Dieta de inicio | Dieta de continuación |
|--------------------------------------|------------------------|------------------------------|
| Ingrediente (g/Kg) | | |
| Sorgo | 640 | 690 |
| Soya | 255 | 210 |
| Pre-mezcla de vitaminas y minerales | 80 | 70 |
| Aceite de soya | 25 | 30 |
| Composición bromatológica (%) | | |
| Materia seca | 94.91 | 90.5 |
| Humedad | 5.09 | 9.5 |
| Cenizas | 7.10 | 6.3 |
| Proteína Cruda | 21.91 | 18.6 |
| Extracto etéreo | 6.02 | 6.13 |
| Fibra cruda | 2.90 | 3.1 |
| Elementos libres de Nitrógeno | 56.98 | 56.37 |
| Calcio | 0.98 | 0.74 |
| Fosforo | 0.48 | 0.40 |
| Energía Metabolizable (Mcal/kg) | 3.08 | 3.23 |

Se administró el esquema tradicional de vacunación contra la viruela aviar, Gumboro y Newcastle.

El simbiótico fue administrado en agua de bebida el primer día de vida de las aves, siguiendo las instrucciones del fabricante (abra y administre a las aves por vía oral) y considerando que el consumo promedio de agua a esa edad es de 1.12 mL/h; los bebederos inoculados estuvieron disponibles durante 2 h (Garden y Singleton, 2008).

El día 17 de vida, los pollos fueron desafiados oralmente con los microorganismos patógenos, inoculando 5 UFC de *S. Typhimurium* y/o 3 UFC de *C. perfringens* por ave de acuerdo al tratamiento (La Ragione *et al.*, 2004; Cooper *et al.*, 2013). La

administración se hizo en el agua de bebida, considerando que a los 17 días de vida los pollos de engorda consumen 25 mL/h; los bebederos se mantuvieron disponibles por un periodo de 2 h (Cooper *et al.*, 2013).

No hubo otros bebederos disponibles durante la administración de los tratamientos (simbiótico y microorganismos patógenos) y el consumo del agua inoculada fue fomentado mediante golpeteo en el bebedero y caminata por los pasillos del galpón por parte de los técnicos (Ganapathy *et al.*, 2010).

Las aves se mantuvieron bajo observación constante para detectar cualquier signo o síntoma de infección por *Salmonella* o enteritis necrótica subclínica (fiebre, acurrucamiento, diarrea, abatimiento, plumas erizadas, ojos cerrados, pérdida de apetito y sed).

6.3. Sacrificio, necropsia y toma de muestras

Se programaron seis muestreos con tres réplicas de cada tratamiento a los 18, 22, 25, 32, 36 y 39 días de vida. También, se realizaron tres pre-muestreos en los grupos Control y Simbiótico (a los 4, 8 y 15 días de vida) para conocer el estado de su morfología duodenal, contenido intestinal de las bacterias del ácido láctico y enterobacterias, y la ausencia o presencia de *S. Typhimurium* y *C. perfringens* antes de la inoculación de los microorganismos patógenos (Tabla III). Los resultados obtenidos de los pre-muestreos no fueron considerados para el análisis estadístico.

Cada pollo fue sedado con pentobarbital sódico intraperitoneal al 6.3% (PiSa[®] agropecuaria, Mex) a dosis de 3 mL / 2.5 kg (AVMA (American Veterinary Medical Association), 2013); se procedió a realizar punción cardíaca para obtener muestras de sangre (Valladares, 2014), que fueron depositadas en tubos de recolección con activador de coagulación aplicado por aspersion (Tapón rojo - BD Vacutainer[®]) y centrifugadas a 1,600 g/10 min para separar el suero, que se alicuotó y almacenó a – 80°C para su posterior análisis (ISBER, 2012).

Tabla III. Calendario de administración del simbiótico y microorganismos patógenos, sacrificios, necropsias y toma de muestras

| Semanas | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | | | | | |
|--|---------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----|----|----|----|----|
| <i>Tiempo de sacrificio</i> | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | |
| Días de vida | 1 | 4 | 8 | 15 | 17 | 18 | 22 | 25 | 32 | 36 | 39 |
| Control (CT) | [Necropsia] | | | | | | | | | | |
| Simbiótico (SB) | [Administración del simbiótico] | | | | | | | | | | |
| Simbiótico + <i>S. Typhimurium</i> (SBST) | [Administración del simbiótico] | | | | | | | | | | |
| Simbiótico + <i>C. perfringens</i> (SBSTCP) | [Administración del simbiótico] | | | | | | | | | | |
| Simbiótico + <i>S. Typhimurium</i> + <i>C. perfringens</i> (SBSTTCP) | [Administración del simbiótico] | | | | | | | | | | |
| <i>S. Typhimurium</i> (ST) | [Administración de patógenos] | | | | | | | | | | |
| <i>C. perfringens</i> (CP) | [Administración de patógenos] | | | | | | | | | | |
| <i>S. Typhimurium</i> + <i>C. perfringens</i> (STCP) | [Administración de patógenos] | | | | | | | | | | |

Necropsia
 Administración del simbiótico
 Administración de patógenos

A continuación, los cadáveres fueron mojados con una solución de alcohol al 70 % y colocados en posición decúbito dorsal para iniciar la necropsia haciendo una incisión desde la parte ventral del pico hasta la punta del esternón, por la línea media y continuando por ambos lados hasta las piernas por la parte ventral. A partir de la incisión, la piel fue separada del tejido subcutáneo hacia ambos lados, hasta exponer los órganos cervicales y las masas musculares de tórax, abdomen y piernas. En este punto, se revisó por inspección y palpación el timo, para proceder con su extracción (Valladares, 2014).

Una segunda incisión fue realizada para exponer las vísceras, cortando con las tijeras de necropsias los huesos pectorales desde la punta del esternón hacia ambos lados de la pechuga en dirección caudo – craneal hasta la articulación clavicular, para desprender las articulaciones de un lado y desplazar la pechuga hacia arriba exponiendo la cavidad toracoabdominal; el corte central se continuó desde la punta del esternón a través de la pared abdominal ventral hacia la cloaca,

dejando expuestos los órganos (duodeno, colon, ramas ileocecales, bolsa de Fabricio y bazo) para su extracción (Valladares, 2014).

El contenido de las asas duodenales, ramas ileocecales y colon fue recolectado en frascos estériles evaluar el efecto antagónico del simbiótico *in vivo*. Se registró el peso de la bolsa de Fabricio y el bazo. Muestras de duodeno, bolsa de Fabricio, timo y bazo, fueron almacenadas en formalina al 10 % para estudiar las modificaciones histopatológicas en intestino y órganos linfoides.

6.4. Eficiencia productiva

Para evaluar el peso corporal, las aves se pesaron individualmente una vez por semana a la misma hora y previo abasto.

Por su parte, el alimento rechazado fue pesado diariamente para determinar consumo diario individual.

El índice de conversión alimenticia se calculó como la relación entre el alimento consumido y el peso ganado, como una medida de la eficiencia con la que un ave utiliza la energía y los nutrimentos del alimento para su crecimiento. Se consideró que los pollos con menor índice de conversión alimenticia tuvieron un mejor desempeño (Librera, J. E., Di Masso, R.J., Canet, Z.E., Font, M.T., Dottavio, 2003; Erdoğan *et al.*, 2010; Stanley *et al.*, 2012a).

6.5. Efecto antagónico del simbiótico

Para conocer el efecto antagónico del simbiótico se evaluó la presencia de *S. Typhimurium* y *C. perfringens* de forma cualitativa y se realizaron recuentos de bacterias ácido lácticas y enterobacterias a partir de las heces de las aves.

6.5.1. *Salmonella* Typhimurium

El análisis para evaluar la presencia de *Salmonella* se hizo a partir de 1 g de heces provenientes del colon y ramas ileocecales, usando agua peptonada tamponada (Cat. No. DF1810-17-9, BD, NJ) como medio de pre – enriquecimiento, incubada a 35 °C de 12 a 24 h; para el enriquecimiento se transfirió 1 mL del pre-

enriquecimiento a caldo Rappaport Vassiliadis (Cat. No. 218581, BD) y a caldo tetrionato (Bioxon®) (Cat. No. 210430, BD), incubando de 12 a 24 h, el primero en baño maría a 41.5 °C y el segundo en incubadora a 35 °C. El aislamiento se realizó por duplicado en Agar XLT4 (Cat. No. 223420, BD) y Agar HE (Cat. No. 254009.08, BD), incubando de 18 – 24 h/35 °C. De cada placa (XLT4 y HE Agar), fueron seleccionadas de tres a cinco colonias características:

XLT4: colonias amarillas o rojas con centro negro.

EH: colonias de color verde a azul verdoso con centro negro.

La identificación se hizo mediante tinción de gram, oxidasa, catalasa, triple azúcar hierro (Cat. No. 221038, BD), lisina – hierro (Cat. No. 284920, BD), citrato (Cat. No. L007504, BD), movilidad – indol - ornitina (Cat. 221518, BD) y caldo de urea (Cat. 51463-500G, Merck, Alemania) azufre – hierro – movilidad (SIM) y urea. Las cepas que mostraron reacciones bioquímicas típicas de *Salmonella* fueron sembradas en agar de soya tripticasa (Cat. No. 236940, BD) y serotipificadas con suero polivalente aglutinante (A-Vi Difco, Franklin Lakes, NJ) (Marín y Láinez, 2005; Mikoleit, 2010).

6.5.2. *Clostridium perfringens*

C. perfringens se aisló a partir del contenido de colon y ramas ileocecales, del cual se añadió 1 g a 20 mL de caldo de tioglicolato (nº de catálogo 225710, BD) como medio de enriquecimiento, el cual fue calentado en baño maría a 70 °C/20 min y posteriormente incubado en jarra de anaerobiosis con sobre de GasPack (Cat. No. 260626, BD) a 35 °C/24 h. El aislamiento se hizo por cuadruplicado en agar de triptosa – cicloserina – sulfito (TSC) (Cat. 111972, Merk) incubando a 35 °C/36 a 48 h en anaerobiosis.

Las colonias típicas (negras y con 2 a 4 mm de zona blanca opaca alrededor de la colonia como resultado de la actividad de la lecitinasa) fueron sometidas a pruebas bioquímicas: tinción de Gram, oxidasa (Cat. 261181, BD), catalasa (Cat. 131510, Jaloma, México), Triple Azúcar Hierro (Cat. 221038, BD) y fermentación

tormentosa de la leche, para confirmar la presencia de *C. perfringens* (Heikinheimo *et al.*, 2006).

6.5.3. Bacterias ácido lácticas

Para el recuento de las bacterias ácido lácticas, se obtuvo 1 g de heces provenientes de las asas duodenales, para hacer diluciones decimales en peptona al 1 % (Cat. No. 211684, BD) e inocular mediante la técnica de extensión por superficie en placas de agar Man – Rogosa – Sharpe (MRS) (Cat. No. 288210, BD), incubando a 35 °C/48 h en condiciones de microaerofilia. Finalmente se contaron las colonias presentes y se caracterizaron morfológicamente. Para la identificación se hizo tinción Gram, prueba de oxidasa y catalasa; aquellas colonias con el perfil característico para bacterias ácido lácticas, fueron identificadas mediante fermentación de hidratos de carbono a través del sistema miniaturizado API 50CHL Cat. No. 50410, bioMérieux, Francia)(Mookiah *et al.*, 2014).

6.5.4. Enterobacterias

Las enterobacterias también fueron enumeradas mediante la técnica de extensión por superficie a partir del contenido del colon y ramas ileocecales, con el que se realizaron diluciones decimales en peptona al 1 % (Cat. No. 211684, BD) y se inocularon placas Petrifilm para el recuento de *Enterobacteriaceae* (Cat. No. 70-2006-7092-8, 3M, MN), incubando a 35 °C/24 h. Concluido el tiempo de incubación, se contaron las colonias con morfología característica para enterobacterias (colonias rojas, rodeadas por una zona amarilla con o sin burbuja de gas) y se identificaron mediante tinción Gram, prueba de oxidasa, catalasa, movilidad – indol – ornitina, rojo de metilo – voges proskawer y citrato.

6.6. Modificaciones histopatológicas

Los órganos obtenidos durante los sacrificios (duodeno, bolsa de Fabricio, timo, y bazo) fueron procesados mediante la técnica histológica de inmersión en parafina y teñidos con hematoxilina / eosina.

Para fijar la muestra se utilizó formaldehído al 10 %. Se realizaron los cortes de acuerdo al tejido para ser deshidratados en el procesador de tejidos (Histokinette modelo STP – 120, Microm) bajo el protocolo establecido en la Tabla IV.

Tabla IV. Protocolo de deshidratación para los tejidos de las aves en el Histokinette modelo STP – 120

| Número de vaso | Reactivo | Tiempo de Inmersión h : min |
|----------------|---------------|--------------------------------|
| 1 | Formol | 1 |
| 2 | Alcohol 70 % | 1:30 |
| 3 | Alcohol 80% | 1:30 |
| 4 | Alcohol 96% | 1:30 |
| 5 | Alcohol 96% | 1:30 |
| 6 | Alcohol 96% | 1:00 |
| 7 | Alcohol 100% | 1:00 |
| 8 | Alcohol 100% | 1:00 |
| 9 | Xilol/alcohol | 1:30 |
| 10 | Xilol | 1:30 |
| 11 | Parafina | 2:00 |
| 12 | Parafina | 2:00 |

La inclusión y bloqueo en parafina fue en Paraplast (Merck) con punto de fusión de 52 – 54 °C. El corte se realizó con un micrótopo de rotación modelo RM 2125 RT (Leica), obteniendo cortes de 4 – 6 micras, que fueron adheridos al portaobjetos con albúmina de mayer y sometidos a 50 °C para retirar los restos de parafina.

Para teñir los tejidos se llevó a cabo una tinción rutinaria con hematoxilina y eosina y para el montaje se utilizó resina sintética diluida en xilol.

Una vez montados y teñidos, los tejidos fueron observados al microscopio (Microscopio óptico modelo E200 LED, Nikon, Tokio), fotografiados (cámara digital LED, Nikon) y analizados (software Motic Images Plus 2.0, Motic, Hong Kong).

Las muestras de duodeno fueron observadas con objetivo panorámico 4X. Para lo cual fueron seleccionadas de forma aleatoria nueve vellosidades por tiempo de muestreo y tratamiento para evaluar espesor de la mucosa (desde la lámina propia hasta el ápice de las vellosidades), altura de las vellosidades (desde el ápice de

las vellosidades hasta la unión de estas con la cripta) y profundidad de la cripta (profundidad de invaginación entre las vellosidades adyacentes).

Una vez obtenidas las mediciones, se calculó el índice vellosidad – cripta (IVC) dividiendo la variable longitud de las vellosidades entre la profundidad de la cripta (Pelicano *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2016).

Con respecto a los órganos linfoides, se evaluaron nueve folículos de la bolsa de Fabricio y nueve del timo, correspondientes a tres aves por tratamiento y tiempo. Fueron observados con objetivo panorámico 4X. Los folículos fueron elegidos para su análisis cuando el corte del microtomo pasó a través de su área central. El área folicular medular fue determinada por una línea que cruza la membrana basal que divide las dos áreas foliculares. La corteza folicular se determinó como el área folicular total menos el área medular en cada folículo (Muniz *et al.*, 2006).

Como parte de la evaluación, se realizaron recuentos de linfocitos utilizando el objetivo panorámico 100X. Para la bolsa de Fabricio y el timo se contaron cuatro campos por folículo, dos en la corteza y dos en la médula. Para el bazo, se contaron los linfocitos maduros presentes en la pulpa blanca, reportando todos encontrados por campo (nueve campos por muestra). El campo fue elegido en el área adyacente a un vaso sanguíneo de pequeño calibre dentro de la pulpa blanca.

Por último, todos los tejidos fueron sometidos a un análisis cualitativo utilizando los objetivos 4X, 10X y 40X.

También fue obtenido el peso de la bolsa de Fabricio y del bazo; y fue calculado su índice morfométrico (Tambini *et al.*, 2010):

$$\text{Índice morfométrico} = \frac{\text{Peso del órgano (g)}}{\text{Peso corporal (g)}} \times 1000$$

6.7. Efecto sobre las inmunoglobulinas

La cuantificación de inmunoglobulinas se realizó a partir de suero, bajo la técnica de ELISA (enzyme – linked immunosorbent assay), por duplicado y apegándose al protocolo del Chicken ELISA kit de abcam IgA (Cat. No. 157691, abcam, UK), IgM (Cat. No. 214568, abcam) e IgY (Cat. No. 157593, abcam); para lo cual, las muestras fueron diluidas en diluyente 1X (abcam) y colocadas en los pozos de la placa, se incubó en oscuridad a temperatura ambiente por 20 min, para IgA y 30 min para IgY e IgM. Una vez concluido el tiempo de incubación, el contenido de los pozos fue aspirado y se realizaron tres enjuagues con el Buffer de lavado 1X (abcam), después de remover el Buffer, se agregó el conjugado enzima – anticuerpo 1X (abcam) a cada pozo y se incubó en oscuridad, a temperatura ambiente durante 20 min para IgA y 30 min para IgY e IgM, al cabo del tiempo de incubación, fueron realizados tres lavados con el Buffer de lavado 1X (abcam) y se añadió la solución sustrato TMB (abcam) a cada pozo, dejando incubar en oscuridad por 10 min, concluido el tiempo se agregó la solución de paro (abcam) y se determinó la absorbancia a 450 nm.

6.8. Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó mediante el paquete estadístico Statistica 10 (TIBCO Statistica, Palo Alto, CA), aplicando las pruebas ANOVA, MANOVA, Tukey y Chi². Los resultados obtenidos se presentaron como medias, desviaciones estándar (DE) y un valor de p inferior a 0.05 ($p < 0,05$) se consideró significativo cuando fue pertinente. También, fueron realizados un análisis de componentes principales y uno de conglomerados jerárquicos para analizar el comportamiento de las variables y estimar las relaciones entre los tratamientos.

7. RESULTADOS

Se investigó el efecto de un simbiótico compuesto por *L. rhamnosus* HN001, *P. acidilactici* MA18/5M y fructanos de *Agave tequilana*, sobre la eficiencia productiva, la microbiota intestinal, la concentración sérica de inmunoglobulinas y la morfología duodenal y de órganos linfoides, en pollos de engorda infectados con *S. Typhimurium* y *C. perfringens*.

Al final del bioensayo, ningún pollo murió a causa de la infección por *S. Typhimurium* y/o *C. perfringens*, sin embargo, se observaron signos relacionados con la colonización de estos patógenos. Los pollos de los grupos *S. Typhimurium* y *S. Typhimurium* + *C. perfringens* presentaron fiebre, acurrucamiento, diarrea, abatimiento, pérdida de apetito y sed. Estos signos no aparecieron en los grupos Simbiótico + *S. Typhimurium* o Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens* después de los 22 días. Los pollos del grupo *C. perfringens* presentaron acurrucamiento, diarrea y abatimiento hasta el día 25; el único signo para el grupo Simbiótico + *C. perfringens* fue acurrucamiento, y estuvo presente hasta el día 22.

7.1. Eficiencia productiva

El peso corporal, la ingesta de alimento y el índice de conversión alimenticia fueron evaluados cada semana durante 6 semanas, pues tradicionalmente las aves son llevadas al rastro entre los 36 y 42 días de vida.

El peso inicial (día 1) osciló entre 35 y 55 g para todos los grupos ($p > 0.05$).

A los siete días de vida, se observó un ligero incremento de peso en los grupos tratados con el simbiótico (153 a 164 g) en comparación con los grupos no tratados (147 a 155 g), sin embargo, dicha diferencia no fue significativa ($p > 0.05$) (Tabla V).

A lo largo del bioensayo, no hubo diferencias significativas en el peso corporal, ingesta de alimento o índice de conversión alimenticia ($p > 0.05$), de los pollos tratados o no con el simbiótico (Tabla V y Tabla VI).

Tabla V. Efecto del simbiótico sobre el peso corporal de pollos retados con *Salmonella Typhimurium* y *Clostridium perfringens*

| Tx ¹ | Peso corporal (g) ± desviación estándar | | | | | | | |
|-----------------|---|------|--------|--------|----------------------|----------|----------|----------|
| | Días | 1 d | 7 d | 14 d | 21 d | 28 d | 35 d | 42 d |
| CT | | 43±3 | 147±12 | 424±36 | 738±74 ^a | 1148±125 | 1734±199 | 2416±330 |
| SB | | 44±3 | 162±13 | 432±31 | 799±54 | 1175±70 | 1848±94 | 2550±26 |
| SBST | | 44±4 | 162±2 | 448±50 | 779±97 | 1185±122 | 1740±197 | 2588±107 |
| ST | | 44±3 | 152±14 | 437±63 | 747±153 | 1071±236 | 1836±186 | 2491±168 |
| SBCP | | 44±3 | 164±18 | 460±53 | 847±116 ^b | 1306±83 | 1969±176 | 2693±135 |
| CP | | 44±3 | 161±12 | 465±40 | 800±70 | 1271±114 | 1936±219 | 2696±360 |
| SBSTCP | | 44±3 | 153±12 | 440±39 | 812±71 | 1206±143 | 1860±204 | 2295±211 |
| STCP | | 46±5 | 155±17 | 438±51 | 794±96 | 1211±166 | 1780±147 | 2453±183 |

¹ Tx – Tratamiento: CT: Control; SB: Simbiótico; SBST: Simbiótico + *S. Typhimurium*; ST: *S. Typhimurium*; SBCP: Simbiótico + *C. perfringens*; CP: *C. perfringens*; SBSTCP: Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens*; STCP: *S. Typhimurium* + *C. perfringens*.

Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

7.2. Efecto antagónico del simbiótico

La presencia de *S. Typhimurium* y *C. perfringens* fue evaluada de forma cualitativa a partir del contenido de las ramas ileocecales. En las muestras tomadas previo a la administración de los patógenos (18 días de vida) no fueron aislados ninguno de los dos patógenos.

El aislamiento de *S. Typhimurium* fue significativamente menor ($p < 0.05$) en los grupos tratados con el simbiótico (Simbiótico + *S. Typhimurium* y Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens*) al ser comparado con los no tratados (*S. Typhimurium*, *C. perfringens* y *S. Typhimurium* + *C. perfringens*). No hubo diferencias en el aislamiento de *C. perfringens* entre los grupos tratados o no con el simbiótico ($p > 0.05$) (Fig. 2).

Tabla VI. Efecto del simbiótico sobre la conversión alimenticia de pollos de engorda retados con *Salmonella Typhimurium* y *Clostridium perfringens*

| Tx ¹ | Conversión alimenticia | | | | | | | |
|-----------------|------------------------|------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| | Días | 1-7d | 8-14d | 15-21d | 22-28d | 29-35d | 36-42d | 1-42d |
| CT | | 0.94 | 0.50 | 0.27 | 0.21 | 0.18 | 0.10 | 2.27 |
| SB | | 1.02 | 0.50 | 0.31 | 0.19 | 0.19 | 0.11 | 2.41 |
| SBST | | 0.90 | 0.50 | 0.27 | 0.19 | 0.16 | 0.12 | 2.23 |
| ST | | 0.83 | 0.49 | 0.26 | 0.17 | 0.20 | 0.12 | 2.15 |
| SBCP | | 0.92 | 0.51 | 0.31 | 0.20 | 0.18 | 0.10 | 2.29 |
| CP | | 0.89 | 0.52 | 0.26 | 0.22 | 0.18 | 0.12 | 2.26 |
| SBSTCP | | 0.83 | 0.50 | 0.30 | 0.19 | 0.18 | 0.08 | 2.18 |
| STCP | | 0.88 | 0.50 | 0.29 | 0.19 | 0.16 | 0.10 | 2.16 |

¹ Tx – Tratamiento: CT: Control; SB: Simbiótico; SBST: Simbiótico + *S. Typhimurium*; ST: *S. Typhimurium*; SBCP: Simbiótico + *C. perfringens*; CP: *C. perfringens*; SBSTCP: Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens*; STCP: *S. Typhimurium* + *C. perfringens*.

También fueron realizados recuentos de bacterias ácido lácticas a partir del contenido de las asas duodenales, donde la media para las pre-muestras (4, 8 y 15 días de vida) fue de 5.3 log UFC/g para el grupo Control y de 5 log UFC/g para el Simbiótico.

No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el número de bacterias ácido lácticas de los diferentes tratamientos hasta el día 36, donde los pollos infectados con *S. Typhimurium* tuvieron recuentos inferiores ($p < 0.05$) (4.6 ± 1 log UFC/g) a los grupos Simbiótico (6.5 ± 0.7 log UFC/g), Simbiótico + *C. perfringens* (6.3 ± 0.1 log UFC/g) y Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens* (6.5 ± 0.1 log UFC/g); y en el día 39, donde los pollos del grupo Simbiótico (6.5 ± 0.4 log UFC/g) mostraron recuentos superiores ($p < 0.05$) a los del grupo Control (4.1 ± 1.6 log UFC/g), Simbiótico + *S. Typhimurium* (3.9 ± 0.3 log UFC/g) y Simbiótico + *C. perfringens* (3.9 ± 0.3 log UFC/g) (Tabla VII).

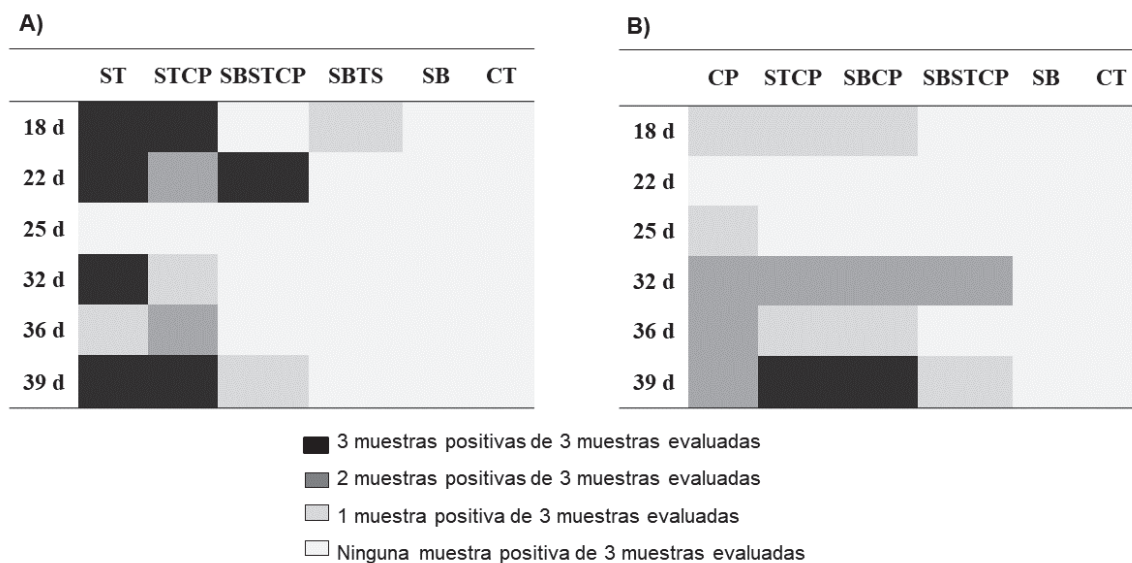


Figura 2. Efecto del simbiótico sobre el aislamiento de *Salmonella* Typhimurium y *Clostridium perfringens* a partir del contenido de las ramas ileocecales de pollos de engorda inoculados. A) aislamiento de *S. Typhimurium*, B) aislamiento de *C. perfringens*

¹CT: Control; SB: Simbiótico; SBST: Simbiótico + *S. Typhimurium*; ST: *S. Typhimurium*; SBCP: Simbiótico + *C. perfringens*; CP: *C. perfringens*; SBSTCP: Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens*; STCP: *S. Typhimurium* + *C. perfringens*.

Se identificaron un total de 110 cepas de bacterias ácido lácticas de pollos con y sin tratamiento simbiótico. En todos los tratamientos se encontraron ocho especies de *Lactobacillus* (*L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. crispatus*, *L. plantarum*, *L. lactis* y *L. salivarius*). *L. rhamnosus* y *L. curvatus* fueron aislados únicamente de pollos tratados con el simbiótico; por su parte, el aislamiento de *L. mesenteroides*, *L. pentosus* y *L. buchneri* fue reportado únicamente en pollos a los que el simbiótico no les fue administrado (Tabla VIII).

Tabla VII. Efecto del simbiótico sobre recuentos de bacterias ácido lácticas duodenales de pollos de engorda retados con *Salmonella* Typhimurium y *Clostridium perfringens*

| Tratamientos | Medias (Log ₁₀ UFC/g) ± Desviación Estándar | | | | | | |
|--------------|--|---------|---------|---------|---------|-----------------------|-----------------------|
| | Días | 18 d | 22 d | 25 d | 32 d | 36 d | 39 d |
| CT | | 5.8±0.7 | 6.3±0.4 | 5.8±1.7 | 5.3±0.9 | 5.6± 0.4 | 4.1± 1.6 ^a |
| SB | | 5.0±1.9 | 6.2±1.0 | 5.6±1.3 | 5.2±1.3 | 6.5± 0.7 ^a | 6.5± 0.4 ^b |
| SBST | | 6.7±0.3 | 5.6±0.4 | 5.1±1.2 | 4.4±1.0 | 5.5± 0.2 | 3.9± 0.3 ^a |
| ST | | 5.0±1 | 5.3±1 | 4.0±0.6 | 4.5±1.2 | 4.6± 1.0 ^b | 5.4± 0.8 |
| SBCP | | 4.7±1.6 | 4.9±1.6 | 3.7±0.8 | 5.9±0.2 | 6.3± 0.1 ^a | 3.9± 0.3 ^a |
| CP | | 5.9 | 5.3 | 4.2±1.9 | 4.5±1.2 | 5.2± 0.3 | 5.4± 0.3 |
| SBSTCP | | 4.4±0.7 | 6.0±0.7 | 4.9±0.4 | 5.0±0.8 | 6.5± 0.1 ^a | 5.2± 0.6 |
| STCP | | 4.8±1.6 | 5.7±1.6 | 4.8±0.8 | 4.2±0.2 | 5.2± 0.1 | 4.9± 0.3 |

¹CT: Control; SB: Simbiótico; SBST: Simbiótico + *S. Typhimurium*; ST: *S. Typhimurium*; SBCP: Simbiótico + *C. perfringens*; CP: *C. perfringens*; SBSTCP: Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens*; STCP: *S. Typhimurium* + *C. perfringens*.

Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos (* $p < 0.05$).

Tabla VIII. Especies de bacterias ácido lácticas, recuperadas de las asas duodenales de pollos tratados y no tratados con el simbiótico

| Pollos tratados con el simbiótico | Pollos no tratados con el simbiótico |
|-----------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | <i>Lactobacillus pentosus</i> |
| <i>Lactobacillus curvatus</i> | <i>Lactobacillus buchneri</i> |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | <i>Lactobacillus fermentum</i> |
| <i>Lactobacillus brevis</i> | <i>Lactobacillus acidophilus</i> |
| <i>Lactobacillus crispatus</i> | <i>Lactobacillus brevis</i> |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | <i>Lactobacillus crispatus</i> |
| <i>Lactococcus lactis</i> | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| <i>Lactobacillus salivarius</i> | <i>Lactococcus lactis</i> |
| | <i>Lactobacillus salivarius</i> |

El análisis de entero se realizó a partir del contenido cecal de los pollos. En general, los recuentos de entero bacterias del grupo Simbiótico fueron inferiores a los del grupo Control, sin embargo, dicha diferencia no fue significativa hasta el día 32, donde los grupos Control (8.1 ± 0.3 log UFC/g) y *S. Typhimurium* (8.1 ± 0.1 log UFC/g) exhibieron recuentos superiores ($p < 0.05$) al resto de los grupos ($6-7.9 \pm 0.4$ log UFC/g); el grupo *C. perfringens* presentó los recuentos más bajos (6 ± 0.3 log UFC/g), con tendencias similares observadas hasta el final del experimento (Tabla IX).

Tabla IX. Efecto del simbiótico sobre recuentos de enterobacterias cecales de pollos de engorda retados con *Salmonella Typhimurium* y *Clostridium perfringens*

| Tratamientos | Medias (Log ₁₀ UFC/g) ± Desviación Estándar | | | | | | |
|--------------|--|---------|---------|---------|----------------------|----------------------|---------|
| | Días | 18 d | 22 d | 25 d | 32 d | 36 d | 39 d |
| CT | | 8.4±0.3 | 7.2±1.4 | 8.2±0.4 | 8.1±0.3 ^c | 8±0.5 ^a | 7.9±0.1 |
| SB | | 6.1±1.6 | 7.8±0.1 | 8.0±0.6 | 7.9±0.2 ^b | 8.6±0.3 ^c | 7.6±1 |
| SBST | | 8±0.4 | 7.5±0.3 | 8.2±0.5 | 7.2±0.7 ^a | 7.7±0.5 ^a | 7.3±1.1 |
| ST | | 8.2±0.5 | 8.1±0.4 | 8.0±0.3 | 8.1±0.1 ^c | 8.0±0.1 ^a | 7.3±0.8 |
| SBCP | | 7.9±0.1 | 7.5±0.9 | 8.1±0.2 | 7.2±0.4 ^b | 7.9±0.8 ^a | 8.6±0.2 |
| CP | | 6.5±0.5 | 7.9±0.1 | 8.3±0.4 | 6±0.3 ^b | 7.1±0.6 ^b | 6.8±0.4 |
| SBSTCP | | 7.3±1.6 | 8.3±0.5 | 8.1±0.7 | 7.8±0.3 ^b | 7.6±0.6 ^a | 7.8±0.8 |
| STCP | | 8.5±0.1 | 7.9±0.9 | 7.2±0.2 | 7.1±0.5 ^a | 7.7±0.5 ^a | 8.0±0.5 |

¹CT: Control; SB: Simbiótico; SBST: Simbiótico + *S. Typhimurium*; ST: *S. Typhimurium*; SBCP: Simbiótico + *C. perfringens*; CP: *C. perfringens*; SBSTCP: Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens*; STCP: *S. Typhimurium* + *C. perfringens*.

*Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos

7.3. Modificaciones histopatológicas

7.3.1. Duodeno

La morfología duodenal de los pollos de engorda, con base en el grosor de la mucosa, la longitud de las vellosidades, profundidad de las criptas e índice vellosidad / cripta, fue evaluada a los 18 (24 h después de la inoculación de *C. perfringens* y *S. Typhimurium*) y 39 días.

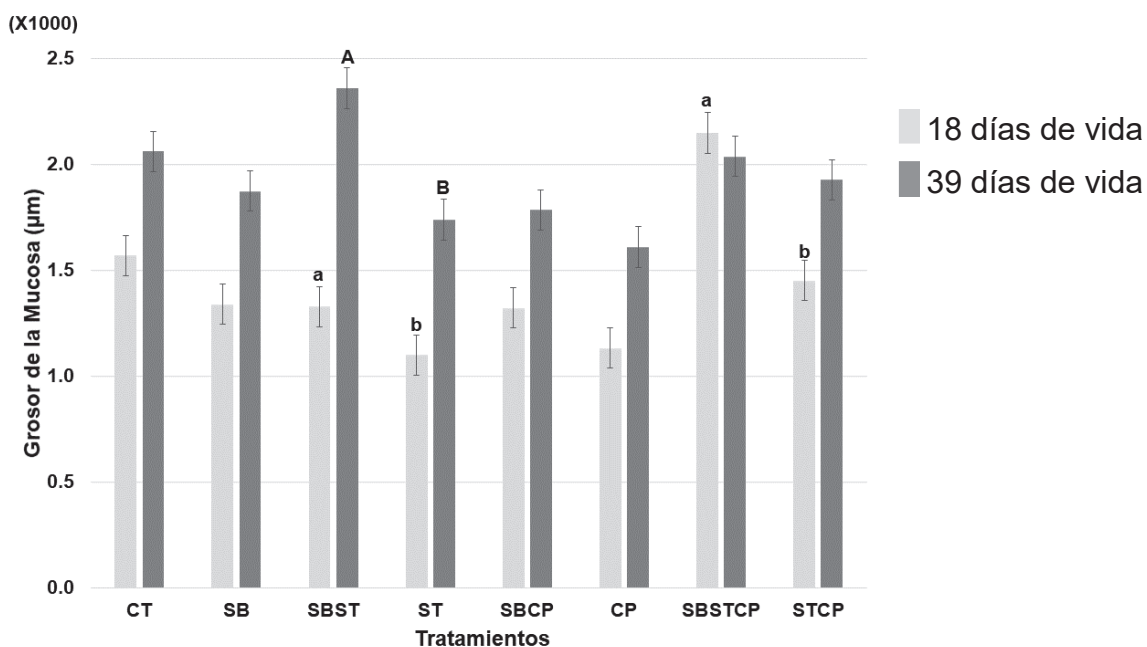


Figura 3. Efecto del simbiótico sobre la mucosa duodenal de pollos de engorda retados con *Salmonella Typhimurium* y *Clostridium perfringens*

CT: Control; SB: Simbiótico; SBST: Simbiótico + *S. Typhimurium*; ST: *S. Typhimurium*; SBSTCP: Simbiótico + *C. perfringens*; CP: *C. perfringens*; SBSTCP: Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens*; STCP: *S. Typhimurium* + *C. perfringens*.

Columnas con diferentes superíndices (a – b o A – B) son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Con respecto a la mucosa duodenal, el grosor medio encontrado en las premuestras fue de $734.7 \pm 191.3 \mu\text{m}$ para grupo Control, y de $622.86 \pm 61.3 \mu\text{m}$

para el Simbiótico. La mucosa del grupo Simbiótico + *S. Typhimurium* fue más gruesa ($p < 0.05$) que la del grupo *S. Typhimurium* a los 18 ($1,328.5 \pm 95.2 \mu\text{m}$ vs $1,099.9 \pm 95.2 \mu\text{m}$) y 39 días ($2,358.7 \pm 95.2 \mu\text{m}$ vs $1,738.4 \pm 95.2 \mu\text{m}$), y que la del grupo *S. Typhimurium* + *C. perfringens* el día 18 ($2,147.8 \pm 95.2 \mu\text{m}$ vs $1,450.2 \pm 95.2 \mu\text{m}$) (Fig. 3).

El promedio de longitud de las vellosidades duodenales de las premuestras fue de $594.2 \pm 91.7 \mu\text{m}$ en el grupo Control y de $527.8 \pm 50.8 \mu\text{m}$ para el Simbiótico.

En los grupos inoculados con los patógenos, la longitud de las vellosidades de aquellos tratados con el simbiótico fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en comparación con los controles respectivos, a los 39 días, tanto para el grupo de *S. Typhimurium* ($2,055.1 \pm 85.8 \mu\text{m}$ vs $1,410.6 \pm 85.8 \mu\text{m}$), como en el grupo de *S. Typhimurium* + *C. perfringens* ($1,807 \pm 85.8 \mu\text{m}$ vs $1,494.4 \pm 85.8 \mu\text{m}$) (Fig. 4).

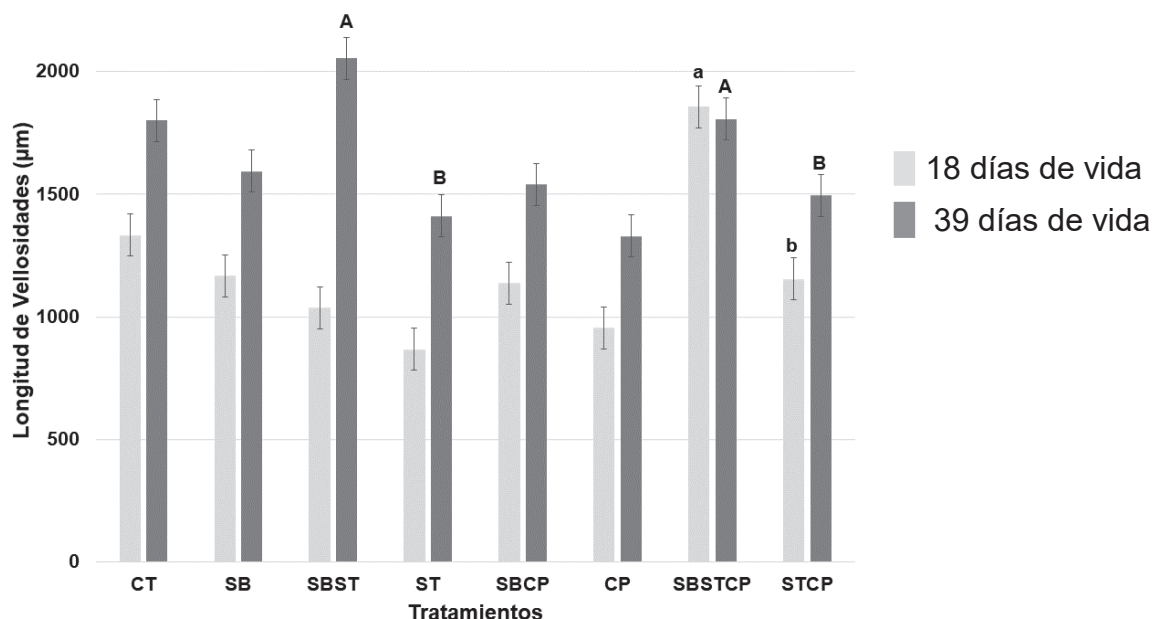


Figura 4. Efecto del simbiótico sobre la longitud de las vellosidades duodenales de pollos de engorda retados con *Salmonella Typhimurium* y *Clostridium perfringens*. CT: Control; SB: Simbiótico; SBST: Simbiótico + *S. Typhimurium*; ST: *S. Typhimurium*; SBCP: Simbiótico + *C. perfringens*; CP: *C. perfringens*; SBSTCP: Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens*; STCP: *S. Typhimurium* + *C. perfringens*.

Columnas con diferentes superíndices (a – b o A – B) son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En cuanto a la profundidad de las criptas, el promedio para las premuestras fue de $140.5 \pm 20.2 \mu\text{m}$ para el grupo Control y de $95 \pm 17.8 \mu\text{m}$ para Simbiótico.

A los 39 días, las criptas del grupo Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens* fueron menos profundas que las del *S. Typhimurium* + *C. perfringens* ($230 \pm 24.9 \mu\text{m}$ vs $433 \pm 24.9 \mu\text{m}$) (Fig. 5).

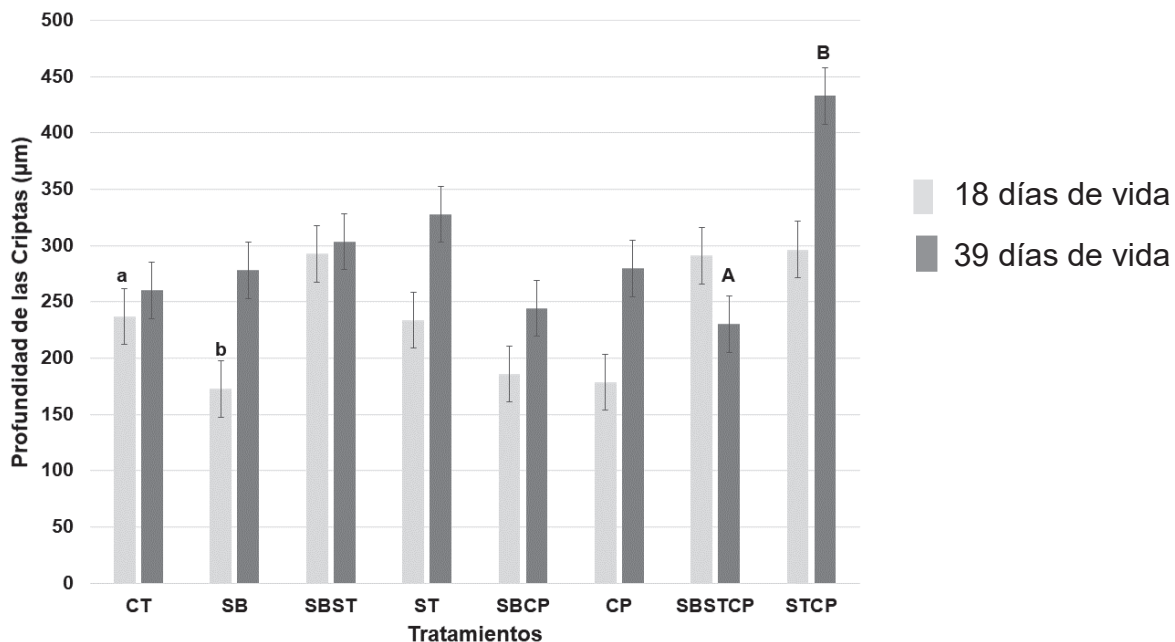


Figura 5. Efecto del simbiótico sobre la profundidad de las criptas de la mucosa duodenal, de pollos de engorda retados con *Salmonella Typhimurium* y *Clostridium perfringens*

CT: Control; SB: Simbiótico; SBST: Simbiótico + *S. Typhimurium*; ST: *S. Typhimurium*; SBSTCP: Simbiótico + *C. perfringens*; CP: *C. perfringens*; SBSTCP: Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens*; STCP: *S. Typhimurium* + *C. perfringens*.

Columnas con diferentes superíndices (a – b o A – B) son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Los valores de la longitud de las vellosidades y la profundidad de las criptas fueron utilizados para calcular el índice vellosidad/cripta, cuyo valor promedio en los muestreos fue de 3.9 ± 0.9 para el grupo Control y de 5 ± 1.2 para Simbiótico.

El índice velloidad / cripta del Simbiótico fue significativamente superior ($p < 0.05$) al Control a los 18 días (7 ± 0.5 vs 5.7 ± 0.5) sin embargo, al final del experimento (día 39) el del Control fue superior al Simbiótico (7.2 ± 0.5 vs 5.9 ± 0.5).

Con respecto a los grupos inoculados con patógenos, aquellos tratados con el simbiótico mostraron índices velloidad / cripta superiores ($p < 0.05$) a sus grupos controles: *S. Typhimurium* (7.1 ± 0.5 vs 4.4 ± 0.5), *C. perfringens* (7.1 ± 0.5 vs 4.8 ± 0.5) y *S. Typhimurium* + *C. perfringens* (7.9 ± 0.5 vs 4 ± 0.5) (Fig. 6).

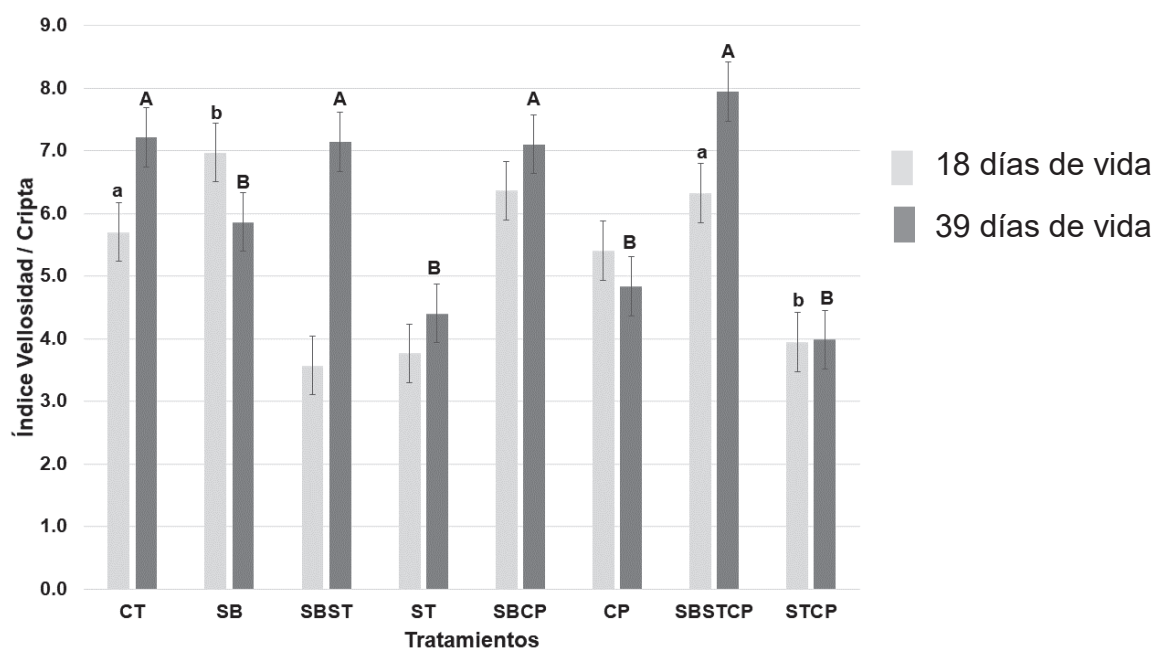


Figura 6. Efecto del simbiótico sobre el índice velloidad/cripta de la mucosa duodenal, de pollos de engorda retados con *Salmonella Typhimurium* y *Clostridium perfringens*

CT: Control; SB: Simbiótico; SBST: Simbiótico + *S. Typhimurium*; ST: *S. Typhimurium*; SBSTCP: Simbiótico + *C. perfringens*; CP: *C. perfringens*; SBSTCP: Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens*; STCP: *S. Typhimurium* + *C. perfringens*.

Columnas con diferentes superíndices (a – b o A – B) son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

No se observaron diferencias significativas en ninguna de las características morfológicas mencionadas entre los grupos Simbiótico + *C. perfringens* y *C.*

perfringens (Fig. 3 - 6). Además de la morfología duodenal, se realizó un análisis cualitativo para evaluar las lesiones histopatológicas presentes en la mucosa duodenal de los pollos. No se encontraron lesiones histopatológicas en los grupos Control y Simbiótico (Fig. 7A y C).

Los pollos retados con *S. Typhimurium* mostraron hiperplasia epitelial multifocal con degeneración de la mucosa (Fig. 7B), infiltración de linfocitos y vellosidades congestionadas a partir del día 22 y hasta el final del bioensayo (39 días), pero aquellos que recibieron el simbiótico no mostraron signos de lesión a partir del día 32. De manera similar, los pollos retados con *C. perfringens* mostraron infiltración de linfocitos (Fig. 7D), vellosidades hemorrágicas (Fig. 7E) y necrosis multifocal discreta de la mucosa desde el día 25 hasta el final del bioensayo, mientras que los que recibieron el simbiótico no mostraron necrosis de la mucosa en ningún muestreo, ni signos de lesión a partir del día 32.

Las aves inoculadas con *S. Typhimurium* + *C. perfringens* presentaron todas las lesiones descritas anteriormente, así como vellosidades congestionadas (Fig. 7F), (lesión no observada en las aves retadas con solo uno de los patógenos), desde el día 22 hasta el final del experimento.

Los pollos retados con ambos patógenos y tratados con el simbiótico sólo exhibieron estas lesiones el día 22 y 25, y no presentaron vellosidades hemorrágicas.

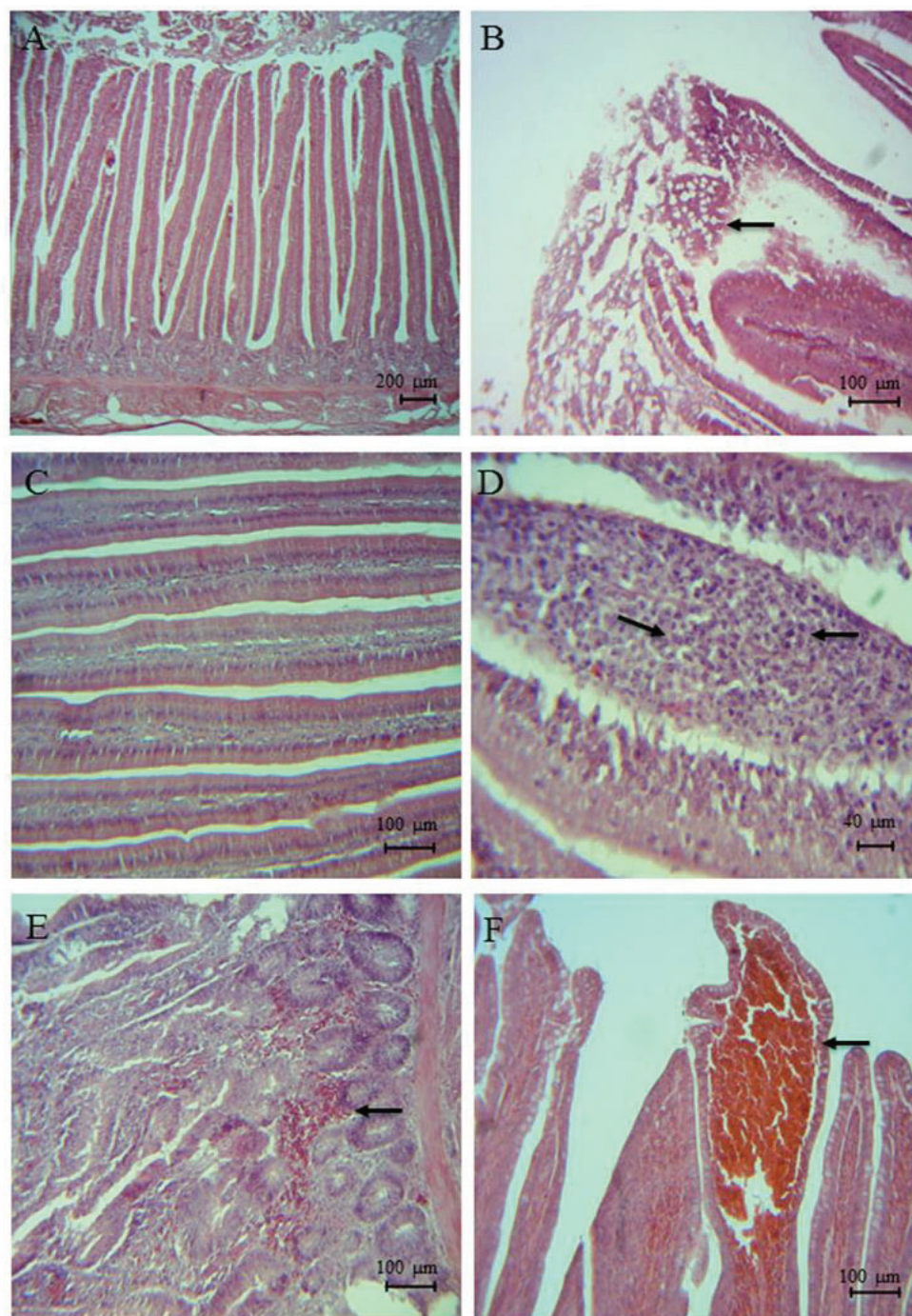


Figura 7. Lesiones histopatológicas en duodeno de pollos retados con *S. Typhimurium* y *C. perfringens*.

A) Epitelio sin lesiones aparentes (4X), B) Hiperplasia de células calciformes (10X), C) Vellosidades sin lesiones aparentes (10X), D) Infiltración linfocitaria (40X), E) Vellosidades hemorrágicas (10X), F) Vellosidad congestionada (10X).

7.3.2. Bolsa de Fabricio

El análisis histológico de la bolsa de Fabricio, mostró que los folículos del grupo Simbiótico fueron más grandes ($p < 0.05$) que los del grupo Control a los 25 (320 ± 74 vs $135 \pm 18 \mu\text{m}$), 32 (363 ± 111 vs $161 \pm 16 \mu\text{m}$), 36 (370 ± 95 vs 176 ± 31) y 39 días de vida (304 ± 78 vs $180 \pm 32 \mu\text{m}$) (Anexo A).

Por otro lado, los folículos del grupo Simbiótico + *S. Typhimurium* fueron más grandes que los de *S. Typhimurium* en la mayoría de los tiempos evaluados, siendo significativo ($p < 0.05$) a los 32 (351 ± 54 vs $203 \pm 63 \mu\text{m}$) y 36 días (420 ± 38 vs $348 \pm 41 \mu\text{m}$). Misma situación ocurrió en los grupos inoculados con ambos patógenos, donde el grupo Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens* mostró folículos más grandes que el grupo *S. Typhimurium* + *C. perfringens* en la mayoría de los tiempos, siendo significativo ($p < 0.05$) a los 32 días ($454 \pm 107 \mu\text{m}$ vs $337 \pm 55 \mu\text{m}$) (Anexo A).

En general no hubo diferencias en el tamaño de los folículos de los pollos inoculados con *C. perfringens* con o sin tratamiento simbiótico ($p > 0.05$), salvo a los 39 días donde los folículos del grupo Simbiótico + *C. perfringens* ($415 \pm 109 \mu\text{m}$) fueron más grandes que los del grupo *C. perfringens* ($288 \pm 60 \mu\text{m}$) ($p < 0.05$) (Anexo A).

Por otro lado, se realizó el recuento de linfocitos por folículo de bolsa de Fabricio, encontrando que el grupo Control tuvo mayor número de linfocitos que los demás tratamientos ($p < 0.05$) a los 18 días (119 ± 38 vs 86 ± 13), sin embargo, al final del bioensayo (39 días) el grupo Control (77 ± 15) mostró menor número de linfocitos que los grupos tratados con el simbiótico: Simbiótico (148 ± 26), Simbiótico + *C. perfringens* (154 ± 20) y Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens* (99 ± 26) (Tabla X).

Por su parte, los folículos del grupo Simbiótico tuvieron mayor número de linfocitos que el Control ($p < 0.05$) a los 22 (109 ± 14 vs 86 ± 31), 25 (117 ± 15 vs 99 ± 17) y 39 días (148 ± 26 vs 77 ± 15) (Tabla IX).

Tabla X. Efecto del simbiótico sobre el número de linfocitos por folículo de bolsa de Fabricio, de pollos de engorda retados con *Salmonella Typhimurium* y *Clostridium perfringens*

| Días de vida | Número de linfocitos | | | | | | | |
|--------------|----------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| | CT | SB | SBST | ST | SBCP | CP | SBST CP | STCP |
| 18 | 119±38* | 96±20 ⁺ | 66±10 ^{+A} | 90±17 ^{+B} | 91±7 ⁺ | 81±14 ⁺ | 140±18 ^{+A} | 94±10 ^{+B} |
| 22 | 86±31* | 109±14 ⁺ | 80±9 ^A | 105±18 ^{+B} | 96±14 | 80±22 | 87±10 ^A | 125±32 ^{+B} |
| 25 | 99±17* | 117±15 ⁺ | 104±16 ^A | 122±36 ^{+B} | 107±9 | 111±12 | 105±17 | 90±19 |
| 32 | 128±27* | 138±30 | 91±21 ⁺ | 92±20 ⁺ | 180±24 ^{+a} | 91±24 ^{+b} | 154±16 ^{+A} | 126±24 ^B |
| 36 | 135±38* | 103±13 ⁺ | 78±13 ⁺ | 85±22 ⁺ | 148±23 ^a | 73±24 ^{+b} | 140±12 | 152±27 |
| 39 | 77±15* | 148±26 ⁺ | 57±6 ^{+A} | 76±22 ^B | 154±20 ^{+a} | 96±23 ^b | 99±26 ⁺ | 87±21 |

CT: Control; SB: Simbiótico; SBST: Simbiótico + *S. Typhimurium*; ST: *S. Typhimurium*; SBCP: Simbiótico + *C. perfringens*; CP: *C. perfringens*; SBSTCP: Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens*; STCP: *S. Typhimurium* + *C. perfringens*.

* Los valores de la fila son iguales al grupo control ($p > 0.05$)

+ Los valores de la fila son diferentes al grupo control ($p < 0.05$)

Valores con diferentes superíndices en la fila (a – b o A – B) son significativamente diferentes entre columnas aledañas ($p < 0.05$).

En cuanto a los pollos inoculados con patógenos, el grupo *S. Typhimurium* mostró mayor número de linfocitos que el Simbiótico + *S. Typhimurium* en todos los tiempos evaluados, siendo significativo ($p < 0.05$) a los 18 (90 ± 17 vs 66 ± 10), 22 (105 ± 18 vs 80 ± 9), 25 (122 ± 36 vs 104 ± 16) y 39 días (76 ± 22 vs 57 ± 6) (Tabla IX).

Situación contraria a lo ocurrido en los grupos inoculados con *C. perfringens*, donde aquellos tratados con el simbiótico (grupo Simbiótico + *C. perfringens*) tuvieron mayor número de linfocitos que los no tratados (grupo *C. perfringens*) en la mayoría de los tiempos, siendo significativos a los 32 (180 ± 24 vs 91 ± 24), 36 (148 ± 23 vs 73 ± 24) y 39 días (154 ± 20 vs 96 ± 23) (Tabla IX).

En los pollos tratados con ambos patógenos, el grupo Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens* tuvo mayor número de linfocitos que el *S. Typhimurium* + *C. perfringens* ($p < 0.05$) a los 18 (140 ± 18 vs 94 ± 10) y 32 días (154 ± 16 vs 126 ± 24) (Tabla IX).

El análisis histopatológico cualitativo de la bolsa de Fabricio mostró signos de atrofia a partir de los 22 días y hasta el final del bioensayo en grupos inoculados con los patógenos (*S. Typhimurium*, *C. perfringens* y *S. Typhimurium* + *C. perfringens*), encontrando: quistes mucosos intraepiteliales y en las folias, invaginaciones epiteliales, pliegues epiteliales en los folículos, atrofia en el ápice de los pliegues, desprendimiento medular de los folículos linfoides y folículos linfoides de menor tamaño (Fig. 8).

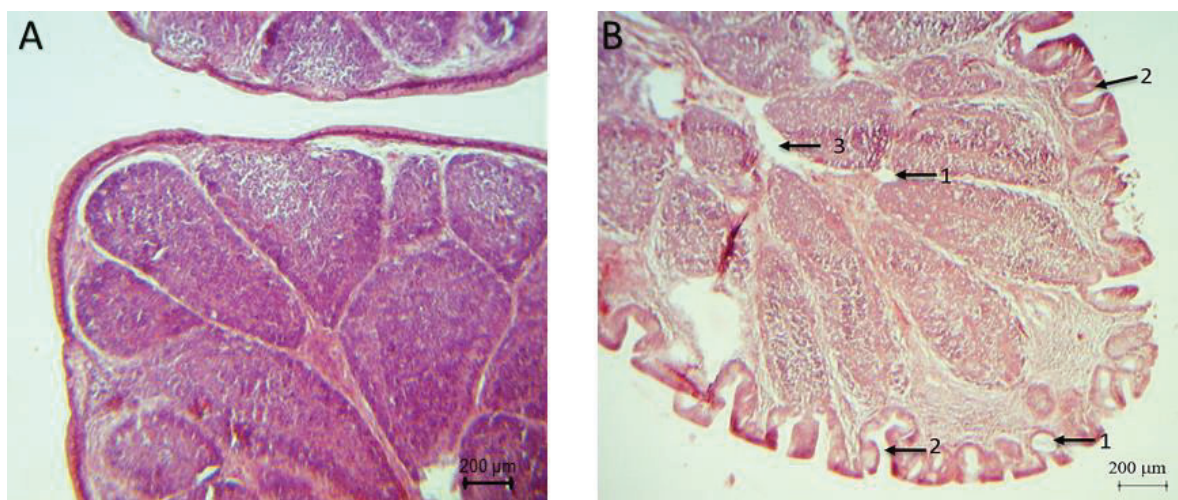


Figura 8. Bolsa de Fabricio de pollos retados con *S. Typhimurium* y *C. perfringens* (4X).

- A) Bolsa de Fabricio sin lesiones aparentes
- B) Bolsa de Fabricio con lesiones histopatológicas 1) quistes mucosos intraepiteliales, 2) invaginaciones epiteliales, 3) desprendimiento medular de los folículos linfoides

El peso promedio de la bolsa de Fabricio en las premuestras (4, 8 y 15 días de vida) fue de 0.4 g para el grupo control y de 0.5 g para el simbiótico.

A los 18 días, la media de peso de la bolsa de las aves del grupo Control fue de 1 g y su aumento fue constante hasta el día 36, alcanzando los 3.44 ± 0.9 g; sin embargo, el peso se redujo a los 39 días (2.6 ± 0.5 g).

Para el grupo Simbiótico, el peso inicial de la bolsa fue de 1 g (18 días de vida), incrementándose de forma constante hasta el final del bioensayo (39 días de vida) para alcanzar un peso de 6 ± 1.5 g; cabe señalar que, aunque no se encontró ninguna diferencia significativa ($p > 0.05$), su peso fue superior al de los otros tratamientos al final del experimento (Control 2.6 ± 0.5 g; Simbiótico + *S. Typhimurium* 1.5 ± 1 g; *S. Typhimurium* 3.8 ± 3.2 g ; Simbiótico + *C. perfringens* 4.6 ± 0.7 g; *C. perfringens* 3 ± 3.4 g; Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens* 2.5 ± 1 g; *S. Typhimurium* + *C. perfringens* 4.8 ± 1.5) (Fig. 9).

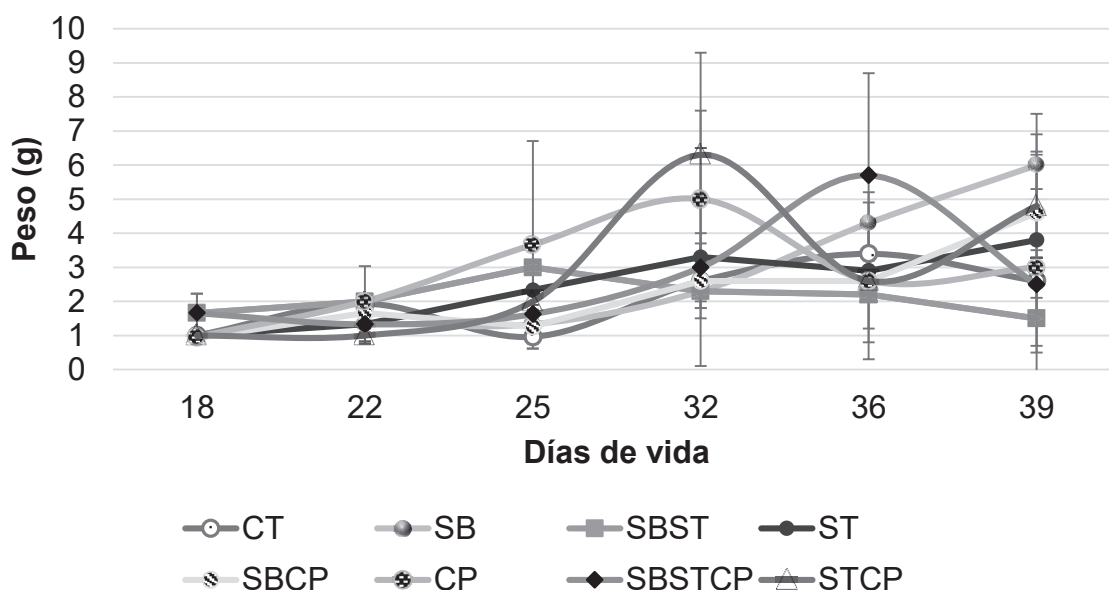


Figura 9. Efecto del simbiótico sobre el peso de la bolsa de Fabricio de pollos de engorda retados con *Salmonella Typhimurium* y *Clostridium perfringens*

CT: Control; SB: Simbiótico; SBST: Simbiótico + *S. Typhimurium*; ST: *S. Typhimurium*; SBCP: Simbiótico + *C. perfringens*; CP: *C. perfringens*; SBSTCP: Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens*; STCP: *S. Typhimurium* + *C. perfringens*.

Los pollos de los grupos Simbiótico + *S. Typhimurium* y Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens* presentaron bolsas más pesadas (1.7 ± 0.6 g cada uno) que el resto de los tratamientos (1 ± 0.1 g) a los 18 días ($p < 0.05$), sin embargo, no hubo diferencias entre tratamientos al final del bioensayo ($p > 0.05$) (Fig. 9).

Para determinar la inmunocompetencia o inmunosupresión de los pollos, se calculó el índice morfométrico de la bolsa de Fabricio, donde se considera ideal un valor de 1.1 o superior, lo que se traduce en un organismo inmunocompetente, por el contrario, encontrar índices iguales o inferiores a 1 dará lugar a la inmunosupresión, dicho índice es aplicable a las aves de entre 7 y 42 días de edad (Cazaban *et al.*, 2015).

No hubo pollos con signos de inmunosupresión a los 18 y 22 días de vida según el índice morfométrico. A los 25 días, se encontraron pollos inmunosuprimidos en los grupos Control con dos aves, y Simbiótico + *C. perfringens*, *C. perfringens* y Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens*, con un ave cada uno.

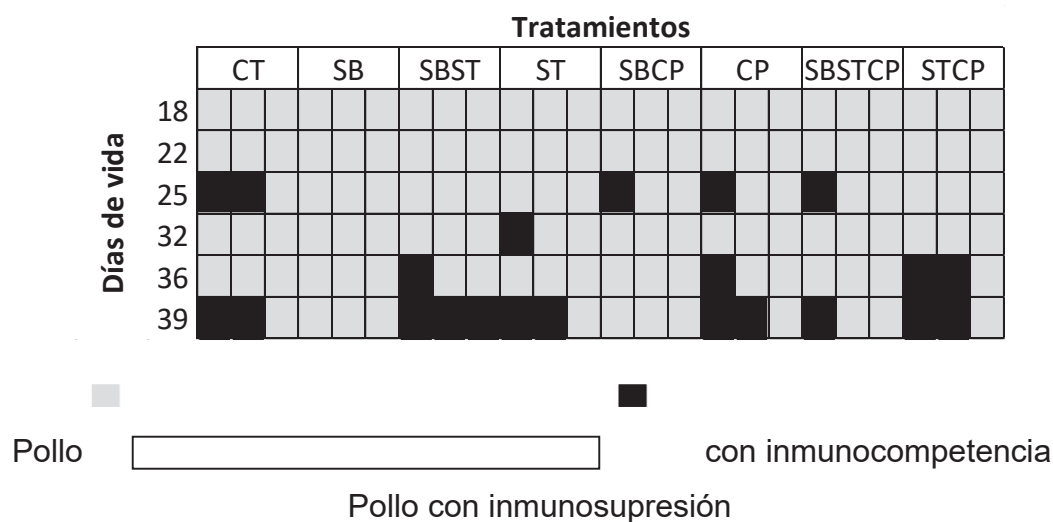


Figura 10. Inmunocompetencia o inmunosupresión de acuerdo al índice morfométrico de la bolsa de Fabricio en pollos de engorda tratados con el simbiótico y retados con *S. Typhimurium* y *C. perfringens*

CT: Control; SB: Simbiótico; SBST: Simbiótico + *S. Typhimurium*; ST: *S. Typhimurium*; SBSP: Simbiótico + *C. perfringens*; CP: *C. perfringens*; SBSTCP: Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens*; STCP: *S. Typhimurium* + *C. perfringens*.

A los 36 días, se encontraron pollos inmunosuprimidos en los grupos Simbiótico + *S. Typhimurium* (1 ave), *C. perfringens* (1 ave) y *S. Typhimurium* + *C. perfringens* (2 aves) y a los 39, se encontraron aves con inmunosupresión en la mayoría de los grupos, con excepción de los grupos Simbiótico y Simbiótico + *C. perfringens* (Fig. 10).

7.3.3. Timo

El análisis histológico del timo mostró que, los folículos del grupo Control tuvieron menor tamaño ($p < 0.05$) que los grupos tratados con el simbiótico a los 18 ($642 \pm 190 \mu\text{m}$ vs $1101 \pm 364 \mu\text{m}$), 22 ($489 \pm 151 \mu\text{m}$ vs $902 \pm 342 \mu\text{m}$) y 36 días ($474 \pm 165 \mu\text{m}$ vs $1007 \pm 459 \mu\text{m}$); y que los grupos Simbiótico + *S. Typhimurium* y Simbiótico + *C. perfringens* a los 25 ($540 \pm 182 \mu\text{m}$ vs $999 \pm 378 \mu\text{m}$) y 39 días ($410 \pm 149 \mu\text{m}$ vs $1097 \pm 387 \mu\text{m}$) (Anexo B).

Con respecto al número de linfocitos por folículo de timo, el grupo Control tuvo menor número de linfocitos que el resto de los grupos ($p < 0.05$) a los 18 (28 ± 13 vs 206 ± 38), 22 (37 ± 14 vs 170 ± 41), 25 (64 ± 19 vs 189 ± 37) y 32 días (83 ± 13 vs 251 ± 37) (Tabla XI).

A los 36 días, los grupos Control y Simbiótico tuvieron menor número de linfocitos que el resto de los tratamientos ($p < 0.05$) (153 ± 27 vs 264 ± 43), situación que se repitió a los 39 días (138 ± 22 vs 278 ± 43) (Tabla XI).

En cuanto a los pollos inoculados con *S. Typhimurium*, aquellos que fueron tratados con el simbiótico (Simbiótico + *S. Typhimurium*) mostraron mayor número de linfocitos con respecto de los no tratados (*S. Typhimurium*) ($p < 0.05$) a los 18 (172 ± 31 vs 110 ± 33), 22 (147 ± 52 vs 93 ± 28) y 25 días (224 ± 52 vs 134 ± 21) (Tabla XI).

Tabla XI. Efecto del simbiótico sobre el número de linfocitos por folículo de timo, de pollos de engorda retados con *Salmonella* Typhimurium y *Clostridium perfringens*

| Días de vida | Número de linfocitos | | | | | | | |
|--------------|----------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | CT | SB | SBST | ST | SBCP | CP | SBST CP | STCP |
| 18 | 28±13* | 89±16 ⁺ | 172±31 ⁺ a | 110±33 ⁺ b | 232±62 ⁺ | 223±39 ⁺ | 327±36 ⁺ a | 291±48 ⁺ b |
| 22 | 37±14* | 135±50 ⁺ | 147±52 ⁺ a | 93±28 ⁺ b | 150±34 ⁺ | 172±40 ⁺ | 298±43 ⁺ a | 193±41 ⁺ b |
| 25 | 64±19* | 113±33 ⁺ | 224±52 ⁺ a | 134±21 ⁺ b | 203±20 ⁺ A | 260±71 ⁺ B | 263±32 ⁺ a | 127±28 ⁺ b |
| 32 | 83±13* | 239±78 ⁺ | 204±17 ⁺ | 204±46 ⁺ | 278±36 ⁺ | 287±50 ⁺ | 275±23 ⁺ | 270±49 ⁺ |
| 36 | 155±32* | 151±22 | 200±30 ⁺ | 167±29 | 348±28 ⁺ A | 284±52 ⁺ B | 260±58 ⁺ | 263±47 ⁺ |
| 39 | 126±24* | 150±21 | 186±35 ⁺ | 213±49 ⁺ | 390±43 ⁺ A | 284±53 ⁺ B | 256±43 ⁺ a | 337±38 ⁺ b |

CT: Control; SB: Simbiótico; SBST: Simbiótico + *S. Typhimurium*; ST: *S. Typhimurium*; SBCP: Simbiótico + *C. perfringens*; CP: *C. perfringens*; SBSTCP: Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens*; STCP: *S. Typhimurium* + *C. perfringens*.

* Los valores de la fila son iguales al grupo control ($p > 0.05$)

+ Los valores de la fila son diferentes al grupo control ($p > 0.05$)

Valores con diferentes superíndices en la fila (a – b o A – B) son significativamente diferentes entre columnas aledañas ($p < 0.05$).

Por su parte, las aves del grupo Simbiótico + *C. perfringens* mostraron mayor número de linfocitos con respecto a las del grupo *C. perfringens* ($p < 0.05$) a los 36 (348 ± 28 vs 284 ± 52) y 39 días (390 ± 43 vs 284 ± 53) (Tabla XI).

En cuanto a los pollos inoculados con ambos patógenos, en general, los del grupo Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens* tuvieron mayor número de linfocitos por folículo que los del grupo *S. Typhimurium* + *C. perfringens*, siendo significativo ($p < 0.05$) a los 18 (327 ± 36 vs 291 ± 48), 22 (298 ± 43 vs 193 ± 41), 25 (263 ± 33 vs 127 ± 28) y 39 días (256 ± 43 vs 337 ± 38) (Tabla XI).

El análisis histopatológico cualitativo mostró infiltración de heterófilos, degeneración y necrosis de células epiteliales reticulares en la médula de los pollos inoculados con los patógenos (grupos *S. Typhimurium*, *C. perfringens* y *S.*

Typhimurium + *C. perfringens*) a los 22 días de vida y hasta el final del bioensayo. Los grupos tratados con el simbiótico (Simbiótico + *S. Typhimurium*, Simbiótico + *C. perfringens* y Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens*) mostraron esas lesiones sólo a los 22 y 25 días de vida. No se encontraron lesiones aparentes en el timo de los grupos Control y Simbiótico durante el bioensayo (Fig. 11).

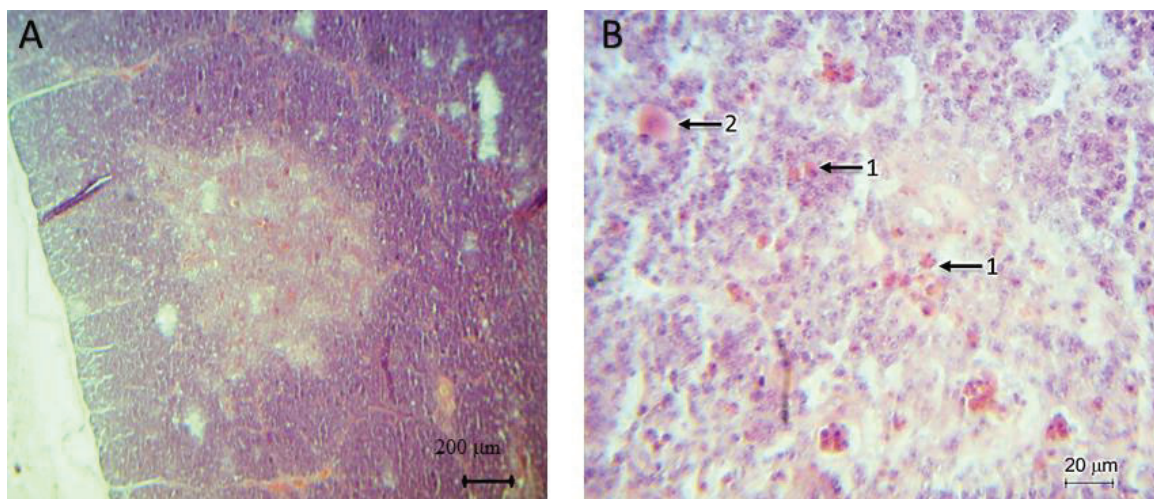


Figura 11. Timo de pollos retados con *S. Typhimurium* y *C. perfringens*
 A) Timo sin lesiones aparentes (4X)
 B) Timo con lesiones histopatológicas. 1) heterófilos, 2) células epiteliales reticulares en degeneración (*S. Typhimurium* + *C. perfringens*) (100X).

7.3.4. Bazo

Se realizó el recuento de linfocitos en pulpa blanca del bazo. A los 18 días el número de linfocitos del grupo Control (14 ± 10) fue superior al Simbiótico (2 ± 1), no habiendo más diferencias hasta los 39 días de vida, donde los recuentos del grupo Simbiótico (148 ± 26) fueron superiores ($p < 0.05$) al Control (77 ± 15) (Tabla XII).

Con respecto a las aves inoculadas con *Salmonella*, aquellas tratadas con el simbiótico (Simbiótico + *S. Typhimurium*) mostraron menor número de linfocitos al ser comparadas con las no tratadas (*S. Typhimurium*) a los 22 (3 ± 2 vs 17 ± 7), 25 (4 ± 2 vs 21 ± 14) y 39 (57 ± 6 vs 76 ± 22) días (Tabla XII).

En general, no hubo diferencias en el número de linfocitos entre los grupos Simbiótico + *C. perfringens*, *C. perfringens*, Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens* y *S. Typhimurium* + *C. perfringens*

Tabla XII. Efecto del simbiótico sobre el número de linfocitos por área de pulpa blanca de bazo, de pollos de engorda retados con *Salmonella Typhimurium* y *Clostridium perfringens*

| Días de vida | Número de linfocitos | | | | | | | |
|--------------|----------------------|---------------------|-------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------|-------|
| | CT | SB | SBST | ST | SBCP | CP | SBSTCP | STCP |
| 18 | 14±10 ^a | 2±1 ^b | 9±6 | 20±13 | 13±4 | 11±6 | 13±11 | 7±4 |
| 22 | 8±3 | 7±9 | 3±2 ^A | 17±7 ^B | 9±4 | 9±7 | 12±9 | 9±3 |
| 25 | 4±2 | 8±6 | 4±2 ^A | 21±14 ^B | 8±8 | 14±12 | 14±11 | 4±3 |
| 32 | 3±1 | 3±2 | 6±4 | 10±4 | 11±5 | 14±8 | 17±10 | 15±7 |
| 36 | 5±5 | 5±5 | 5±4 | 9±4 | 12±5 | 17±5 | 8±6 | 7±3 |
| 39 | 77±15 ^a | 148±26 ^b | 57±6 ^A | 76±22 ^B | 154±20 ^a | 96±23 ^b | 99±26 | 87±21 |

CT: Control; SB: Simbiótico; SBST: Simbiótico + *S. Typhimurium*; ST: *S. Typhimurium*; SBCP: Simbiótico + *C. perfringens*; CP: *C. perfringens*; SBSTCP: Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens*; STCP: *S. Typhimurium* + *C. perfringens*.

* Los valores de la fila son iguales al grupo control ($p > 0.05$)

+ Los valores de la fila son diferentes al grupo control ($p > 0.05$)

Valores con diferentes superíndices en la fila (a – b o A – B) son significativamente diferentes entre columnas aledañas ($p < 0.05$).

En el análisis histopatológico cualitativo no se identificaron lesiones en los grupos Control y Simbiótico. Sin embargo, aquellas aves retadas con los microorganismos patógenos (*S. Typhimurium*, *C. perfringens* y *S. Typhimurium* + *C. perfringens*) mostraron depleción de linfocitos de leve a moderada en la pulpa blanca, a partir de los 22 días y hasta el final del bioensayo. Por su parte, aquellos grupos tratados con el simbiótico (Simbiótico + *S. Typhimurium*, Simbiótico + *C. perfringens* y Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens*) no mostraron signos de depleción de linfocitos a los 39 días. (Figura 12).

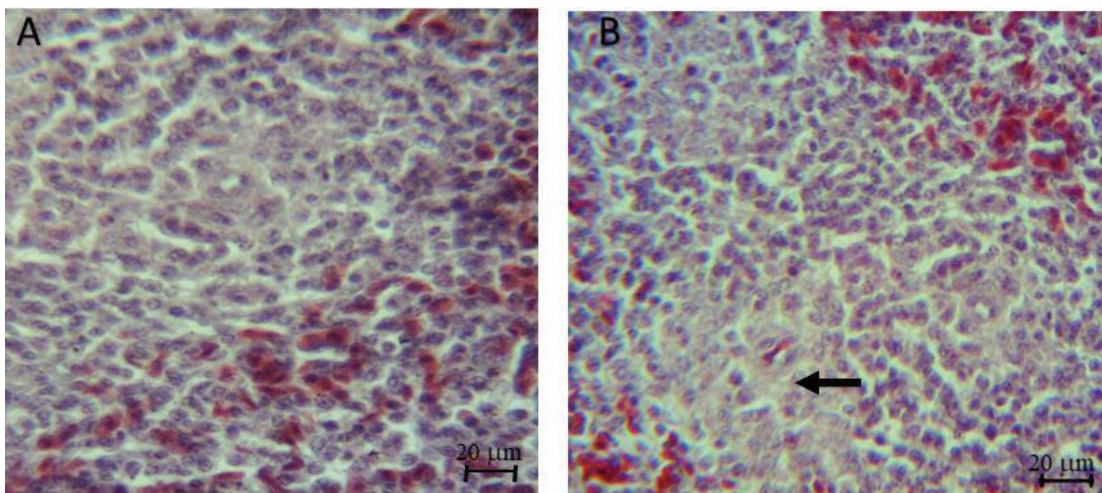


Figura 122. Bazo de pollos retados con *S. Typhimurium* y *C. perfringens*
 A) Bazo sin lesiones aparentes (40X)
 B) Bazo con lesiones histopatológicas. Depleción de linfocitos (100X).

7.4. Efecto sobre las inmunoglobulinas

La concentración sérica de inmunoglobulinas fue evaluada mediante la técnica de ELISA a los 22, 32, 36 y 39 días de vida.

La concentración de IgA de los grupos Control y Simbiótico, fue similar a los 32 y 39 días de vida, sin embargo, el contenido de IgA del Simbiótico fue superior al Control a los 36 días ($p < 0.05$) (Tabla XIII).

En cuanto a los grupos infectados con *S. Typhimurium*, la concentración de IgA fue significativamente superior en el grupo Simbiótico + *S. Typhimurium* en todos los muestreos ($p < 0.05$); similares resultados fueron encontrados en los pollos infectados con *C. perfringens*, donde la concentración de IgA del grupo Simbiótico + *C. perfringens* fue superior a los del grupo *C. perfringens* en la mayoría de los muestreos ($p < 0.05$). Se encontró mayor concentración de IgA en el grupo Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens* al ser comparado con su control, en todos los tiempos salvo en el último (39 días) ($p < 0.05$) (Tabla XIII).

Tabla XIII. Efecto de la administración del simbiótico sobre la concentración sérica de IgA en pollos de engorda retados con *Salmonella Typhimurium* y *Clostridium perfringens* (ng/mL)

| Tratamientos | ng/mL | | | | |
|---------------|-------|----------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | Días | 22 | 32 | 36 | 39 |
| CT | | 78.7±3.2 | 117±1.8^a | 151.7±2.3 | 156±2.8^a |
| SB | | 67.5±0.6 | 112.4±3.9^a | 164.4±1.5 | 156.5±1.7^a |
| SBST | | 79.5±2.3 | 222.1±1.5 | 196.9±1.9 | 166.2±1.6 |
| ST | | 59±0.2 | 146.4±2.3 | 171.2±1.3 | 77.2±3.6 |
| SBCP | | 45.2±0.7 | 182.8±1.1 | 119.1±0.1^a | 101.9±1.4 |
| CP | | 37±0.4 | 169.3±2.9 | 125.6±1.7^a | 87.67±5.4 |
| SBSTCP | | 83±2.6 | 149.2±0.7 | 217.87±1.5 | 84.9±2.6 |
| STCP | | 66.5±2.6 | 161±1.1 | 205.8±6 | 146.4±1.1 |

CT – Control; SB – Simbiótico; SB + ST – Simbiótico + *S. Typhimurium*; ST – *S. Typhimurium*; SB + CP – Simbiótico + *C. Perfringens*; CP – *C. Perfringens*; SB + ST + CP – Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. Perfringens*; ST + CP - *S. Typhimurium* + *C. Perfringens*

^a Las medias con los superíndices en la misma columna mostraron ser subconjuntos homogéneos ($p < 0.05$)

La concentración sérica de IgY del grupo Simbiótico fue superior al Control, los días 32, 36 y 39 (Tabla XIV).

En cuanto a los grupos infectados con los patógenos, Simbiótico + *S. Typhimurium*; y Simbiótico + *C. Perfringens* mostraron concentraciones inferiores con respecto a los grupos *S. Typhimurium* y *C. Perfringens*, los días 22 y 32 ($p < 0.05$), en ambos casos dicha situación se invirtió a los 36 días y no mostraron diferencias para el día 39 ($p > 0.05$). El grupo Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. Perfringens* tuvo la misma concentración de IgY que el *S. Typhimurium* + *C. Perfringens* en todos los tiempos con excepción del día 32, donde el grupo tratado con el simbiótico fue superior al que solo les fueron administrados los patógenos (Tabla XIV).

Tabla XIV. Efecto de la administración del simbiótico sobre la concentración sérica de IgY en pollos de engorda retados con *Salmonella Typhimurium* y *Clostridium perfringens* (ng/mL)

| Tratamientos | ng/mL | | | | |
|--------------|-------|----------------------------|----------|-----------------------------|------------------------------|
| | Días | 22 | 32 | 36 | 39 |
| CT | | 1.3±0.3 | 3.1±0.06 | 12.2±0.1 | 99.6±2 |
| SB | | 0.02±0 | 6.3±0.3 | 9.7±0.04 | 121.4±1.9 |
| SBST | | 0.02±0 | 4.1±0.6 | 12.4±0.3 | 113.6±1.1^b |
| ST | | 1±0.2 | 12.1±1.7 | 11.4±0.2 | 118.3±0.7^b |
| SBCP | | 0.02±0.01 | 9.2±0.04 | 14.5±0.8 | 102.1±2.3^a |
| CP | | 3.5±0.08 | 11.8±0.6 | 8.1±0.06 | 104.4±2.8^a |
| SBSTCP | | 0.01±0^a | 13.1±0.5 | 11.3±0.1^a | 128.9±0.7^c |
| STCP | | 0.7±1.2^a | 6.68±0.3 | 11.6±0.3^a | 126.4±1.5^c |

CT – Control; SB – Simbiótico; SB + ST – Simbiótico + *S. Typhimurium*; ST – *S. Typhimurium*; SB + CP – Simbiótico + *C. Perfringens*; CP – *C. Perfringens*; SB + ST + CP – Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. Perfringens*; ST + CP - *S. Typhimurium* + *C. Perfringens*

^{a, b, c} Las medias con los superíndices en la misma columna mostraron ser subconjuntos homogéneos ($p < 0.05$)

La concentración sérica de IgM del grupo Simbiótico fue superior al Control los días 22 y 32 ($p < 0.05$), no habiendo diferencias entre ellos los días 36 y 39 ($p > 0.05$). Comparando los grupos Simbiótico + *S. Typhimurium* y *S. Typhimurium*, la concentración de IgM fue mayor para el primero a los 22 días, situación que se invirtió a los 32 ($p < 0.05$)., no hubo diferencias entre ambos grupos los días 36 y 39 ($p > 0.05$). El grupo Simbiótico + *C. Perfringens* mostró concentraciones superiores al *C. Perfringens* los días 32 y 39, y el Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. Perfringens* los días 32 y 36 en relación al *S. Typhimurium* + *C. Perfringens* ($p < 0.05$) (Tabla XV).

Tabla XV. Efecto de la administración del simbiótico sobre la concentración sérica de IgM en pollos de engorda retados con *Salmonella* Typhimurium y *Clostridium perfringens* (ng/mL)

| Tratamientos | ng/mL | | | | |
|--------------|-------|-----------------------------|-----------|------------------------------|------------------------------|
| | Días | 22 | 32 | 36 | 39 |
| CT | | 72.5±0.6 | 74.8±0.6 | 72.4±0.5^a | 78.7±0.07^a |
| SB | | 68.7±0.7 | 78.1±0.2 | 72.8±0.2^a | 79.6±0.6^a |
| SBST | | 69.3±0.9 | 75.9±0.04 | 0.6±0.01^b | 79.1±0.6^b |
| ST | | 63.8±0.9 | 80.3±0.5 | 0.02±0.01^b | 79.2±0.3^b |
| SBCP | | 71.9±2.1^a | 76.1±1.3 | 0.02±0.01^c | 79.8±0.5 |
| CP | | 73.2±0.6^a | 74±0.9 | 76.6±0.05^c | 78±0.3 |
| SBSTCP | | 73±0.3^b | 74.3±0.2 | 77.4±0.01 | 78.8±0.1^c |
| STCP | | 73.2±0.7^b | 72.4±0.2 | 75.9±1.1 | 74.1±1.3^c |

CT – Control; SB – Simbiótico; SB + ST – Simbiótico + *S. Typhimurium*; ST – *S. Typhimurium*; SB + CP – Simbiótico + *C. Perfringens*; CP – *C. Perfringens*; SB + ST + CP – Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. Perfringens*; ST + CP - *S. Typhimurium* + *C. Perfringens*

^a Las medias con los superíndices en la misma columna mostraron ser subconjuntos homogéneos ($p < 0.05$)

7.5. Análisis de componentes principales

Se aplicó el análisis de componentes principales para determinar cualquier reconocimiento de patrones entre variables y tratamientos, además de comparar entre el comportamiento de las variables en los pollos de engorda después de 24 horas de la administración de los patógenos (18 días) y al final del bioensayo (39 días).

Los componentes principales (PC) 1, 2 y 3 tuvieron un alto porcentaje de la varianza total de 35.73%, 21.97% y 14.57% respectivamente en el día 18; y 32.46%, 21.95 y 19.89% respectivamente en el día 39. Los parámetros se presentan en las Fig. 13A – 13D y la ubicación gráfica de los grupos de trabajo se muestra en las Fig. 14A – 14D.

Así, en el gráfico de dispersión de los parámetros a los 18 días, en los valores de puntuación proyectados en los planos PC1 y PC2, el índice vellosidad/cripta (0.91), conversión alimenticia (0.83), longitud de las vellosidades (0.80), grosor de la mucosa (0.68) y consumo alimentario (0.52), se vieron influenciados por la presencia de bacterias ácido lácticas (-0.54), procediendo de los valores negativos a los positivos del PC1 (Fig. 13A). Y en los planos PC1 y PC3, los linfocitos de la bolsa de Fabricio (0.76) y la IgM (0.76), aparecen influenciados por la profundidad de las criptas (-0.75) y la IgA (-0.67), procediendo de los valores negativos a los positivos del PC3 (Fig. 13B).

A los 39 días en los planos PC1 y PC2, el índice vellosidad/cripta (0.91), conversión alimenticia (0.83), longitud de las vellosidades (0.80), grosor de la mucosa (0.68) y las enterobacterias (0.52), se vieron influenciadas por la presencia de bacterias ácido lácticas (0.54), procediendo de los valores negativos a positivos del PC1 (Fig. 13C). Y en los planos PC1 y PC3, nuevamente los linfocitos de la bolsa de Fabricio (0.76) y la IgM (0.76), aparecen influenciados por la profundidad de las criptas (-0.75) y la IgA (-0.67), procediendo de los valores negativos a los positivos del PC3 (Fig. 13D).

Como se indica en las Fig. 14A - 14D, el análisis de componentes principales puede distinguir entre grupos de pollos con o sin tratamiento simbiótico en ambos puntos temporales. Los componentes principales 1 y 2 mostraron separación entre los grupos de tratamiento. De acuerdo con el factor de coordenadas, a los 18 días los grupos Simbiótico (2.08), Simbiótico + *C. perfringens* (1.79) y *S. Typhimurium* + *C. Perfringens* (0.93) mostraron una relación más estrecha. Los tratamientos Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. Perfringens* (3.46) y Control (-2.41) mostraron mayor diferencia con respecto al conglomerado mencionado en comparación con los grupos *C. Perfringens* (-0.76), Simbiótico + *S. Typhimurium* (-2.17) y *S. Typhimurium* (-2.90), procediendo de valores negativos a positivos de PC1 (Fig. 14A).

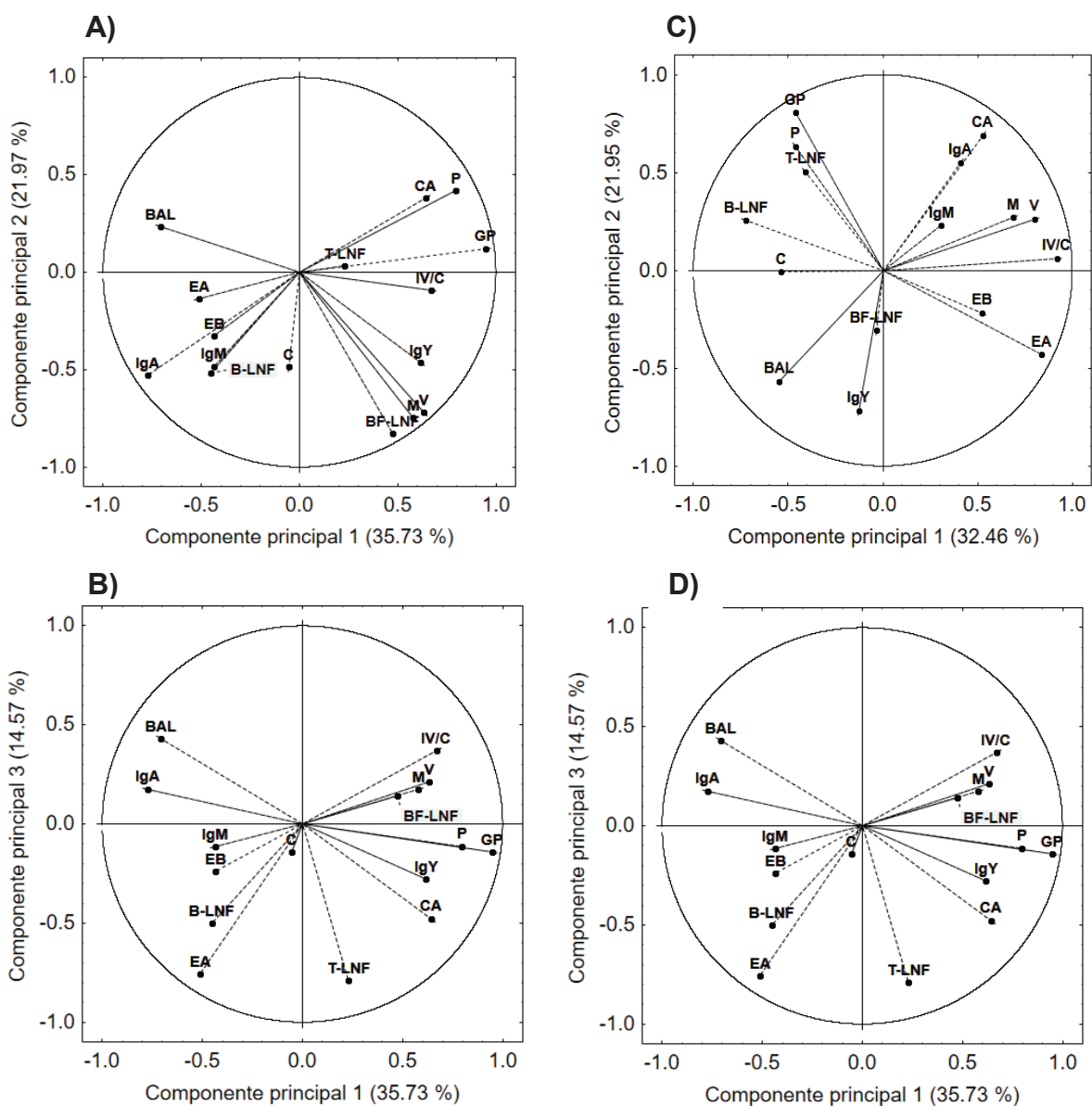


Figura 13. Diagramas de análisis de componentes principales de pollos de engorda tratados con el simbiótico. A) Localización de diferentes variables de acuerdo al componente principal 1 y 2 a los 18 días, B) Localización de diferentes variables de acuerdo al componente principal 1 y 3 a los 18 días C) Localización de diferentes variables de acuerdo al componente principal 1 y 2 a los 39 días, D) Localización de diferentes variables de acuerdo al componente principal 1 y 3 a los 39 días.

P: peso, GP: ganancia de peso, CA: consumo alimentario, EA: conversión alimenticia, BAL: bacterias ácido lácticas, EB: enterobacterias, M: grosor de la mucosa, C: profundidad de las criptas, V: longitud de las vellosidades, IV/C: índice vellosidad/cripta, IgA: Inmunoglobulina A, IgM: Inmunoglobulina, IgY:

Inmunoglobulina Y, B-LNF: linfocitos del bazo, T-LNF: linfocitos del timo, BF-LNF: linfocitos de la Bolsa de Fabricio

De igual manera, al analizar el gráfico de dispersión para los componentes 1 y 3 (18 días) se pueden identificar diferencias entre los tratamientos, donde los grupos Simbiótico (0.85), *S. Typhimurium* + *C. perfringens* (0.05), Simbiótico + *C. Perfringens* (-0.87) y Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens* (-0.51) mostraron una relación más estrecha (Fig. 14B).

A los 39 días, el gráfico de dispersión de los componentes principales 1 y 2, mostró que los grupos Simbiótico (-0.87) y *S. Typhimurium* + *C. perfringens* (-1.54), fueron similares entre sí, siendo los grupos Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens* (2.67) y Control (2.90) los menos cercanos a dicha agrupación, seguidos por Simbiótico + *S. Typhimurium* (1.26), Simbiótico + *C. perfringens* (1.01), *C. perfringens* (-2.94) y *S. Typhimurium* (-2.51) procediendo de valores negativos a positivos de PC1 (Fig. 14C).

Siendo los grupos *S. Typhimurium* (-2.85) y Control (2.33) los que mostraron mayor diferencia con respecto al conglomerado anterior y a los tratamientos Simbiótico + *S. Typhimurium* (0.13) y *C. perfringens* (0.96), procediendo de valores negativos a positivos de PC3 (Fig. 14B).

Con respecto a los componentes principales 1 y 3, los tratamientos Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens* (-0.02) y Control (-0.43) mostraron similitud, siendo los grupos *C. perfringens* (1.02), *S. Typhimurium* (-0.16) y *S. Typhimurium* + *C. perfringens* (-3.15) los menos cercanos al conglomerado mencionado, seguido por el Simbiótico (1.78), Simbiótico + *C. perfringens* (2.40) y Simbiótico + *S. Typhimurium* (-1.43) procediendo de valores negativos a positivos de PC3 (Fig. 14D).

Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis de conglomerados jerárquicos que se muestra como un dendrograma en las Fig. 15A y 15B. Este análisis indicó que los pollos dentro del mismo grupo son más parecidos entre sí que las muestras de grupos diferentes. A los 18 días, el tratamiento Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C.*

Perfringens (primer grupo) es claramente discernible de los otros grupos. Un segundo grupo consiste en *C. Perfringens* y *S. Typhimurium*; mientras que el tercer grupo incluye a *S. Typhimurium* + *C. Perfringens*, Simbiótico + *S. Typhimurium*, Simbiótico + *C. Perfringens* y Simbiótico; y en el cuarto encontramos al Control (Fig. 15A).

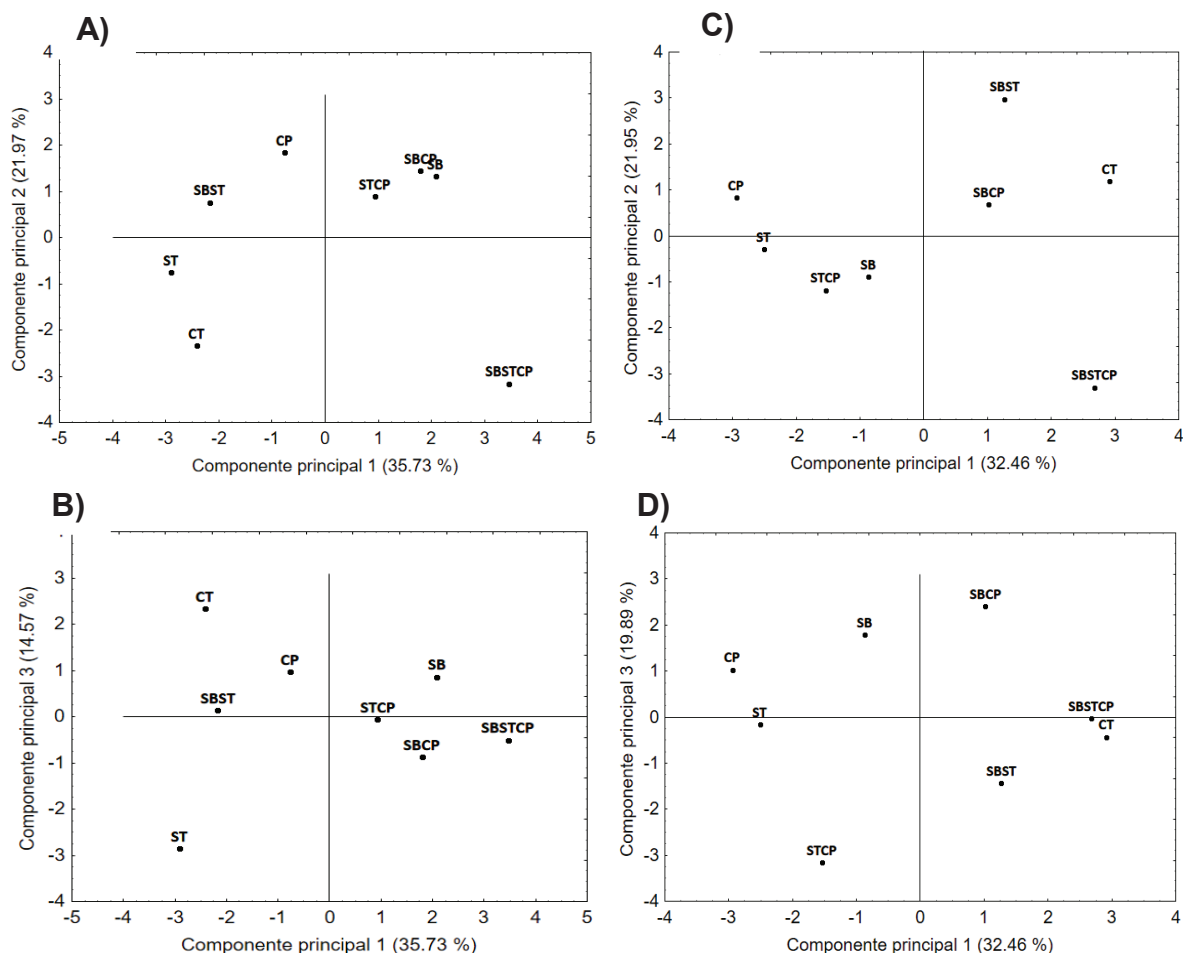


Figura 14. Diagramas de análisis de componentes principales de pollos de engorda tratados con el simbiótico. A) Localización de los diferentes tratamientos de acuerdo al componente principal 1 y 2 a los 18 días, B) Localización de los diferentes tratamientos de acuerdo al componente principal 1 y 3 a los 18 días C) Localización de los diferentes tratamientos de acuerdo al componente principal 1 y 2 a los 39 días, D) Localización de los diferentes tratamientos de acuerdo al componente principal 1 y 3 a los 39 días.

CT: Control; SB: Simbiótico; SBST: Simbiótico + *S. Typhimurium*; ST: *S. Typhimurium*; SBSTCP: Simbiótico + *C. perfringens* + *S. Typhimurium*; SBCP: Simbiótico + *C. perfringens*; CP: *C. perfringens*; SBSTCP:

Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens*; STCP: *S. Typhimurium* + *C. perfringens*.

A los 39 días, se observaron diferencias en el agrupamiento de los tratamientos. En el primer grupo se encontró al tratamiento Simbiótico + *S. Typhimurium*; un segundo grupo incluyó *S. Typhimurium* + *C. Perfringens*, *C. Perfringens* y *S. Typhimurium*; el tercer grupo estuvo conformado por Simbiótico + *C. Perfringens* y Simbiótico; y el cuarto grupo por Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. Perfringens* y el Control (Fig. 15B).

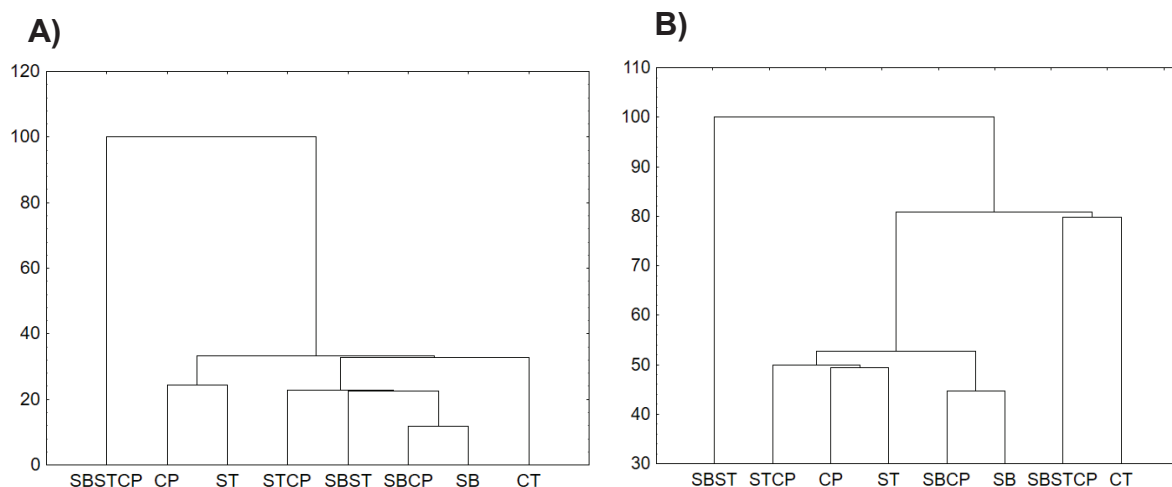


Figura 15. Diagramas de análisis de componentes principales de pollos de engorda tratados con el simbiótico. A) Dendrograma del análisis jerárquico de conglomerados a 18 días, B) Dendrograma del análisis jerárquico de conglomerados a 39 días

CT: Control; SB: Simbiótico; SBST: Simbiótico + *S. Typhimurium*; ST: *S. Typhimurium*; SBCP: Simbiótico + *C. perfringens*; CP: *C. perfringens*; SBSTCP: Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens*; STCP: *S. Typhimurium* + *C. perfringens*.

8. DISCUSIÓN

La presencia de *C. perfringens* y *S. Typhimurium* en pollos de engorda puede causar pérdidas económicas significativas y representar un riesgo para la salud de los consumidores. Estas bacterias han sido tradicionalmente controladas usando antibióticos, pero debido a los efectos negativos de su uso excesivo son requeridas estrategias alternativas.

Los probióticos, prebióticos y simbióticos se utilizan como aditivos en la alimentación animal para mantener la salud y el rendimiento en la producción avícola y se han convertido en un método común para prevenir diversas enfermedades intestinales (Eeckhaut *et al.*, 2016).

L. rhamnosus es una de las cepas probióticas más utilizadas, tiene el potencial de ser una buena opción probiótica gracias a su fuerte capacidad adhesiva y potencial inmunoestimulante (Gill *et al.*, 2000; Peña y Versalovic, 2003; Segers y Lebeer, 2014), se ha demostrado que protege a los animales contra patógenos gastrointestinales como *E. coli* O157:H7 (Shu y Gill, 2002) y *S. Typhimurium* (De Keersmaecker *et al.*, 2006).

P. acidilactici ejerce antagonismo contra otros microorganismos como *Clostridium* spp. y *Salmonella*, a través de la producción de ácido láctico y pediocinas (Lee *et al.*, 2007; Papagianni y Anastasiadou, 2009; Sakaridis *et al.*, 2012).

Por su parte, los fructanos estimulan el establecimiento de bifidobacterias y lactobacilos, y suprimen el desarrollo de bacterias patógenas, como *C. perfringens* y *E. coli* en el intestino de los pollos de engorda (Teng y Kim, 2018). Se ha reportado que los fructanos de *Agave tequilana* promueven el crecimiento de bacterias probióticas como *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium* y que su efecto prebiótico supera a la inulina de achicoria (Ayala Monter *et al.*, 2018).

Se ha demostrado que el uso de aditivos en la dieta de los pollos de engorda afecta el equilibrio microbiano intestinal y en consecuencia mejora los parámetros productivos y reduce la tasa de mortalidad (Talebi *et al.*, 2015).

En el presente estudio, se detectó un ligero aumento en el peso corporal en los pollos tratados con el simbiótico a los 7 días, sin embargo, dicha tendencia no se volvió a presentar. Al respecto, se acepta que los simbióticos pueden ayudar a establecer un ambiente intestinal óptimo, facilitar la implantación de probióticos y estimular el apetito y aumento de peso del pollo, especialmente en las etapas iniciales (Mookiah *et al.*, 2014; Min *et al.*, 2016), sin embargo, en aves mayores estos efectos pueden no ser evidentes porque los requerimientos nutrimentales disminuyen y el sistema digestivo está mejor desarrollado (Drissi *et al.*, 2014; Min *et al.*, 2016; Naghi *et al.*, 2017).

Lo anterior podría explicar por qué algunos autores no han observado cambios en los parámetros productivos en pollos tratados con probióticos, prebióticos o simbióticos (Yitbarek *et al.*, 2013; Salehimanesh *et al.*, 2016; Naghi *et al.*, 2017).

El hecho de que los pollos de los grupos *C. perfringens* y Simbiótico + *C. perfringens* mostraran tendencia a mayor aumento de peso podría parecer inesperado, sin embargo, estudios previos han reportado resultados similares a los aquí presentados. Dahiya *et al.*, (2007) administraron glicina encapsulada a pollos inoculados con *C. perfringens* sin mostrar diferencias en el aumento de peso al ser comparados con los grupos control; y Wang *et al.*, (2017) administraron probióticos a pollos de engorda con enteritis necrótica subclínica en diferentes etapas del desarrollo de la enfermedad, al final del experimento, aquellos tratados con probióticos antes de la infección tuvieron un mayor aumento de peso ($p < 0.05$) en comparación con los otros tratamientos.

Estas discrepancias en el aumento de peso también pueden deberse al uso de diversas cepas probióticas, diferentes fibras prebióticas, condiciones ambientales y líneas genéticas de los pollos. Además, los aditivos simbióticos pueden ser más eficaces en condiciones de estrés, temperaturas extremas, hacinamiento y malas condiciones de manejo (Midilli *et al.*, 2008) que se evitaron durante este estudio.

Las bacterias ácido lácticas pueden alterar la dinámica intestinal y los procesos fisiológicos relacionados con las funciones intestinales, mejoran la nutrición de las aves al ayudar en el proceso de digestión y sintetizar nutrimentos, también estimulan el epitelio intestinal y reducen las enfermedades infecciosas al prevenir la colonización intestinal por microorganismos patógenos (Adil y Magray, 2012).

En la presente investigación, las aves tratadas con el simbiótico tendieron a mostrar recuentos de bacterias ácido lácticas superiores a aquellas no tratadas (desafiadas o no, con patógenos), sin embargo, estas diferencias no fueron significativas hasta los 39 días de edad, cuando las aves del grupo Simbiótico mostraron mayor número de bacterias ácido lácticas ($6.5 \log_{10}$ UFC/g) que el grupo Control ($4.1 \log_{10}$ UFC/g), lo que es comparable a un estudio anterior, donde se registraron recuentos de $6.68 \log_{10}$ UFC/g en el contenido de íleon de pollos tratados con una mezcla simbiótica comercial (Salehimanesh *et al.*, 2016).

El no haber encontrado diferencias antes del día 39, puede relacionarse con el desarrollo y establecimiento natural de la microbiota intestinal de los pollos de engorda; ha sido reportado que la microbiota del intestino delgado de los pollos de engorda, es abundante en estreptococos fecales y coliformes durante los primeros 40 días de vida y después los lactobacilos se establecen y dominan (Adil y Magray, 2012; Stanley *et al.*, 2014). Además, el momento de la administración de probióticos puede influir en su efecto; Nakphaichit *et al.* (2011) administraron *Lactobacillus reuteri* a pollos durante la primera semana después de la eclosión, y al igual que en este estudio, no encontraron efectos significativos a los 18 días de vida, sin embargo, el día 42 reportaron un aumento en la diversidad y abundancia de *Lactobacillus*, demostrando así un efecto retardado de la administración del probiótico.

Encontrar mayor número de bacterias ácido lácticas antes de los 40 días de vida en el grupo Simbiótico, sugiere que la administración del simbiótico propicia las

condiciones para el establecimiento de las especies de *Lactobacillus* y la modificación de la microbiota intestinal de los pollos de engorda.

Los simbióticos estimulan selectivamente el crecimiento y/o estimulan la actividad de los *Lactobacillus* (Stanley *et al.*, 2012a). En esta investigación, *L. rhamnosus* y *L. curvatus* fueron aislados únicamente de los pollos tratados con el simbiótico, mientras que *L. pentosus*, *L. buchneri* y *L. mesenteroides*, se encontraron exclusivamente en pollos que no recibieron el simbiótico.

L. rhamnosus mejora el rendimiento en el crecimiento, la calidad de la carne, la emisión de amoníaco y la microbiota intestinal en los pollos (Chen *et al.*, 2018); *L. curvatus* muestra actividad antimicrobiana contra *Klebsiella*, *E. coli* y *Staphylococcus aureus* (Ouled-Haddar *et al.*, 2012).

L. plantarum, *L. acidophilus* y *L. fermentum*, fueron aislados tanto de pollos tratados con el simbiótico, como de los no tratados, el primero (*L. plantarum*) ha sido asociado con la pérdida de peso y los otros dos con la ganancia (Drissi *et al.*, 2014).

Ya se estableció que los probióticos y prebióticos pueden influir en la microbiota intestinal (Salim *et al.*, 2013; Teng y Kim, 2018), por lo que para evaluar el efecto del simbiótico sobre la microbiota intestinal Gram-negativa de los pollos se realizaron recuentos de *Enterobacteriaceae*, los cuales permanecieron relativamente constantes a lo largo de las seis semanas que duró el bioensayo, lo que es similar a un estudio previo en el que las diferencias se observaron sólo después de 35 días (Olnood *et al.*, 2015).

La microbiota intestinal de los pollos de engorda está compuesta principalmente por tres géneros: *Lactobacillus*, *Clostridium* y *Bacteroides* (nombrados por orden de abundancia), una microbiota intestinal equilibrada y alta diversidad microbiana (especialmente en lactobacilos) aumenta la resistencia a infecciones gastrointestinales; por el contrario, si las especies de *Lactobacillus* disminuyen, perturbando el equilibrio de la microbiota, se facilita el desarrollo de dichas

infecciones, lo que es común cuando el ave es sometida a estrés (Patterson y Burkholder, 2003; Nakphaichit *et al.*, 2011; Stanley *et al.*, 2012b).

En este sentido, el control de la *Salmonella* es una de las principales tareas de la producción avícola para garantizar la seguridad alimentaria, y la modulación de la microbiota intestinal con prebióticos, probióticos y simbióticos en los pollos de engorda ha reducido la contaminación de las explotaciones avícolas por dicho patógeno (Chambers & Gong, 2011).

Durante la presente investigación, el aislamiento del *S. Typhimurium* fue significativamente menor en el grupo que Simbiótico + *S. Typhimurium* en comparación con el *S. Typhimurium* ($P < 0.05$).

Diversos estudios han demostrado que las cepas de *Lactobacillus* tienen efecto sobre la modulación de la función de defensa intestinal y la inhibición de patógenos (Olnood *et al.*, 2015; Mao *et al.*, 2016). Investigaciones previas han demostrado de manera cualitativa y cuantitativa la reducción *Salmonella* en heces, intestino grueso y delgado, en aves alimentadas con *Bacillus subtilis* (Knap *et al.*, 2011; Park y Kim, 2015)

Por su parte, *C. perfringens* representa un riesgo para la salud cuando está presente en el intestino delgado de los pollos de engorda; su crecimiento en el tracto gastrointestinal depende de condiciones favorables y, consecuentemente, desarrolla su patogenicidad (Moran, 2014).

Durante este estudio, *C. perfringens* se recuperó del contenido de las ramas ileocecales de los pollos, 24 horas después de la inoculación y durante todo el bioensayo (39 días), pero no se recuperó en grupos no inoculados.

No todos los pollos de los que se recuperó el patógeno mostraron signos de enteritis necrótica subclínica, hallazgos similares en estudios publicados indican que no hay una relación directa entre el número de células de *C. perfringens* presentes en el tracto gastrointestinal y el desarrollo de enteritis necrótica o enteritis necrótica subclínica (Olkowski *et al.*, 2008; Cooper y Songer, 2010). Sin

embargo, la alteración de la microbiota, especialmente la disminución del número de bacterias ácido lácticas, podría ayudar al desarrollo de la enfermedad (Shojadoost *et al.*, 2012), en ese sentido, Qing *et al.*, (2017) demostraron que *Lactobacillus johnsonii* BS15 puede prevenir la enteritis necrótica subclínica causada por *C. perfringens* mediante el ajuste de la composición de la microbiota intestinal, y Wang *et al.* (2017) concluyeron que la suplementación alimenticia con dicho probiótico previene la enteritis necrótica subclínica al mejorar la inmunidad del intestino delgado.

En el estudio actual, la mucosa del tracto intestinal de pollos infectados con *S. Typhimurium* y *C. perfringens* tratados con el simbiótico era más saludable, con índice vellosidad/cripta más alto que sus controles (grupos *S. Typhimurium*, *C. perfringens* y *S. Typhimurium* + *C. perfringens*). La colonización con el probiótico *L. rhamnosus*, promueve cambios ultraestructurales, al aumentar la regulación de la renovación celular epitelial (Yitbarek *et al.*, 2013). Alternativamente, la combinación del prebiótico (fructanos de *A. tequilana*) con los probióticos administrados, podría facilitar la implantación de otras especies nativas de bacterias ácido lácticas con un efecto protector (M'Sadeq *et al.*, 2015). Algunos autores han reportado que probióticos como *L. johnsonii* BSNE (Qing *et al.*, 2017) y simbióticos como *E. faecium* DSM 3530 y prebiótico de achicoria (Awad *et al.*, 2009), o *B. Subtilis* y xiloligosacárido (Min *et al.*, 2016) pueden mejorar el desarrollo intestinal.

Vellosidades cortas y criptas profundas están asociadas con la presencia de toxinas bacterianas, ya que la mucosa intenta restaurar las células epiteliales afectadas por el daño constante (Laudadio *et al.*, 2012), estas características fueron encontradas en los grupos infectados con patógenos, los cuales mostraron vellosidades más cortas y criptas más profundas que las del grupo Control, sin embargo, dichas situación no ocurrió en los grupos infectados con patógenos que recibieron el simbiótico.

Por otro lado, el examen histológico del duodeno reveló lesiones relacionadas con la enteritis necrótica subclínica y la colonización por *Salmonella* (hiperplasia epitelial, degeneración de la mucosa, infiltración de linfocitos, vellosidades congestionadas y hemorrágicas) en grupos inoculados con los patógenos, pero su frecuencia e intensidad fue menor en los grupos tratados con el simbiótico en comparación con los controles respectivos. Al igual que lo reportado por Stanley *et al.* (2012b), los resultados aquí expuestos, indican que los cambios ultraestructurales promovidos por el simbiótico podrían aumentar la capacidad de resistencia de los pollos de engorda a las infecciones intestinales causadas por *S. Typhimurium* y *C. perfringens*.

Las respuestas de los huéspedes a los agentes infecciosos a menudo se regulan mediante fosforilación (Kogut y Kogut, 2016) y los prebióticos pueden afectar la señalización del huésped que afecta la inflamación de la mucosa, independientemente de la presencia de microorganismos (Wu *et al.*, 2017a). También se ha demostrado que los prebióticos median directamente en los cambios en la función de barrera (Wu *et al.*, 2017b).

Con respecto a la evaluación de los órganos linfoides, de acuerdo al desarrollo anatomo - fisiológico de la bolsa de Fabricio en condiciones normales y libres de estrés, se espera que dicho órgano mantenga un crecimiento sostenido hasta alcanzar ocho semanas de vida, donde de forma natural iniciará el proceso de atrofia (Gómez *et al.*, 2010) sin embargo, en la presente investigación dicha condición ocurrió únicamente en el grupo Simbiótico, la variación del peso de la bolsa en los otros grupos puede ser el resultado del estrés ocasionado por los microorganismos patógenos inoculados a las aves. Diversos autores han reportado moderada atrofia de la bolsa de Fabricio hacia la sexta o séptima semana en aves sometidas a diferentes desafíos tales como la reutilización de la cama (Tambini *et al.*, 2010), infección por enfermedad de gumboro (Babaahmady *et al.*, 2005; Aihara *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2016), inmovilización, volteo (Revidatti

et al., 2002), estrés térmico (Bartlett y Smith, 2003) y hacinamiento (Gomes *et al.*, 2014).

Se sabe que la disminución del peso de la bolsa se encuentra asociada con inmunosupresión. Gomes *et al.*, (2014) encontraron que al disminuir el peso de dicho órgano, los pollos de engorda son más susceptibles de padecer enteritis ocasionada por *Salmonella* Enteritidis.

Aunque el índice morfométrico de la bolsa de Fabricio de los pollos inoculados con los microorganismos patógenos (*S. Typhimurium*, *C. perfringens* y *S. Typhimurium* + *C. perfringens*) no indicó inmunosupresión en todos los tiempos evaluados, el análisis histopatológico de dicho órgano reveló signos de atrofia desde los 22 días de vida; cambios en la integridad, así como en el funcionamiento de la bolsa de Fabricio pueden ocasionar cambios en la producción de inmunoglobulinas (Gomes *et al.*, 2014) lo que implica inmunosupresión. Estos resultados indican que la evaluación macroscópica de la bolsa de Fabricio no siempre refleja la capacidad inmune ni el grado de daño de la bolsa (Aihara *et al.*, 2015).

Por otro lado, el índice morfométrico de los grupos inoculados con los patógenos y tratados con el simbiótico (Simbiótico + *S. Typhimurium*, Simbiótico + *C. perfringens* y Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens*) confirma lo encontrado en la evaluación histopatológica, ya que los signos de atrofia en la bolsa de estas aves se identificaron a partir de los 36 días de vida, fecha en la que se encontraron índices iguales o inferiores a 1. Esto hace suponer que el simbiótico podría promover la inmunocompetencia de los pollos, sin embargo, su efecto no es prolongado.

Cabe destacar que no se encontraron signos de atrofia en el análisis histopatológico del grupo simbiótico (SB), lo que concuerda con el índice morfométrico (igual o mayor a 1.1) encontrado en dicho grupo.

En la investigación avícola se han utilizado herramientas multivariadas como el Análisis de Componentes Principales y análisis de conglomerados jerárquicos,

para analizar el desempeño y los rasgos morfo-estructurales de las canales (Pinto *et al.*, 2006; Udeh y Ogbu, 2012), para observar cómo se puede dividir el ciclo de postura y cuál es la relación de los valores de producción de huevo entre los períodos parciales y el período total (Venturini *et al.*, 2013) y para comparar los métodos de huella genómica de PCR para la diferenciación de *Escherichia coli* fecal en humanos, aves de corral y aves silvestres (Mohapatra *et al.*, 2007), pero hasta donde se sabe, esta es la primera vez que han sido utilizadas para evaluar el efecto de una mezcla simbiótica sobre la salud y el crecimiento de los pollos de engorda.

El análisis de componentes principales reveló diferentes patrones entre el día 18 y el día 39. En ambos tiempos las variables: índice vellosidad/cripta, conversión alimenticia, longitud de las vellosidades y grosor de la mucosa, se ven influenciadas por las bacterias ácido lácticas. Según Cisek y Binek (2014), la microbiota intestinal afecta, positiva o negativamente, la maduración y el desarrollo intestinal.

A los 18 días la variable consumo alimentario se vio influenciada por las bacterias ácido lácticas, situación que no se repite a los 39 días. La administración de probióticos a pollos de engorda puede modificar la ingesta alimentaria, ya sea aumentándola (Torshizi *et al.*, 2010) o disminuyéndola (Amerah *et al.*, 2013).

Por otro lado, las enterobacterias se vieron influenciadas por las bacterias ácido lácticas a los 39 días, este resultado está acorde con lo encontrado en los recuentos de enterobacterias, donde no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos hasta los 32 días de vida.

El análisis jerárquico de conglomerados agrupó los diferentes tratamientos en cuatro conglomerados el día 18 y cuatro el día 39, de acuerdo a la similitud del comportamiento de variables entre tratamientos. Es de destacar que, a los 18 días, los grupos Control y Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. Perfringens*, no fueron similares a ningún otro tratamiento, y al final del bioensayo (39 días) ambos formaron un conglomerado indicando su similitud.

De igual manera, el grupo *S. Typhimurium* + *C. Perfringens* fue diferente a todos los tratamientos a los 39 días, resultado acorde con lo encontrado en el análisis histológico, donde el grupo mencionado mostró mayor número de diferencias ($p < 0.05$) con respecto a los otros tratamientos.

9. CONCLUSIONES

Está claramente definido que la microbiota intestinal, en su correcta homeostasis, favorecen el estado de salud de un individuo. En este sentido, el consumo del simbiótico compuesto por *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Pediococcus acidilactici* MA18/5M y fructanos de *Agave tequilana* a pollos de engorda (*Gallus gallus domesticus*) de la línea genética COBBAvian48, contribuyó a modular la microbiota intestinal al incrementar la población de bacterias ácido lácticas; mejoró la integridad intestinal mejorando la altura de las vellosidades intestinales y la relación vellosidad / cripta, así como la respuesta inmunológica mediante el desarrollo de la bolsa de Fabricio (folículos y corteza de los folículos de mayor tamaño) y aumentar la concentración sérica de IgA, lo cual permitió disminuir la severidad y frecuencia de las lesiones histopatológicas intestinales y en bolsa de fabrico asociadas a *S. Typhimurium* y *C. perfringens*. en pollos desafiados con dichos patógenos. Por otro lado, el consumo del simbiótico no ejerció ningún efecto en los parámetros productivos (peso corporal, ingesta de alimento y conversión alimenticia) de los pollos. Por lo tanto, estos complementos alimenticios pueden considerarse como posibles reemplazos de los promotores de crecimiento antimicrobianos en las dietas de pollos de engorda.

10. LITERATURA CITADA

- Adil, S., and S. N. Magray. 2012. Impact and manipulation of gut microflora in poultry: A review. *J. Anim. Vet. Adv.* 6:873–877.
- ADSA, ASAS, PSA. 2010. Guide for the care and use of agricultural animals in research and teaching. Champaign, Illinois.
- Aihara, N., N. Horiuchi, N. Hikichi, M. Ochiai, Y. Hosoda, Y. Ishikawa, Y. Shimazaki, K. Oishi. 2015. Immunoreactivity and morphological changes of bursal follicles in chickens infected with vaccine or wild-type strains of the infectious bursal disease virus. *J. Vet. Med. Sci.* 77:913–918.
- Akpabio, U. 2015. Epidemiology of Poultry Salmonellosis: A Review. *J. Vet. Adv.* 5:902.
- Amerah, A. M., A. Quiles, P. Medel, J. Sánchez, M. J. Lehtinen, M. I. Gracia. 2013. Effect of pelleting temperature and probiotic supplementation on growth performance and immune function of broilers fed maize/soy-based diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 180:55–63.
- Antonissen, G., V. Eeckhaut, K. Van Driessche, L. Onrust, F. Haesebrouck, R. Ducatelle, R. J. Moore, F. Van Immerseel. 2016. Microbial shifts associated with necrotic enteritis. *Avian Pathol.* 45:308–312.
- AVMA (American Veterinary Medical Association). 2013. AVMA guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. American Veterinary Medical Association, Schaumburg, Illinois.
- Awad, W. A., K. Ghareeb, S. Abdel-Raheem, J. Bohm. 2009. Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poult. Sci.* 88:49–56.
- Ayala Monter, M. A., D. H. Sánchez, R. P. Ruiz, S. S. González Muñoz, J. R. Bárcena Gama, O. H. Mendo, N. T. Salado. 2018. Prebiotic effect of two

- sources of inulin on in vitro growth of *Lactobacillus salivarius* and *Enterococcus faecium*. *Rev. Mex. Ciencias Pecu.* 9:346–361.
- Babaahmady, E., R. Joa, J. Noda. 2005. Gumboro Disease. Histopathology of the Bursa of Fabricio in the natural and experimental disease in fattening chicks. *REDVET. Rev. Electrónica Vet.* VI:1–9.
- Barbeito, C. G., N. González. 2014. *Histología de las Aves*. Editorial Universidad Nacional de la Plata. Primera edición. Santiago de Chile, Chile. pp 1 – 36.
- Bartlett, J. R., and M. O. Smith. 2003. Effects of Different Levels of Zinc on the Performance and Immunocompetence of Broilers Under Heat Stress. *Poult. Sci.* 82:1580–1588.
- Bermudez-Brito, M., J. Plaza-Díaz, S. Muñoz-Quezada, C. Gómez-Llorente, A. Gil. 2012. Probiotic mechanisms of action. *Ann. Nutr. Metab.* 61:160–174.
- Buław, M. 2016. The use of inulin in poultry feeding: a review. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl).* 100:1015–1022.
- Cao, L., C. Li, X. J. Yang, Z. J. Li, F. F. Sun, X. H. Wu, J. H. Yao. 2012. Reduced lesions in chickens with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis by *Lactobacillus fermentum* 1.2029. *Poult. Sci.* 91:3065–71.
- Cao, G. T., X. F. Zeng, A. G. Chen, L. Zhou, L. Zhang, Y. P. Xiao, C. M. Yang. 2013. Effects of a probiotic, *Enterococcus faecium*, on growth performance, intestinal morphology, immune response, and cecal microflora in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88. *Poult. Sci.* 92:2949–2955.
- Cazaban, C., N. M. Masferrer, R. D. Pascual, M. N. Espadamala, T. Costa, Y. Gardin. 2015. Proposed bursa of fabricius weight to body weight ratio standard in commercial broilers. *Poult. Sci.* 94:2088–2093.
- Chambers, J. R., J. Gong. 2011. The intestinal microbiota and its modulation for *Salmonella* control in chickens. *Food Res. Int.* 44:3149–3159.

- Chen, F., S. S. Gao, L. Q. Zhu, S. Y. Qin, H. L. Qiu. 2018. Effects of dietary *Lactobacillus rhamnosus* CF supplementation on growth, meat quality, and microenvironment in specific pathogen-free chickens. *Poult. Sci.* 97:118–123.
- Choct, M. 2009. Managing gut health through nutrition. *Br. Poult. Sci.* 50:9–15
- Cisek, A. A., M. Binek. 2014. Chicken intestinal microbiota function with a special emphasis on the role of probiotic bacteria. *Pol. J. Vet. Sci.* 17:385–394.
- Cobb-vantress. 2013. COBB Broiler Management Guide. :1–69. Disponible en <http://www.cobb-vantress.com/docs/default-source/management-guides/broiler-management-guide.pdf>
- Cooper, K. K., J. G. Songer. 2009. Necrotic enteritis in chickens: A paradigm of enteric infection by *Clostridium perfringens* type A. *Anaerobe* 15:55–60 Available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.01.006>.
- Cooper, K. K., J. G. Songer. 2010. Virulence of *Clostridium perfringens* in an experimental model of poultry necrotic enteritis. *Vet. Microbiol.* 142:323–328.
- Cooper, K. K., J. G. Songer, F. A. Uzal. 2013. Diagnosing clostridial enteric disease in poultry. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 25:314–327.
- Dahiya, J. P., D. Hoehler, A. G. Van Kessel, M. D. Drew. 2007. Dietary Encapsulated Glycine Influences *Clostridium perfringens* and *Lactobacilli* Growth in the Gastrointestinal Tract of Broiler Chickens. *J. Nutr.* 137:1408–1414.
- Dar, M. A., S. M. Ahmad, S. A. Bhat, R. Ahmed, U. Urwat, P. T. Mumtaz, T. A. Dar, R. A. Shah, N. A. GANAI. 2017. *Salmonella typhimurium* in poultry: a review. *Worlds. Poult. Sci. J.* 73:345–354.
- Donnenberg, M. S. 2000. Pathogenic strategies of enteric bacteria. *Nature* 406:768–774.

- Drissi, F., V. Merhej, E. Angelakis, A. El Kaoutari, F. Carrière, B. Henrissat, D. Raoult. 2014. Comparative genomics analysis of *Lactobacillus* species associated with weight gain or weight protection. *Nutr. Diabetes* 4:e109.
- Eeckhaut, V., J. Wang, A. Van Parys, F. Haesebrouck, M. Joossens, G. Falony, J. Raes, R. Ducatelle, F. Van Immerseel. 2016. The probiotic *butyricococcus pullicaecorum* reduces feed conversion and protects from potentially harmful intestinal microorganisms and necrotic enteritis in broilers. *Front. Microbiol.* 7:1–9.
- Erdoğan, Z., S. Erdoğan, Ö. Aslantaş, S. Çelik. 2010. Effects of dietary supplementation of synbiotics and phytobiotics on performance, caecal coliform population and some oxidant/antioxidant parameters of broilers. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl).* 94:e40–e48.
- Fallah R, Rezaei H. 2013. Effect of dietary prebiotic and acidifier supplementation on the growth performance, carcass characteristics and serum biochemical parameters of broilers. *J. Cell Anim. Biol.* 7:21–24.
- Finstad, S., C. A. O'Bryan, J. A. Marcy, P. G. Crandall, S. C. Ricke. 2012. Salmonella and broiler processing in the United States: Relationship to foodborne salmonellosis. *Food Res. Int.* 45:789–794.
- Food and Agriculture Organization, (FAO), and (WHO) World Health Organization. 2006. Probiotics in Food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation (FAO and WHO, Eds.). Rome, Italy.
- Gadde, U., W. H. Kim, S. T. Oh, H. S. Lillehoj. 2017. Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: A review. *Anim. Heal. Res. Rev.* 18:26–45.
- Ganapathy, K., A. Bufton, A. Pearson, S. Lemiere, R. C. Jones. 2010. Vaccination of commercial broiler chicks against avian metapneumovirus infection: a comparison of drinking-water, spray and oculo-oral delivery methods. *Vaccine* 28:3944–3948.

- Garden, M., R. Singleton. 2008. Manejo del Pollo de Engorde para un Peso Liviano al Mercado (de 1.5 a 1.8 Kg/de 3.3 a 4.0 lb). Arbor acres boletín Serv.:1–7.
- Ghasemi, H. A., N. Kasani, K. Taherpour. 2014. Effects of black cumin seed (*Nigella sativa* L.), a probiotic, a prebiotic and a synbiotic on growth performance, immune response and blood characteristics of male broilers. *Livest. Sci.* 164:128–134.
- Ghasemi, H. A., M. Shivazad, S. S. Mirzapour Rezaei, M. A. K. Torshizi. 2015. Effect of synbiotic supplementation and dietary fat sources on broiler performance, serum lipids, muscle fatty acid profile and meat quality. *Br. Poult. Sci.* 57:00071668.2015.1098766.
- Gibson, G. R., K. P. Scott, R. A. Rastall, K. M. Tuohy, A. Hotchkiss, A. Dubert-Ferrandon, M. Gareau, E. F. Murphy, D. Saulnier, G. Loh, S. Macfarlane, N. Delzenne, Y. Ringel, G. Kozianowski, R. Dickmann, I. Lenoir-Wijnkoop, C. Walker, R. Buddington. 2010. Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Sci. Technol. Bull. Funct. Foods* 7:1–19.
- Gill, H. S., K. J. Rutherford, J. Prasad, P. K. Gopal. 2000. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Br. J. Nutr.* 83:167–176.
- Gomes, A. V. S., W. M. Quinteiro-Filho, A. Ribeiro, V. Ferraz-de-Paula, M. L. Pinheiro, E. Baskeville, A. T. Akamine, C. S. Astolfi-Ferreira, A. J. P. Ferreira, J. Palermo-Neto. 2014. Overcrowding stress decreases macrophage activity and increases *Salmonella* Enteritidis invasion in broiler chickens. *Avian Pathol.* 43:82–90.
- Gómez, G., C. López, C. Maldonado, E. Ávila. 2010. El sistema inmune digestivo en las aves. *Investig. Cienc.* 48:9–16.

- Gong, J., W. Si, R. J. Forster, R. Huang, H. Yu, Y. Yin, C. Yang, Y. Han. 2007. 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: From crops to ceca. *FEMS Microbiol. Ecol.* 59:147–157.
- Gupta, A., N. Sharma. 2017. Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Ch-2 Isolated from Chuli Characterization of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria- *Pediococcus acidilactici* Ch-2 Isolated from Chuli- A Traditional Apricot Product of Himalayan Region for the Production of N. J. *Food Microbiol. Saf. Hyg.* 02:1–11.
- Hafez, H. M. 2011. *WorldPoultry - Enteric diseases with special attention to Clostridium perfringens.* *Pak. Vet. J.* 31:175–184.
- Haghighi, H. R., J. Gong, C. L. Gyles, M. A. Hayes, B. Sanei, P. Parvizi, H. Gisavi, J. R. Chambers, S. Sharif. 2005. Modulation of antibody-mediated immune response by probiotics in chickens. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12:1387–92.
- Hassanein, S., N. Soliman. 2010. Effect of probiotic (*Saccharomyces cerevisiae*) adding to diets on intestinal microflora and performance of Hy-Line layers hens. *J. Am. Sci* 6:159–169.
- Hassanpour, H., A. K. Z. Moghaddam, M. Khosravi, M. Mayahi. 2013. Effects of synbiotic on the intestinal morphology and humoral immune response in broiler chickens. *Livest. Sci.*
- Heikinheimo, A., M. Lindström, P. E. Granum, H. Korkeala. 2006. Humans as Reservoir for Enterotoxin Gene – carrying *Clostridium perfringens* Type A. *Emerging Infect. Dis.* 12:1724–1729.
- Huyghebaert, G., R. Ducatelle, F. Van Van Immerseel. 2011. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Vet. J.* 187:182–188.

- Van Immerseel, F., J. De Buck, F. Pasmans, G. Huyghebaert, F. Haesebrouck, R. Ducatelle. 2004. Clostridium perfringens in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian Pathol.* 33:537–49.
- Van Immerseel, F., J. I. Rood, R. J. Moore, R. W. Titball. 2009. Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. *Trends Microbiol.* 17:32–36.
- ISBER. 2012. 2012 Best Practices for Repositories Collection, Storage, Retrieval, and Distribution of Biological Materials for Research International Society for Biological and Environmental Repositories. *Biopreserv. Biobank.* 10:79–161 Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24844904>.
- Jensen, B. B., H. Jørgensen. 1994. Effect of dietary fiber on microbial activity and microbial gas production in various regions of the gastrointestinal tract of pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1897–1904.
- Jijon, H., J. Backer, H. Diaz, H. Yeung, D. Thiel, C. McKaigney, C. De Simone, K. Madsen. 2004. DNA from Probiotic Bacteria Modulates Murine and Human Epithelial and Immune Function. *Gastroenterology* 126:1358–1373.
- De Keersmaecker, S. C. J., T. L. A. Verhoeven, J. Desair, K. Marchal, J. Vanderleyden, I. Nagy. 2006. Strong antimicrobial activity of Lactobacillus rhamnosus GG against Salmonella typhimurium is due to accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* 259:89–96.
- Khan, R. U., S. Naz. 2013. The applications of probiotics in poultry production. *Worlds. Poult. Sci. J.* 69:621–632.
- Kim, G. B., Y. M. Seo, C. H. Kim, I. K. Paik. 2011. Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. *Poult. Sci.* 90:75–82.
- Kizerwetter-Świda, M., M. Binek. 2009. Protective effect of potentially probiotic Lactobacillus strain on infection with pathogenic bacteria in chickens. *Pol. J. Vet. Sci.* 12:15–20.

- Knap, I., A. B. Kehlet, M. Bennedsen, G. F. Mathis, C. L. Hofacre, B. S. Lumpkins, M. M. Jensen, M. Raun, A. Lay. 2011. *Bacillus subtilis* (DSM17299) significantly reduces *Salmonella* in broilers. *Poult. Sci.* 90:1690–1694.
- Kogut, M. H., M. H. Kogut. 2016. Cytokines and prevention of infectious diseases in poultry: A review Cytokines and prevention of infectious diseases in poultry : a review. 9457.
- Korver, D. R. 2012. Implications of changing immune function through nutrition in poultry. *Anim. Feed Sci. Technol.* 173:54–64.
- Lammers, K. M., P. Brigidi, B. Vitali, P. Gionchetti, F. Rizzello, E. Caramelli, D. Matteuzzi, M. Campieri. 2003. Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 38:165–172.
- Laudadio, V., L. Passantino, A. Perillo, G. Lopresti, a. Passantino, R. U. Khan, V. Tufarelli. 2012. Productive performance and histological features of intestinal mucosa of broiler chickens fed different dietary protein levels. *Poult. Sci.* 91:265–270.
- Lee, S., H. S. Lillehoj, D. W. Park, Y. H. Hong, J. J. Lin. 2007. Effects of *Pediococcus*- and *Saccharomyces*-based probiotic (MitoMax®) on coccidiosis in broiler chickens. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30:261–268.
- Li, J., H. Hao, G. Cheng, C. Liu, S. Ahmed, M. A. B. Shabbir, H. I. Hussain, M. Dai, Z. Yuan. 2017. Microbial shifts in the intestinal microbiota of *Salmonella* infected chickens in response to enrofloxacin. *Front. Microbiol.* 8:1–14.
- Librera, J. E., Di Masso, R.J., Canet, Z.E., Font, M.T., Dottavio, A. M. 2003. Crecimiento, consumo de alimento y eficiencia alimenticia en pollos campero inta con diferente genotipo materno. *Fave - Ciencias Vet.* 2.

- Lumpkins, B. S., A. B. Batal, M. D. Lee. 2010. Evaluation of the bacterial community and intestinal development of different genetic lines of chickens. *Poult. Sci.* 89:1614–1621.
- M'Sadeq, S. A., S. Wu, R. A. Swick, M. Choct. 2015. Towards the control of necrotic enteritis in broiler chickens with in-feed antibiotics phasing-out worldwide. *Anim. Nutr.* 1:1–11.
- Madej, J. P., M. Bednarczyk. 2016. Effect of in ovo- delivered prebiotics and synbiotics on the morphology and specific immune cell composition in the gut-associated lymphoid tissue. *Poult. Sci.* 95:19–29.
- Manuel, V., S. Soto, J. Luis, C. Montiel, P. D. Matzumura, C. Gustavo, V. Peláez. 2005. Effect of energy source and level on the length of intestinal villi, immune response and the production performance in broilers. *Vet. Méx* 36:119–126.
- Mao, X., C. Gu, H. Hu, J. Tang, D. Chen, B. Yu, J. He, J. Yu, J. Luo, G. Tian. 2016. Dietary lactobacillus rhamnosus GG supplementation improves the mucosal barrier function in the intestine of weaned piglets challenged by porcine rotavirus. *PLoS One* 11:1–14.
- Marianelli, C., N. Cifani, P. Pasquali. 2010. Evaluation of antimicrobial activity of probiotic bacteria against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar typhimurium 1344 in a common medium under different environmental conditions. *Res. Microbiol.* 161:673–680.
- Marín M., C. Láinez. 2005. Detección de *Salmonella* en heces durante el engorde de broilers. AECA – WPSA. Disponible en http://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/deteccion_de_salmonella_en_heces_en_pollos__marin__2009.pdf.
- Midilli, M., M. Alp, N. Kocabağlı, Ö. H. Muğlalı, N. Turan, H. Yılmaz, S. Çakir. 2008. Effects of dietary probiotic and prebiotic supplementation on growth

- performance and serum IgG concentration of broilers. *South African J. Anim. Sci.* 38:21–27.
- Mikoleit, M. L. 2010. WHO Global Foodborne Infections Network " A WHO network building capacity to detect, control and prevent foodborne and other enteric infections from farm to table " Laboratory Protocol : " Isolation of Salmonella and Shigella from Faecal Specimens ." WHO Glob. Foodborne Infect. Netw. Lab. Sub Comm.:1–15.
- Min, Y. N., H. L. Yang, Y. X. Xu, Y. P. Gao. 2016. Effects of dietary supplementation of synbiotics on growth performance, intestinal morphology, sIgA content and antioxidant capacities of broilers. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*.
- Mohapatra, B. R., K. Broersma, A. Mazumder. 2007. Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. *FEMS Microbiol. Lett.* 277:98–106.
- Mookiah, S., C. C. Sieo, K. Ramasamy, N. Abdullah, Y. W. Ho. 2014. Effects of dietary prebiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation concentrations of broiler chickens. *J. Sci. Food Agric.* 94:341–348.
- Moore, R. J. 2016. Necrotic enteritis predisposing factors in broiler chickens. *Avian Pathol.* 45:275–281.
- Moran, E. T. 2014. Intestinal events and nutritional dynamics predispose *Clostridium perfringens* virulence in broilers. *Poult. Sci.* 93:3028–3036.
- Mountzouris, K. C., P. Tsitsrikos, I. Palamidi, A. Arvaniti, M. Mohnl, G. Schatzmayr, K. Fegeros. 2010. Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. *Poult. Sci.* 89:58–67.

- Muniz, E. C., V. B. Fascina, P. P. Pires, A. S. Carrijo, E. B. Guimarães. 2006. Histomorphology of Bursa of Fabricius: Effects of Stock Densities on Commercial Broilers. *Brazilian J. Poult. Sci.* 8:217–220.
- Nabizadeh, A. 2012. The effect of inulin on broiler chicken intestinal microflora, gut morphology, and performance. *J. Anim. Feed Sci.* 21:725–734.
- Naghi - Shokri, A., H. A. Ghasemi, K. Taherpour, A. Naghi Shokri, H. A. Ghasemi, K. Taherpour, A. Naghi - Shokri, H. A. Ghasemi, K. Taherpour. 2016. Evaluation of Aloe vera and synbiotic as antibiotic growth promoter substitutions on performance, gut morphology, immune responses and blood constituents of broiler chickens. *Anim. Sci. J.* 88:306–313.
- Naghi, A. S., H. A. Ghasemi, K. Taherpour. 2017. Evaluation of Aloe vera and synbiotic as antibiotic growth promoter substitutions on performance, gut morphology, immune responses and blood constituents of broiler chickens. *Anim. Sci. J.* 88:306–313.
- Nakphaichit, M., S. Thanomwongwattana, C. Phraephaisarn, N. Sakamoto, S. Keawsompong, J. Nakayama, S. Nitisinprasert. 2011. The effect of including *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 during post-hatch feeding on the growth and ileum microbiota of broiler chickens. *Poult. Sci.* 90:2753–2765.
- Olkowski, A. A., C. Wojnarowicz, M. Chirino-Trejo, B. Laarveld, G. Sawicki. 2008. Sub-clinical necrotic enteritis in broiler chickens: Novel etiological consideration based on ultra-structural and molecular changes in the intestinal tissue. *Res. Vet. Sci.* 85:543–553.
- Olnood, C. G., S. S. M. Beski, M. Choct, P. A. Iji. 2015. Novel probiotics: Their effects on growth performance, gut development, microbial community and activity of broiler chickens. *Anim. Nutr.* 1:184–191.
- Ouled-Haddar, H., T. Idoui, M. Sifour, M. Guezira, M. Bouthabet. 2012. Isolation, characterization and microencapsulation of probiotic *Lactobacillus curvatus* G7 from chicken crop. *Online J. Sci. Technol.* 2:6.

- Pandey, K. R., S. R. Naik, B. V. Vakil. 2015. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *J. Food Sci. Technol.* 52:7577–7587.
- Papagianni, M., S. Anastasiadou. 2009. Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. *Microb. Cell Fact.* 8:3.
- Park, J. H., I. H. Kim. 2015. The effects of the supplementation of *Bacillus subtilis* RX7 and B2A strains on the performance, blood profiles, intestinal *Salmonella* concentration, noxious gas emission, organ weight and breast meat quality of broiler challenged with *Salmonella typhimuri*. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 99:326–334.
- Patterson, J.A., K. M. Burkholder. 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult. Sci.* 82:627–631.
- Pedroso, A. A., J. F. M. Menten, M. R. Lambais. 2005. The structure of bacterial community in the intestines of newly hatched chicks. *J. Appl. Poult. Res.* 14:232–237.
- Pelicano, E., P. Souza, H. Souza, D. Figueiredo, M. Boiago, S. Carvalho, V. Bordon. 2005. Intestinal mucosa development in broiler chickens fed natural growth promoters. *Rev. Bras. Ciência Avícola* 7:221–229.
- Peña, A. S. 2007. Flora intestinal, probióticos, prebióticos, simbióticos y alimentos novedosos. *Rev. Esp. Enfermedades Dig.* 99:653–658.
- Peña, J. A., J. Versalovic. 2003. *Lactobacillus rhamnosus* GG decreases TNF- α production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. *Cell. Microbiol.* 5:277–285.
- Pinto, L. F. B., I. U. Packer, C. M. R. De Melo, M. C. Ledur, L. L. Coutinho. 2006. Principal components analysis applied to performance and carcass traits in the chicken. *Anim. Res.* 55:419–425.
- Pokusaeva, K., G. F. Fitzgerald, D. Van Sinderen. 2011. Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria*. *Genes Nutr.* 6:285–306.

- Qing, X., D. Zeng, H. Wang, X. Ni, L. Liu, J. Lai, A. Khalique, K. Pan, B. Jing. 2017. Preventing subclinical necrotic enteritis through *Lactobacillus johnsonii* BS15 by ameliorating lipid metabolism and intestinal microflora in broiler chickens. *AMB Express* 7:139.
- La Ragione, R. M., A. Narbad, M. J. Gasson, M. J. Woodward. 2004. In vivo characterization of *Lactobacillus johnsonii* FI9785 for use as a defined competitive exclusion agent against bacterial pathogens in poultry. *Lett. Appl. Microbiol.* 38:197–205.
- Revidatti, F. A., R. J. Fernández, J. C., Terraes, G. L. Sandoval, and P. Esquivel de Luchi. 2002. Modificaciones del peso corporal e indicadores de estrés en pollos parrilleros sometidos a inmovilización y volteo. *Rev. Vet.:*12/13: 1y2.
- Rajo, A. 2014. Cálculo del tamaño muestral en procedimientos experimentales con animales. Valoración de las incidencias. *Anim. Lab.* 62:31–33.
- Sakaridis, I., N. Soutos, C. I. Dovas, E. Papavergou, I. Ambrosiadis, P. Koidis. 2012. Lactic acid bacteria from chicken carcasses with inhibitory activity against *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. *Anaerobe* 18:62–66.
- Salehimanesh, A., M. Mohammadi, M. Roostaei-Ali Mehr. 2016. Effect of dietary probiotic, prebiotic and synbiotic supplementation on performance, immune responses, intestinal morphology and bacterial populations in broilers. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl).* 100:694–700.
- Salim, H. M., H. K. Kang, N. Akter, D. W. Kim, J. H. Kim, M. J. Kim, J. C. Na, H. B. Jong, H. C. Choi, O. S. Suh, W. K. Kim. 2013. Supplementation of direct-fed microbials as an alternative to antibiotic on growth performance, immune response, cecal microbial population, and ileal morphology of broiler chickens. *Poult. Sci.* 92:2084–2090.
- Samanta, A. K., N. Jayapal, S. Senani, A. P. Kolte, M. Sridhar. 2013. Prebiotic inulin: Useful dietary adjuncts to manipulate the livestock gut microflora. *Brazilian J. Microbiol.* 44:1–14.

- Segers, M. E., S. Lebeer. 2014. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG - host interactions. *Microb. Cell Fact.* 13:S7.
- Shojadoost, B., A. R. Vince, J. F. Prescott. 2012. The successful experimental induction of necrotic enteritis in chickens by *Clostridium perfringens*: A critical review. *Vet. Res.* 43:1 Available at Veterinary Research.
- Shu, Q., H. S. Gill. 2002. Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20TM) against *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 34:59–64.
- Stanley, D., S. E. Denman, R. J. Hughes, M. S. Geier, T. M. Crowley, H. Chen, V. R. Haring, R. J. Moore. 2012a. Intestinal microbiota associated with differential feed conversion efficiency in chickens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96:1361–1369.
- Stanley, D., R. J. Hughes, R. J. Moore. 2014. Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: Influence on health, productivity and disease. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98:4301–4310.
- Stanley, D., A. L. Keyburn, S. E. Denman, R. J. Moore. 2012b. Changes in the caecal microflora of chickens following *Clostridium perfringens* challenge to induce necrotic enteritis. *Vet. Microbiol.* 159:155–162.
- Talebi, A., A. Amani, M. Pourmahmod, P. Saghaei, R. Rezaie. 2015. Synbiotic enhances immune responses against infectious bronchitis , infectious bursal disease , Newcastle disease and avian influenza in broiler chickens. *Vet. Res. Forum* 6:191–197.
- Tambini, A., M. Alba, R. Perales, N. Falcón. 2010. Evaluación Anatómo-Histopatológica de bursa, timo y bazo de pollos de carne criados sobre cama reutilizada vs. cama neva. *Rev Inv Vet Perú* 21:180–186.
- Teng, P., W. K. Kim. 2018. Review: Roles of Prebiotics in Intestinal Ecosystem of Broilers. *Front. Vet. Sci.* 5:1–18.

- Tian, X., Y. Shao, Z. Wang, Y. Guo. 2016. Effects of dietary yeast B-glucans supplementation on growth performance, gut morphology, intestinal *Clostridium perfringens* population and immune response of broiler chickens challenged with necrotic enteritis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 215:144–155.
- Timbermont, L., F. Haesebrouck, R. Ducatelle, F. Van Immerseel. 2011. Necrotic enteritis in broilers: An updated review on the pathogenesis. *Avian Pathol.* 40:341–347.
- Torrubia, J. 2009. Evolución del tamaño de la bolsa de fabricio. Merial Lab. S.A.:23–26.
- Torshizi, M. A. K., A. R. Moghaddam, S. Rahimi, N. Mojgani. 2010. Assessing the effect of administering probiotics in water or as a feed supplement on broiler performance and immune response. *Br. Poult. Sci.* 51:178–184.
- Udeh, I., C. C. Ogbu. 2012. Principal Component Analysis of Body Measurements In Three Strains of Broiler Chicken. *Sci. World J.* 6:11–14.
- Valladares, J. 2014. Necropsias en Aves | BM Editores. Disponible en <http://bmeditores.mx/necropsias-en-aves>.
- Venturini, G. C., R. P. Savegnago, B. N. Nunes, M. C. Ledur, G. S. Schmidt, L. El Faro, D. P. Munari. 2013. Genetic parameters and principal component analysis for egg production from White Leghorn hens. *Poult. Sci.* 92:2283–2289 Available at <http://ps.fass.org/content/92/9/2283.abstract?etoc>.
- Wang, H., X. Ni, X. Qing, L. Liu, J. Lai, A. Khaliq, G. Li, K. Pan, B. Jing, D. Zeng. 2017. Probiotic Enhanced Intestinal Immunity in Broilers against Subclinical Necrotic Enteritis. *Front. Immunol.* 8:1–14.
- Wu, R. Y., M. Abdullah, P. Määttänen, A. V. C. Pilar, E. Scruten, K. C. Johnson-Henry, S. Napper, C. O'Brien, N. L. Jones, P. M. Sherman. 2017a. Protein kinase C σ signaling is required for dietary prebiotic-induced strengthening of intestinal epithelial barrier function. *Sci. Rep.* 7:1–10 Available at <http://dx.doi.org/10.1038/srep40820>.

- Wu, R. Y., P. Määttänen, S. Napper, E. Scruten, B. Li, Y. Koike, K. C. Johnson-Henry, A. Pierro, L. Rossi, S. R. Botts, M. G. Surette, P. M. Sherman. 2017b. Non-digestible oligosaccharides directly regulate host kinome to modulate host inflammatory responses without alterations in the gut microbiota. *Microbiome* 5:135.
- Xu, Z. R., C. H. Hu, M. S. Xia, X. A. Zhan, M. Q. Wang. 2003. Effects of Dietary Fructooligosaccharide on Digestive Enzyme Activities, Intestinal Microflora and Morphology of Male Broilers. *Poult. Sci.* 82:1030–1036.
- Yan, F., D. B. Polk. 2012a. *Lactobacillus rhamnosus* GG: An Updated Strategy to Use Microbial Products to Promote Health. *Funct. food Rev.* 4:77–84
- Yan, F., B. Polk. 2012b. Characterization of a probiotic-derived soluble protein which reveals a mechanism of preventive and treatment effects of probiotics on intestinal inflammatory diseases. *Gut Microbes* 3:25–28.
- Yang, Y., P. A. Iji, M. Choct. 2009. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. *Worlds. Poult. Sci. J.* 65:97.
- Yitbarek, A., H. Echeverry, P. Munyaka, J. C. Rodriguez-Lecompte. 2015. Innate immune response of pullets fed diets supplemented with prebiotics and synbiotics. *Poult. Sci.* 94:1802–1811.
- Yitbarek, A., J. C. Rodriguez-Lecompte, H. M. Echeverry, P. Munyaka, N. Barjesteh, S. Sharif, G. Camelo-Jaimes. 2013. Performance, histomorphology, and toll-like receptor, chemokine, and cytokine profile locally and systemically in broiler chickens fed diets supplemented with yeast-derived macromolecules. *Poult. Sci.* 92:2299–310.
- Zhao, S., Y. Jia, D. Han, H. Ma, S. Zahid, A. Shah, Y. Ma. 2016. Influence of the structural development of bursa on the susceptibility of chickens to infectious bursal disease virus. *Poult. Sci.* 95:2786–2794.

11. ANEXOS

Anexo A. Efecto del simbiótico sobre la morfología de la bolsa de Fabricio de pollos de engorda retados con *Salmonella Typhimurium* y *Clostridium perfringens*

| Compar- timentos (μm) | Tratamientos | | | | | | | |
|--|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| | CT | SB | SBST | ST | SBCP | CP | SBSTCP | STCP |
| 18 días | | | | | | | | |
| Folículo | 317±142 | 295±92 | 302±73 | 312±24 | 317±67 | 327±45 | 305±68 | 245±90 |
| Corteza | 127±51 | 129±40 | 150±44 | 157±26 | 110±26 ^a | 175±39 ^b | 140±42 ^A | 59±20 ^B |
| Médula | 189±108 | 166±57 | 152±57 | 155±26 | 206±63 | 151±32 | 165±44 | 186±77 |
| 22 días | | | | | | | | |
| Folículo | 281±67 | 304±55 | 314±71 | 340±46 | 340±46 | 342±75 | 275±65 | 311±63 |
| Corteza | 114±38 | 147±36 | 172±73 | 173±49 | 112±27 | 130±27 | 99±16 ^A | 146±34 ^B |
| Médula | 167±47 | 157±45 | 142±31 | 152±51 | 228±61 | 211±74 | 176±61 | 165±63 |
| 25 días | | | | | | | | |
| Folículo | 135±18 ^a | 320±74 ^b | 351±82 | 310±62 | 280±50 | 263±40 | 373±61 | 367±73 |
| Corteza | 66±14 ^a | 158±45 ^b | 190±88 ^A | 111±19 ^B | 104±34 | 144±31 | 141±27 | 113±47 |
| Médula | 69±13 ^a | 162±75 ^b | 161±52 | 198±75 | 176±51 ^a | 119±43 ^b | 232±56 | 254±73 |
| 32 días | | | | | | | | |
| Folículo | 161±16 ^a | 363±111 ^b | 351±54 ^A | 203±63 ^B | 344±68 | 312±60 | 454±107 ^A | 337±55 ^B |
| Corteza | 80±16 ^a | 196±78 ^b | 203±70 | 70±28 ^B | 188±44 ^a | 95±32 ^b | 278±102 ^A | 116±30 ^B |
| Médula | 82±23 ^a | 167±78 ^b | 148±29 | 133±50 | 156±49 ^a | 217±68 ^b | 176±50 | 221±60 |
| 36 días | | | | | | | | |
| Folículo | 176±31 ^a | 370±95 ^b | 420±38 ^A | 348±41 ^B | 347±62 | 342±68 | 380±63 | 376±61 |
| Corteza | 98±29 ^a | 236±67 ^b | 279±47 ^A | 161±48 ^B | 189±71 | 160±44 | 193±56 | 130±55 |
| Médula | 78±22 ^a | 134±61 ^b | 142±50 | 186±58 | 158±45 | 182±55 | 187±52 | 246±79 |
| 39 días | | | | | | | | |
| Folículo | 180±32 ^a | 304±78 ^b | 334±102 | 301±87 | 415±109 ^a | 288±60 ^b | 360±110 | 315±55 |
| Corteza | 97±22 ^a | 174±73 ^b | 201±69 ^A | 132±37 ^B | 195±52 ^a | 81±33 ^b | 181±79 | 137±49 |
| Médula | 83±22 | 130±40 | 133±55 | 170±81 | 220±84 | 207±53 | 179±97 | 178±60 |

CT: Control; SB: Simbiótico; SBST: Simbiótico + *S. Typhimurium*; ST: *S. Typhimurium*; SBCP: Simbiótico + *C. perfringens*; CP: *C. perfringens*; SBSTCP: Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens*; STCP: *S. Typhimurium* + *C. perfringens*.

Filas con diferentes superíndices (a – b o A – B) son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Anexo B. Efecto del simbiótico sobre la morfología del timo de pollos de engorda retados con *Salmonella Typhimurium* y *Clostridium perfringens*

| Compar- timentos (μm) | Tratamientos | | | | | | | |
|--|----------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| | CT | SB | SBST | ST | SBCP | CP | SBSTCP | STCP |
| 18 días | | | | | | | | |
| Folículo | 642±190 ¹ | 936±365 | 1038±200 ² | 1104±330 | 1178±401 ² | 873±269 | 1088±492 ² | 794±245 |
| Corteza | 381±102 | 550±261 | 621±131 | 654±258 | 725±246 | 574±153 | 668±276 | 484±127 |
| Médula | 261±113 | 386±136 | 417±154 | 450±122 | 454±170 | 299±145 | 420±255 | 311±182 |
| 22 días | | | | | | | | |
| Folículo | 489±151 ¹ | 803±251 ² | 1103±531 ² | 1209±188 ² | 918±348 ^{A2} | 1323±331 ^{B2} | 784±240 ² | 811±166 ² |
| Corteza | 292±86 ¹ | 497±173 ² | 678±337 | 730±135 | 532±199 ^A | 796±234 ^B | 511±185 | 506±104 |
| Médula | 107±75 | 305±114 | 425±218 | 479±111 | 387±176 ^A | 527±165 ^B | 273±133 | 305±106 |
| 25 días | | | | | | | | |
| Folículo | 540±182 ¹ | 870±459 | 962±347 ² | 949±231 ² | 1037±410 ² | 1141±382 ² | 711±273 | 939±456 ² |
| Corteza | 346±128 | 503±223 | 596±181 | 628±197 | 704±274 | 714±185 | 507±218 | 580±280 |
| Médula | 194±70 | 367±248 | 366±215 | 321±115 | 333±236 | 426±233 | 204±71 | 359±189 |
| 32 días | | | | | | | | |
| Folículo | 372±151 ¹ | 856±368 | 1166±327 | 1115±423 | 974±286 | 1398±525 ² | 905±388 | 1526±2297 ² |
| Corteza | 197±73 | 590±267 | 742±240 | 678±298 | 556±122 | 770±215 | 555±155 | 1221±2247 |
| Médula | 175±87 | 266±137 | 425±168 | 437±240 | 417±173 | 628±361 | 350±250 | 305±123 |
| 36 días | | | | | | | | |
| Folículo | 474±165 ¹ | 995±359 ² | 1023±402 ^{A2} | 554±270 ^B | 1004±616 ² | 844±334 ² | 695±241 | 1013±470 ² |
| Corteza | 290±138 ¹ | 610±238 ² | 670±213 ^A | 343±135 ^B | 660±472 | 508±206 | 440±188 | 625±279 |
| Médula | 183±69 | 385±236 | 353±250 ^A | 211±146 ^B | 344±209 | 336±183 | 522±99 | 388±209 |
| 39 días | | | | | | | | |
| Folículo | 410±149 ¹ | 987±195 ² | 1166±485 ² | 956±376 ² | 887±290 ² | 1029±232 ² | 641±213 | 634±190 |
| Corteza | 248±107 ¹ | 565±195 ² | 690±269 | 621±178 | 580±197 | 670±202 | 447±166 | 403±138 |
| Médula | 163±65 ¹ | 423±128 ² | 476±237 | 335±244 | 308±188 | 360±119 | 194±82 | 230±73 |

CT: Control; SB: Simbiótico; SBST: Simbiótico + *S. Typhimurium*; ST: *S. Typhimurium*; SBCP: Simbiótico + *C. perfringens*; CP: *C. perfringens*; SBSTCP: Simbiótico + *S. Typhimurium* + *C. perfringens*; STCP: *S. Typhimurium* + *C. perfringens*.

Filas con diferentes superíndices (a – b o A – B) son significativamente diferentes ($p < 0.05$)