



**Evaluación de cepas probióticas  
(*L. acidophilus*, *L. casei* y *E. faecium*) como  
inmunomoduladores nutricionales en  
pollos de engorde**

**Liliana Andrea Chávez Gómez**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Producción Animal  
Medellín, Colombia  
2014

# **Evaluación de cepas probióticas (*L. acidophilus*, *L. casei* y *E. faecium*) como inmunomoduladores nutricionales en pollos de engorde**

**Liliana Andrea Chávez Gómez**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ciencias Agrarias**

Director:

Ph.D. Jaime Parra Suescún

Codirector:

Ph.D. Albeiro López Herrera

Línea de Investigación:

Nutrición Animal

Grupo de Investigación:

Biodiversidad y Genética molecular "BIOGEM"

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Producción Animal  
Medellín - Colombia

2014

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres y mi hermano por la paciencia y el apoyo en todo este proceso.

A mis tutores, Jaime E. Parra y Albeiro López por la confianza depositada en mí y por su apoyo y disposición incondicional; sin los cuales no habría sido posible la realización del proyecto.

A Tomás Madrid y su grupo familiar por la disponibilidad y colaboración prestada, así como también todos los profesores, compañeros y amigos que con su confianza y apoyo hicieron posible llevar a buen término este proyecto.

## RESUMEN

Los probióticos son utilizados normalmente en la alimentación para favorecer el desarrollo intestinal y la salud de los animales. Entre ellos están las Bacterias Acidolácticas (BAL), que actúan en la regeneración de la microbiota intestinal. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto que tiene la utilización de aditivos nutricionales diferentes a los antibióticos, como las BAL, en la alimentación de pollos de engorde para favorecer el estado inmunológico evitando posibles enfermedades; para esto se utilizaron 60 aves que fueron eutanasiadas escalonadamente los días 7, 14, 21, 28, 35 y 42 de vida; se extrajeron los órganos para análisis alométrico; se tomó una muestra de sangre de cada animal para análisis de anticuerpos vacunales contra gumboro; se tomó una muestra del contenido intestinal para medir pH; y para los análisis productivos se pesaron semanalmente y todos los días se midió el consumo de alimento. Las aves fueron alimentadas con dos dietas: una dieta basal, y otra dieta basal con adición de antibiótico. El probiótico se suministró en el agua de bebida a las aves alimentadas con la dieta basal, garantizando una concentración de  $10^7$  UFC/mL. El diseño estadístico utilizado fue de bloques al azar en arreglo de parcelas divididas (5 dietas por 6 edades). La inclusión de probióticos, específicamente de *E. faecium*, mejoró los parámetros productivos ( $P < 0.05$ ) como: peso, conversión, porcentaje de supervivencia, factor de eficiencia americana, índice productivo, eficiencia europea y eficiencia alimenticia; la adición de *E. faecium* o *L. acidophilus* mejoró las variables de peso de órganos, crecimiento alométrico y pH intestinal ( $P < 0.05$ ) e influyeron en los títulos de anticuerpos ( $P < 0.05$ ); lo cual se vio reflejado en la salud de las aves, en el aumento en el rendimiento económico y en la disminución de antibióticos en la dieta. Por todo lo anterior los probióticos pueden ser un reemplazo eficaz y seguro de los antibióticos como promotores de crecimiento, cuando se utilizan desde el primer día de edad del ave.

**Palabras clave:** Probiótico, Análisis alométrico, Anticuerpos, Pollo, *E. faecium*, *L. acidophilus*, *L. casei*.

## ABSTRACT

Probiotics are commonly used in animal's diet to boost intestinal development and concurrently their health. One of the most common microbes employed as Probiotics are Lactobacillales or lactic acid bacteria (LAB), this strain plays an important role regenerating the intestinal flora. The objective of this study was to evaluate the effects of using diverse nutritional additives other than antibiotics, in this case, using LAB in broiler's feeding to improve the immune system avoiding possible diseases. In order to assess this, 60 birds were slaughtered stepwise on days 7, 14, 21, 28, 35 y 42; the organs were extracted for allometric studies; a blood sample collected from each animal for analysis of vaccine antibodies against Gumboro; the intestinal content was sampled to get pH values and for the analysis of production, the food intake was scrutinised on a daily basis and their weight was measured weekly. Poultry were fed with 2 diets: Basal diet and a Basal Diet with added antibiotics. Probiotics were provided in the drinking water supply, ensuring a concentration of  $10^7$ UFC/mL. The statistical model was a randomized split-plot arrangement (5 diets for 6 ages). The inclusion of probiotics, especially *E. faecium*, improved production parameters ( $P < 0.05$ ) as: weight, conversion, survival rate, and feed efficiency. *E. faecium* and *L. acidophilus*, improved the organ weight variables, allometric growth and intestinal pH ( $P < 0.05$ ) and influenced the production of antibodies ( $P < 0.05$ ); which was reflected in the health of the broilers, growing in economic yield and the reduction of antibiotics in the diet. All these means that probiotics may be an effective and safe replacement of antibiotics when used from the broilers hatching.

# CONTENIDO

RESUMEN .....	IV
ABSTRACT.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABLAS.....	X
INTRODUCCIÓN .....	XII
<b>1. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>13</b>
1.1 ASPECTOS GENERALES .....	13
1.2 EL TRACTO GASTROINTESTINAL (TGI) DE LAS AVES.....	15
1.3 CRECIMIENTO ALOMÉTRICO DEL TGI .....	16
1.4 INMUNOLOGIA AVIAR.....	16
1.4.1 Bolsa de Fabricio (Bursa).....	17
1.4.2 Timo.....	18
1.4.3 Bazo.....	18
1.5 MECANISMOS DE DEFENSA DEL APARATO DIGESTIVO .....	18
1.6 GENERALIDADES DE LA MICROBIOTA INTESTINAL.....	19
1.7 SISTEMA INMUNE Y NUTRICIÓN .....	20
1.7.1 Inmunomoduladores .....	21
1.8 ANTIBIÓTICOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO (APC).....	21
1.9 PROBIÓTICOS .....	23
1.9.1 Bacterias Ácido Lácticas (BAL).....	24
1.9.2 Lactobacillus.....	25
1.9.4 Mecanismo de acción de los probióticos.....	25
1.9.5 Mejora de la respuesta Inmune .....	26
1.9.6 Acción sobre la mucosa intestinal.....	26
1.9.7 Producción de sustancias antimicrobianas .....	27
1.9.8 Adherencia a las células intestinales.....	27
1.10 REFERENCIAS.....	27
<b>2. EVALUACIÓN DE CEPAS PROBIÓTICAS (L. acidophilus, L. casei y E. faecium) SOBRE LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN POLLOS DE ENGORDE .....</b>	<b>33</b>

2.1	RESUMEN .....	<b>33</b>
2.2	INTRODUCCIÓN.....	33
2.3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
2.3.1	Localización .....	35
2.3.2	Animales.....	35
2.3.3	Instalaciones y Equipos .....	35
2.3.4	Manejo Sanitario.....	35
2.3.5	Dietas.....	35
2.3.6	Parámetros Zootécnicos.....	36
2.3.7	Diseño estadístico.....	38
2.3.8	Consideraciones éticas .....	38
2.4	RESULTADOS .....	39
2.5	DISCUSIÓN.....	40
2.6	CONCLUSIONES .....	42
2.7	REFERENCIAS.....	43
<b>3.</b>	<b>EVALUACIÓN DE CEPAS PROBIÓTICAS (<i>L. acidophilus</i>, <i>L. casei</i> Y <i>E. faecium</i>) SOBRE EL DESARROLLO ALOMÉTRICO Y MORFOLÓGICO INTESTINAL EN POLLOS DE ENGORDE ....</b>	<b>47</b>
3.1	RESUMEN .....	47
3.2	INTRODUCCIÓN.....	48
3.3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
3.3.1	Localización .....	49
3.3.2	Animales.....	49
3.3.3	Instalaciones y Equipos .....	49
3.3.4	Manejo Sanitario.....	50
3.3.5	Dietas.....	50
3.3.6	Eutanasias humanitarias y toma de muestras órganos.....	50
3.3.7	Diseño estadístico.....	52
3.3.8	Consideraciones éticas .....	52
3.4	RESULTADOS .....	52
3.5	DISCUSIÓN.....	57
3.6	CONCLUSIONES .....	60
3.7	REFERENCIAS.....	60
<b>4.</b>	<b>EFFECTO DE CEPAS PROBIÓTICAS (<i>L. acidophilus</i>, <i>L. casei</i> Y <i>E. faecium</i>) SOBRE EL CRECIMIENTO DE ÓRGANOS LINFOIDES, PH INTESTINAL Y LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS VACUNALES. ....</b>	<b>65</b>

---

4.1 RESUMEN.....	65
4.2 INTRODUCCIÓN .....	65
4.3 MATERIALES Y MÉTODOS .....	67
4.3.1 Localización .....	67
4.3.2 Animales.....	67
4.3.3 Instalaciones y Equipos .....	67
4.3.4 Manejo Sanitario.....	68
4.3.5 Dietas.....	68
4.3.6 Eutanasias humanitarias y toma de muestras órganos.....	68
4.3.7 Toma de muestra y determinación del pH intestinal .....	70
4.3.8 Toma de muestra y determinación de títulos de anticuerpos post-vacunales ..	70
4.3.9 Diseño estadístico.....	70
4.3.10 Consideraciones éticas.....	70
4.4 RESULTADOS .....	71
4.5 DISCUSIÓN.....	73
4.6 CONCLUSIONES .....	75
4.7 REFERENCIAS.....	75

## LISTA DE FIGURAS

	<b>pag</b>
<b>Figura 1:</b> Producción de pollo en Colombia entre 2010 y 2012 .....	13
<b>Figura 2:</b> Consumo per cápita de pollo en Colombia .....	14

## LISTA DE TABLAS

	Pag.
<b>Tabla 1:</b> Composición de la dieta basal.....	37
<b>Tabla 2:</b> Parámetros zootécnicos de pollos que consumieron dietas con cepas probióticas ( <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> y <i>E. faecium</i> ) durante 42 días.....	39
<b>Tabla 3:</b> Parámetros zootécnicos de pollos que consumieron cepas probióticas ( <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> y <i>E. faecium</i> ) durante diferentes períodos de tiempo.....	40
<b>Tabla 4:</b> Peso de los órganos (%PV) y análisis alométrico (CA) de pollos que consumieron dietas con cepas probióticas ( <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> y <i>E. faecium</i> ) durante 42 días.....	53
<b>Tabla 5:</b> Peso de los órganos (%PV) y análisis alométrico (CA) de pollos que consumieron cepas probióticas ( <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> y <i>E. faecium</i> ) durante diferentes períodos de tiempo.....	54
<b>Tabla 6:</b> Comparación entre vellosidades y criptas ( $\mu\text{m}$ ) en diferentes secciones del intestino de pollos que consumieron dietas con cepas probióticas ( <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> y <i>E. faecium</i> ) durante 42 días.....	55
<b>Tabla 7:</b> Comparación entre vellosidades y criptas ( $\mu\text{m}$ ) en diferentes secciones del intestino de pollos que consumieron cepas probióticas ( <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> y <i>E. faecium</i> ) durante diferentes períodos de tiempo.....	56
<b>Tabla 8:</b> pH intestinal, peso (PV%) y crecimiento alométrico de órganos linfoides, y título de anticuerpos post-vacunales de pollos que consumieron dietas con cepas probióticas ( <i>L. acidophilus</i> , <i>L.</i>	

<i>casei</i> y <i>E. faecium</i> ) durante 42 días.....	71
---	----

**Tabla 9:** pH intestinal, peso (PV%) y crecimiento alométrico de órganos linfoides, y título de anticuerpos post-vacunales de pollos que consumieron cepas probióticas (*L. acidophilus*, *L. casei* y *E. faecium*) durante diferentes períodos de tiempo..... 73

## INTRODUCCIÓN

La avicultura es una actividad que ha crecido drásticamente a nivel mundial, alcanzando grandes avances en las últimas décadas (Stewart *et al.*, 2013). La selección genética para aumentar la ganancia de peso ha mejorado la conversión alimenticia, sin embargo el desarrollo de órganos y tejidos relacionados con las respuestas inmunes han resultado perjudicados (Korver, 2012; Ohimain & Ofongo, 2012).

En los sistemas de producción actuales, en los cuales se maneja una alta densidad de aves en el galpón, éstas se enfrentan a diferentes agentes patógenos que pueden ocasionar enfermedades y afectar negativamente la producción (Giannenas *et al.*, 2012; Korver, 2012). Para evitar éste problema, a nivel mundial se han utilizado los antibióticos como promotores de crecimiento (APC) (Král *et al.*, 2012), los cuales mejoran la tasa de crecimiento, la salud y el bienestar de los animales.

El desarrollo de cepas de bacterias resistentes a los APC y la incidencia de ciertas enfermedades en el hombre debido al uso excesivo de éstos hicieron que uso fuera controlado (Agostini *et al.*, 2012; Oso *et al.*, 2013)

Esta situación llevó a que se investigaran alternativas biológicamente seguras a los APC, entre las cuales se encontraron prebióticos, probióticos, simbióticos, nucleótidos, ácidos orgánicos, vitaminas, minerales, entre otros (Placha *et al.*, 2010; Agostini *et al.*, 2012; Oso *et al.*, 2013). Los probióticos son utilizados normalmente en la alimentación para favorecer el desarrollo intestinal y la salud de los animales (Franz *et al.*, 2011). Entre ellos están las Bacterias Acidolácticas (BAL), bacterias gram positivas anaerobias facultativas, que convierten lactosa y otros monosacáridos en ácido láctico y actúan en la regeneración de la flora intestinal (Musa *et al.*, 2009).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la utilización de aditivos nutricionales diferentes a los antibióticos, como las BAL, en la alimentación de pollos de engorde para favorecer el estado inmunológico evitando posibles enfermedades durante su etapa productiva.

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1 ASPECTOS GENERALES

El principal objetivo de la avicultura es la producción de alimentos aptos para el consumo humano, teniendo en cuenta el bienestar de los animales y el respeto por el medio ambiente (Gaggia *et al.*, 2010). En Colombia según la Federación Nacional de Avicultores, el sector avícola de producción de pollo creció un 2% entre el 2010 y 2012 (figura 1) (SAC, 2013).

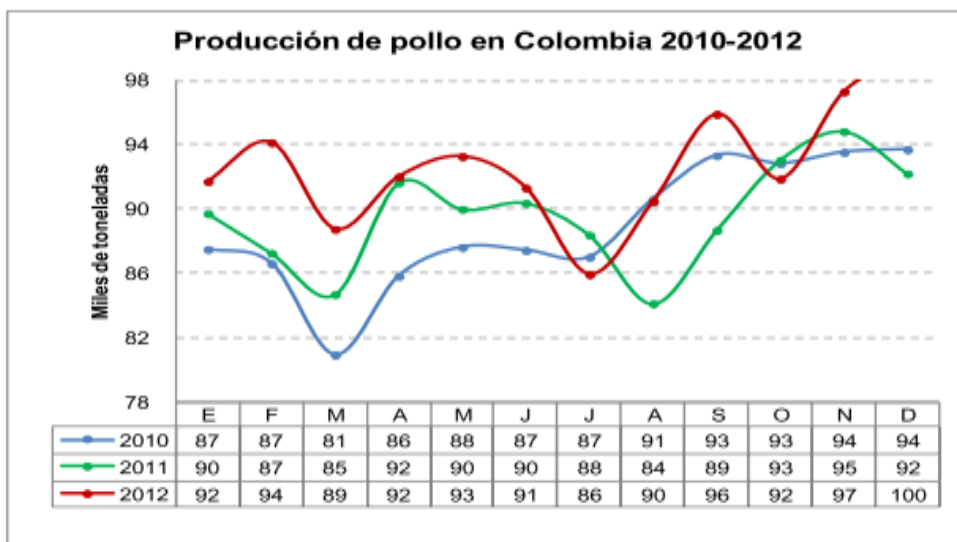


Figura 1: Producción de pollo en Colombia entre 2010 y 2012 (Tomado de SAC, 2013)

En el 2013 en Colombia se encaseteron en promedio 30 millones de pollitos al mes, obteniendo una producción anual promedio de 600.000 toneladas de pollo, para un consumo per cápita de 27 Kg/Hab (figura 2). La participación regional en la producción de pollo la lidera la Zona Central del país (Cundinamarca, Tolima y Huila) con 35% del total, seguida del Valle (19%), Santander (18%), Antioquia (11%), Costa Atlántica (10%), Eje Cafetero (3%) y la zona Oriental (1%). Esta producción se dirige especialmente a los mercados de Bogotá, Medellín, Cali y ciudades de la Costa Atlántica. A diferencia del pasado, los patrones de consumo han cambiado, por cuanto ahora los clientes demandan el pollo en presas, especialmente pierna, perril y alas, y preferiblemente empacadas en bandejas (FINAGRO, 2013).

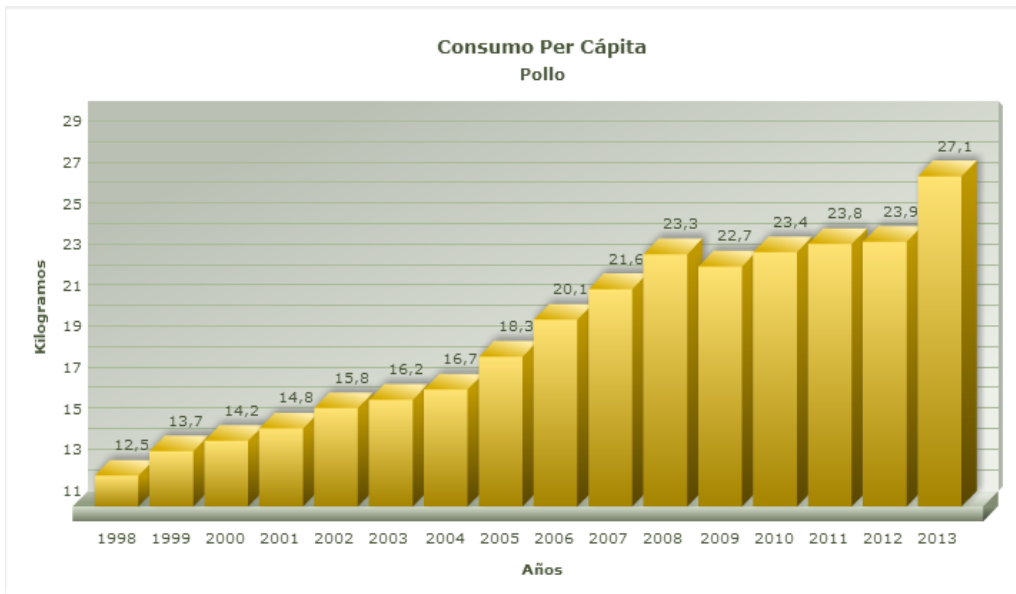


Figura 2: Consumo per cápita de pollo en Colombia (FINAGRO, 2013).

La adaptación al período posterior a la eclosión y el aumento de los factores de estrés que se derivan de las prácticas utilizadas en la producción avícola moderna, pueden debilitar las funciones inmunes y así predisponer a los pollos a la colonización de microorganismos patógenos en el tracto gastrointestinal, lo que representaría una amenaza para la salud de las aves, y a su vez, para la inocuidad alimentaria (Gaggia *et al.*, 2010; Wigley, 2013).

Las enfermedades tienen un impacto económico y social importante, no solo por las pérdidas directas, sino también por las pérdidas indirectas como consecuencia de la inmunosupresión de los animales. Entre las pérdidas directas, se encuentran las económicas, que dependiendo de la virulencia, la dosis del inocuo, y la edad de las aves se podría presentar una alta mortalidad. Entre las pérdidas indirectas, se encuentran problemas a nivel productivo, debido a las alteraciones en el crecimiento y desarrollo de los animales. Esta situación también podría tener un impacto importante en la salud pública, favoreciendo el desarrollo de infecciones de importancia zoonótica (Ingrao *et al.*, 2013).

En los últimos años, los antibióticos se han incluido en la alimentación animal en niveles sub-terapéuticos, actuando como antibióticos promotores de crecimiento (APC) (Gaggia *et al.*, 2010; Huyghebaert *et al.*, 2011; Agostini *et al.*, 2012). La preocupación mundial sobre el desarrollo de la resistencia a los antibióticos, y la transferencia de genes resistentes de los animales al hombre, condujo a la prohibición del uso de los APC en la Unión Europea desde el 1 de enero 2006 (Gaggia *et al.*, 2010; Huyghebaert *et al.*, 2011).

En la actualidad la industria de la nutrición animal se enfrenta a un futuro sin APC, el aditivo más eficaz con el que se contaba. La prohibición en la Unión Europea y el retiro voluntario gradual de los APC en alimentos en otras partes del mundo, ha supuesto una presión adicional a favor de mejorar la salud intestinal y el bienestar de los animales. Actualmente, hay un aumento sustancial de las líneas de investigación dirigidas a evaluar productos alternativos para mantener la flora intestinal beneficiosa y la salud digestiva, donde se incluyen diversas clases de productos como enzimas, probióticos, prebióticos, fitogénicos y ácidos orgánicos. Durante los últimos 10 años, estos productos han sido ampliamente probados y su evaluación continuará en el futuro. Para ser aceptados por la industria, los efectos de estos productos deben ser demostrados por una mejora de los rendimientos productivos de los animales similar a la alcanzada con los APC (Ravindran, 2013).

## **1.2 EL TRACTO GASTROINTESTINAL (TGI) DE LAS AVES**

La alimentación es probablemente el factor más importante en la producción de pollos de engorde, por medio de la cual las aves se pueden exponer a una amplia variedad de agentes a través TGI. La ingesta de alimento está acompañada por el rápido desarrollo del TGI y de los órganos asociados. Después de la eclosión, el momento y la forma de suministro de los nutrientes disponibles para las aves es fundamental para el desarrollo del intestino (Ohimain & Ofongo, 2012).

El TGI de los pollos recién nacidos es básicamente estéril, no contiene microorganismos. Por medio de la alimentación, los microorganismos colonizan poco a poco el TGI, el cual forma un consorcio microbiano estable con el tiempo. Los estudios han demostrado que se necesitan de 2 a 4 semanas para que se establezca la microbiota intestinal (Ohimain & Ofongo, 2012). Durante la primera semana después de la eclosión el crecimiento del sistema gastrointestinal de pollo es muy superior a la de otros órganos en el cuerpo y es esencial para que el ave pueda alcanzar su máximo potencial genético. La función principal del tracto gastrointestinal es la de absorber los nutrientes de la dieta y excretar productos de desecho; Sin embargo, también contiene un ecosistema microbiano único que se ve afectada por los nutrientes presentes en la dieta; y las secreciones y respuestas sistémicas del hospedero (Torok et al, 2011).

En los animales, el TGI tiene como principal función la degradación y absorción de nutrientes necesarios para mantenimiento, crecimiento y reproducción. Tiene una

barrera, la cual separa el medio interno del entorno luminal, desarrollando un ambiente dinámico constituido de interacciones complejas entre el contenido presente en el lumen intestinal, microorganismos y las células epiteliales de absorción, proporcionando protección física e inmunológica (Chaucheyras & Durand, 2010; Gaggia et al., 2010; Patel et al, 2014).

El epitelio intestinal, junto con el moco, proporcionan la primera barrera de defensa sensorial, mediada por un transporte activo entre las bacterias nativas residentes, patógenos y otros antígenos. Las bacterias residentes pueden ejercer una doble función, la estimulación de los mecanismos de defensa de la mucosa y el mantenimiento de la homeostasis de la respuesta inmune. La microbiota intestinal, con sus funciones metabólicas, tróficas y de protección, es capaz de afectar positivamente la integridad de la barrera intestinal (Gaggia *et al.*, 2010; Chambers & Gong, 2011).

### **1.3 CRECIMIENTO ALOMÉTRICO DEL TGI**

La alometría puede ser definida como el estudio de los cambios proporcionales asociados con la variación en el tamaño, ya sea del cuerpo o de una forma específica u órgano, y su relación con características morfológicas, fisiológicas y químicas de los seres vivos (Gayon, 2000). En un sentido más amplio, describe cómo las características de los seres vivos cambian con el tamaño (Shingleton, 2010). El peso de un órgano y sus funciones correspondientes están correlacionadas con el peso corporal, por tanto, se pueden establecer funciones con relación al peso corporal y al peso del órgano (Jaramillo, 2012).

### **1.4 INMUNOLOGIA AVIAR**

El sistema inmune comprende un conjunto de órganos y estructuras diversas en cuanto a naturaleza, origen, función, y localización. Su papel fundamental es intervenir en los procesos de defensa frente a agentes extraños (antígenos), memorizarlos para reconocerlos ante una segunda posible infección o invasión, y además mantener su integridad preservando sus propias estructuras. Comprende órganos linfoides especializados, que son el lugar donde se orquesta la respuesta inmunitaria, una red difusa de vasos linfáticos, y un conjunto de células linfoides y no linfoides que se movilizan constantemente por las estructuras corporales (Gómez, 2007; Tizard, 2009).

El sistema inmune de las aves es una entidad compleja, multifactorial. La función inmune se ve afectada por edad de las aves, composición de la dieta, nivel de alimentación, potencial genético, medio ambiente, estrés, entre otros (Korver, 2012).

La inmunidad innata es uno de los primeros mecanismos de defensa contra cualquier agente infeccioso. El reconocimiento por parte del hospedero de los agentes patógenos es un elemento clave para el proceso de la enfermedad. El cuerpo tiene barreras físicas de defensa, las cuales pueden prevenir muchas infecciones bacterianas, entre ellas están la piel y las mucosas, las cuales impiden que los agentes extraños accedan al animal (Chambers & Gong, 2011; Korver, 2012).

La inmunidad adquirida es una respuesta específica tras la exposición y reconocimiento de los activadores específicos de la función inmune (antígenos). La respuesta inmune adquirida tiene células B que producen anticuerpos contra el antígeno y células T citotóxicas que matan células infectadas por patógenos invasores específicos. La inmunidad adquirida posee memoria, lo que significa que la próxima vez que un antígeno vuelva a entrar en contacto con el hospedero, es posible que se dé una respuesta mucho más rápida (Korver, 2012). Mientras que el sistema inmune innato es eficaz para limitar las infecciones bacterianas, se necesita de respuestas inmunes adquiridas para combatir los patógenos bacterianos (Wigley, 2013)

El timo y la bolsa de Fabricio son los órganos linfoides centrales (Primarios); los órganos linfoides periféricos (Secundarios) incluyen: bazo, glándulas Harder, médula ósea, tejido linfoide asociado conjuntivo (CALT), tejido linfoide asociado a bronquios (BALT), y tejido linfoide asociado a intestino (GALT), en el cual las tonsilas cecales son las más prominentes. Los pollos no tienen ganglios linfáticos, pero tienen nódulos linfoides asociados con vasos linfáticos. La IgA, componente principal del sistema inmune de las mucosas, media inicialmente la defensa de la superficie de la mucosa intestinal contra patógenos entéricos (Cunningham & Klein, 2009).

#### **1.4.1 Bolsa de Fabricio (Bursa)**

Es el órgano linfoide primario (central) para el desarrollo de las células productoras de anticuerpos, durante la segunda y tercera semana después de la eclosión. También es un órgano linfoide secundario como parte del GALT, y tiene funciones endocrinas. Además de

los linfocitos B, se pueden encontrar macrófagos y células plasmáticas (Cunningham & Klein, 2009).

En este órgano los linfocitos B adquieren la capacidad para responder a uno u otro antígeno; el linfocito precursor tiene la información genética necesaria para producir anticuerpos contra todos los determinantes antigénicos posibles, pero para que esta potencialidad se haga efectiva, es necesario que los genes de las cadenas constantes de las inmunoglobulinas se ensamblen adyacentes a los genes de las cadenas variables (es la que lleva el fragmento que se une al antígeno y determina la especificidad) (Tizard, 2009).

#### **1.4.2 Timo**

Su función esencial es proporcionar un medio ambiente específico para que se dé la diferenciación de células T en ayudantes y citotóxicas que modulan la producción de anticuerpos; retrasa las reacciones de hipersensibilidad; actúa en las reacciones injerto contra huésped (capacidad de los linfocitos T maduros, transfundidos de un individuo sano a otro inmunosuprimido, para rechazar al nuevo huésped) y en la activación de macrófagos y respuestas citotóxicas (Makram *et al.*, 2010).

#### **1.4.3 Bazo**

Es el principal sitio de la actividad hematopoyética en el desarrollo embrionario, importante para el procesamiento del antígeno y la producción de anticuerpos después de la incubación (Makram *et al.*, 2010).

### **1.5 MECANISMOS DE DEFENSA DEL APARATO DIGESTIVO**

El intestino tiene una superficie extensa, por lo que el animal orienta gran parte de la inmunidad hacia este órgano. Allí están localizadas aproximadamente el 75% de todas las células de defensa del organismo en forma de tejido linfoide (Tizard, 2009). La estructura de la barrera intestinal incluye, desde el lumen hacia el lado de la sangre: la microbiota propia; mucosa, células epiteliales; y el compartimiento subepitelial con una variedad de células que incluyen las células inmunes. (Lodemann, 2010). El papel clave de la barrera intestinal, es evitar la propagación de bacterias y toxinas hacia los órganos y tejidos del animal. El aumento de la permeabilidad intestinal o daños en la mucosa, puede ocasionar

una translocación bacteriana, en la cual las bacterias del TGI pasan a los sitios extraintestinales (ganglios linfáticos mesentéricos, hígado, bazo, torrente sanguíneo) y podrían causar infección (Placha *et al.*, 2010).

La mucosa o epitelio intestinal representa una interfaz entre el medio interno y el externo. Tiene dos funciones vitales: la primera de transporte, como la absorción de nutrientes o la secreción de electrolitos y agua, y la segunda de barrera, protegiendo al hospedero contra la absorción de sustancias no deseadas, toxinas y microorganismos, o contra la pérdida de sustancias propias o de iones. Estas funciones pueden verse afectadas por diferentes factores como el estrés, lesiones o microorganismos patógenos, estos últimos actúan liberando toxinas o adhiriéndose a las células epiteliales y activando un gran número de vías de señalización, las cuales conducen a veces a graves cambios en las funciones fisiológicas como: cambio en la estructura y función de las uniones apretadas de la membrana intestinal, secreción de líquidos y electrolitos; y activación de la cascada inflamatoria (Lodemann, 2010). Los anticuerpos tipo IgA de la mucosa, representan una importante fracción de la barrera inmunológica del intestino, confiriendo protección al impedir la adherencia de bacterias o toxinas a las células del epitelio intestinal (Bengmark, 2013).

La estructura de la mucosa intestinal puede revelar cierta información sobre la salud del intestino. Los cambios en la morfología intestinal, tales como las vellosidades cortas y criptas más profundas han sido asociados con la presencia de toxinas, teniendo efectos negativos sobre la absorción de nutrientes a nivel intestinal. La demanda de energía y proteínas para el mantenimiento del TGI es alta comparada con otros órganos (Giannenas *et al.*, 2012).

## **1.6 GENERALIDADES DE LA MICROBIOTA INTESTINAL**

“Poblaciones bacterianas que colonizan una zona determinada del TGI de humanos o animales hospederos y que no comprometen la salud ni funcionamiento de éste” (Chambers & Gong, 2011).

La microbiota intestinal está compuesta por bacterias, protozoos, hongos, y virus (Chaucheyras & Durand, 2010; Tlaskalová *et al.*, 2011); vive en íntimo contacto con la pared intestinal circundante y las bacterias pueden ejercer efectos benéficos o

perjudiciales en el hospedero, dependiendo de si se clasifican como probióticos o como patógenos (Weis *et al.*, 2010).

El establecimiento de la población microbiana en el tracto digestivo de las aves se inicia inmediatamente después del nacimiento y cuando éstas comienzan a consumir alimento; además los diferentes microorganismos colonizadores son sensibles a cambios que puedan ocurrir en el TGI del hospedero, por lo que en éste deben existir factores adecuados de pH, temperatura, nutrientes y fluidos esenciales (Chambers & Gong, 2011).

La microbiota intestinal tiene un impacto específico actuando como “barrera” en el TGI: induce cambios anatómicos y fisiológicos en la estructura de la pared intestinal, participa en modificaciones inmunológicas en el intestino, y mejora la resistencia del hospedero a las bacterias enteropatógenas (Chaucheyras & Durand, 2010; Quigley, 2010; Huyghebaert *et al.*, 2011).

La microbiota intestinal controla la homeostasis a través de numerosos mecanismos (Quigley, 2010), en los que están involucradas sustancias como lipopolisacáridos, flagelinas, peptidoglicanos y péptidos formilados. También interactúa con los receptores de células intestinales, como los receptores tipo Toll y activa importantes vías de señalización intracelular con capacidad para modular procesos como la supervivencia celular, replicación, apoptosis, y respuesta inflamatoria. El sistema inmune del hospedero controla la carga microbiana a través de la liberación de moléculas como Defensinas, criptidinas, lectinas, angiogenina 4, especies reactivas de oxígeno, IgA y bacteriocinas, que limitan de manera efectiva la expansión de diversos microorganismos patógenos (Tlaskalová *et al.*, 2011; Bengmark, 2013).

En el TGI del hospedero, la microbiota comensal juega un papel significativo en la “resistencia a la colonización” de patógenos bacterianos. Esta resistencia está dada por la exclusión competitiva y la inmunomodulación. También estimula el desarrollo del TGI para mejorar funciones como: la digestión de nutrientes; enzimas digestivas; el desarrollo del tracto digestivo; proliferación de la mucosa intestinal; síntesis de vitaminas y utilización de productos de la fermentación endógena (Chambers & Gong, 2011).

## **1.7 SISTEMA INMUNE Y NUTRICIÓN**

La función del sistema inmune es regular el espectro completo de las interacciones con los microorganismos; no sólo excluyendo los patógenos y evitando infecciones, sino también limitando el costo energético de responder en contra de los microorganismos que pueden

ser tolerados y beneficiosos; esto significa que los mecanismos inmunológicos son complejos y dependen de una serie de componentes que se activan por diferentes tipos de señales y pueden ser regulados de forma independiente. Se sabe desde hace algún tiempo que la respuesta inmune se modula no solo por la genética del hospedero, sino también por medio de su nutrición (Ponton *et al.*, 2013).

Para una comprensión más completa de la interacción entre nutrición e inmunidad es importante comprender: en primer lugar, que la función inmune se ve afectada por la nutrición del hospedero, que puede afectar en gran medida el resultado de la infección. En segundo lugar, las interacciones basadas en la nutrición son una de las principales fuentes de microorganismos benéficos para el hospedero; y tercero, la digestión de nutrientes del hospedero se da principalmente en el intestino, el cual es el lugar donde habitan la mayor densidad de células microbianas, tanto benéficas como potencialmente perjudiciales, y por lo tanto es el sitio de mayor intensidad de las interacciones microbio-hospedero (Ponton *et al.*, 2013).

### **1.7.1 Inmunomoduladores**

La inmunomodulación nutricional se define como la “suplementación selectiva de nutrientes específicos en la dieta para alterar algún aspecto de la función inmune, para llevar a cabo un objetivo previsto”. (Korver, 2012)

Se considera que la respuesta inmune que genera el uso de los inmunomoduladores está dada por varios procesos fisiológicos que dan lugar a una elevada activación y reclutamiento de las células inmunitarias, particularmente las células fagocíticas; además, ayuda a acelerar el desarrollo y maduración del sistema inmune, incrementando la diversificación del repertorio de linfocitos y disminuyendo las consecuencias catabólicas de las infecciones que causan inmunosupresión. (Cortés & Villamarin, 2013).

## **1.8 ANTIBIÓTICOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO (APC)**

A finales de 1940 se comenzaron a utilizar dosis subterapéuticas de antibióticos, las cuales tenían un efecto positivo sobre la producción intensiva de animales, estas prácticas apoyaron la intensificación de la producción moderna de alimentos, facilitando el destete precoz, aumento de la densidad de animales, y fuentes de alimentación más económicas. (Laxminarayan *et al.*, 2013)

El mecanismo de acción más conocido para ser propuesto es que los APC tienen una acción antibacteriana que favorece el rendimiento de diferentes maneras: reducen la incidencia y gravedad de las infecciones subclínicas, reducen el uso de nutrientes por los microorganismos, mejoran la absorción de nutrientes debido a adelgazamiento de la pared intestinal, y reducen la cantidad de metabolitos depresores de crecimiento producidos por bacterias Gram-positivas (Huyghebaert *et al.*, 2011).

En la medicina moderna, los antibióticos son la base de la defensa contra las infecciones bacterianas. Pero ahora las bacterias se están defendiendo y desarrollando resistencia a los antibióticos a un ritmo alarmante. La resistencia a los antibióticos se ha convertido en un problema de salud pública. La principal preocupación es el aumento de la resistencia a los antibióticos y la posible propagación de genes de resistencia a bacterias patógenas (Sharma *et al.*, 2014).

La preocupación mundial sobre el desarrollo de la resistencia a los antibióticos y la transferencia de genes de resistencia de los animales a la microbiota comensal, llevó a la prohibición del uso de APC en la Unión Europea desde el 1 de enero 2006 (Gaggia *et al.*, 2010; Huyghebaert *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2014).

Existe la necesidad de buscar alternativas viables que puedan mejorar los mecanismos de defensa naturales de los animales y reducir el uso masivo de APC. Una forma es utilizar aditivos para alimentos específicos o materias primas que tengan una influencia positiva sobre el rendimiento y bienestar de los animales, en particular a través de la modulación de la microbiota intestinal, la cual desempeña un papel crítico en el mantenimiento de la salud del hospedero (Sharma *et al.*, 2014).

Los probióticos aparecen como una posible estrategia para controlar los patógenos y por tanto mantener una microbiota intestinal saludable (Tellez *et al.*, 2012). Una variedad de cepas probióticas bien caracterizadas han sido seleccionados para evaluar la modulación de la microbiota intestinal en aves y la protección contra una variedad de patógenos (Gaggia *et al.*, 2010).

### **1.8.1 Exclusión Competitiva (EC)**

"Es el fenómeno asociado a las tendencias de los primeros organismos a establecerse como una flora para impedir el establecimiento de nuevos microorganismos" (Chambers & Gong, 2011).

La utilización de probióticos en aves está estrictamente relacionada con el concepto de EC, proceso por el cual se le impide a un microorganismo la colonización de un entorno determinado por la presencia previa de otros microorganismos que están establecidos en mejores condiciones y son capaces de mantenerse en ese ambiente (Doyle & Erickson, 2012; Tellez *et al.*, 2012).

## 1.9 PROBIÓTICOS

Durante milenios, los seres humanos han utilizado microorganismos en la elaboración de alimentos, como la fermentación de la leche, carne, verduras y la producción de bebidas alcohólicas. Sin embargo, la comprensión de cómo los probióticos ejercen sus efectos benéficos es tema de debate en la actualidad (Musa *et al.*, 2009; Butel, 2014).

El término **probiótico** proviene del **griego** (pro, “para,” y bios, “vida”), y fue definido por Fuller (1989) como un suplemento alimenticio de origen microbiano que afecta beneficiosamente al hospedero mejorando su equilibrio intestinal (Musa *et al.*, 2009; Huyghebaert *et al.*, 2011; Castillo *et al.*, 2012; Tellez *et al.*, 2012; Al-Sheraji *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2014). Recientemente, la OMS ha revisado su definición y los considera como “organismos vivos que administrados en cantidades adecuadas ejercen un efecto benéfico sobre la salud del hospedero” (Franz *et al.*, 2011).

*Lactobacillus* o *Bifidobacterium* spp. son los microorganismos más utilizados por sus efectos benéficos (Singh *et al.*, 2011); sin embargo, hay que señalar que la distinción entre microorganismos "buenos" y "malos" es relativa, y depende en gran medida de en qué parte del tracto digestivo se encuentra y para que se utilizan (Wichers, 2009; de Lange *et al.*, 2010).

El modo de acción de los probióticos es que producen metabolitos específicos e intermedios que estimulan el sistema inmunológico del hospedero (Oso *et al.*, 2013). Se han propuesto mecanismos de inhibición de patógenos por la microbiota intestinal los cuales incluyen la competencia por los nutrientes, la producción de compuestos tóxicos (ácidos grasos volátiles, bajo pH y bacteriocinas), la competencia por sitios de unión en el epitelio intestinal y la estimulación del sistema inmune. Estos mecanismos no son mutuamente excluyentes, y algunos microorganismos pueden efectuar el cambio con un único mecanismo, mientras que otros pueden utilizar varios mecanismos (Lutful, 2009).

La supervivencia de organismos probióticos en el intestino depende de los factores de colonización que poseen, los cuales les permiten resistir los mecanismos antibacterianos (químicos y físicos) que operan en el intestino (Huyghebaert *et al.*, 2011).

Las cepas probióticas se han caracterizado por ser habitantes normales de la especie objetivo y por tener la capacidad de adherirse y colonizar las células epiteliales del intestino; sobrevivir y crecer en las unidades ecológicas respectivas (Huyghebaert *et al.*, 2011), ser genéticamente estables; producir sustancias antimicrobianas y antagónicas de bacterias patógenas; competir con la microflora nativa; y resistir a la bilis y ácidos (Lutful, 2009)

Los criterios de selección de bacterias que se utilizarán como "probiótico" deben incluir: ejercer un efecto benéfico en el hospedero; soportar en un producto alimenticio altos recuentos de células y permanecer viable durante todo el período de validez del producto; sobrevivir durante el paso a través del TGI; adherirse al epitelio intestinal; producir sustancias antimicrobianas que tengan actividad antagonista contra las bacterias patógenas; estabilizar la microbiota intestinal y proporcionar varios beneficios para la salud; ser estable frente a la bilis, ácido, enzimas y oxígeno; ser no patógenas, no tóxicas, no alergénicas, no mutagénicas; y no deben portar genes de resistencia a antibióticos (Sharma *et al.*, 2014).

### **1.9.1 Bacterias Ácido Lácticas (BAL)**

Una variedad de especies microbianas han sido utilizadas como probióticos, incluyendo especies de *Bacillus* spp, *Bifidobacterium* spp, *Enterococcus* spp, *E. coli*, *Lactobacillus* spp, *Lactococcus* spp, *Streptococcus* spp, una variedad de especies de levaduras, y cultivos mixtos no definidos. *Lactobacillus* spp y *Bifidobacterium* spp son las especies que se han utilizado más ampliamente en los seres humanos, mientras que las especies como *Bacillus* spp, *Enterococcus* spp, y la levadura *Saccharomyces* han sido los organismos más comunes que se utilizan en la alimentación animal (Gaggia *et al.*, 2010; Tellez *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2014).

Las BAL son conocidos por producir péptidos antibacterianos y pequeñas proteínas llamadas bacteriocinas, que les permitan competir contra otras bacterias en el medio ambiente (Messaoudi *et al.*, 2013).

### **1.9.2 *Lactobacillus***

El género *Lactobacillus* es una unidad taxonómica amplia y heterogénea, que comprende más de 100 especies diferentes, pertenece al grupo de BAL. Muchas de las especies son componentes de la microbiota intestinal normal de los seres humanos y los animales (Mohamed *et al.*, 2009; Gaggia *et al.*, 2010; Castillo *et al.*, 2012; Tellez *et al.*, 2012; Messaoudi *et al.*, 2013).

### **1.9.3 *Enterococcus***

Hasta la década de 1980 fueron descritos como *Streptococcus*, fueron reclasificados en los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Enterococcus*. *E. faecium* y *E. faecalis* son todavía las especies de *Enterococcus* más importantes. Son cocos Gram-positivos, se presentan en parejas o en cadenas, son microorganismos anaerobios facultativos, esto es, prefieren usar oxígeno, aunque sobreviven bien en su ausencia (Franz *et al.*, 2011).

### **1.9.4 Mecanismo de acción de los probióticos**

El modo de acción de los probióticos en las aves incluye: el mantenimiento de la microbiota intestinal normal por exclusión competitiva y antagonismo; la alteración del metabolismo mediante el aumento de la actividad de enzimas digestivas, la disminución de la actividad de las enzimas bacterianas y la producción de amoníaco; la mejora en el consumo de alimento y la digestión; y la estimulación del sistema inmune; mecanismos no inmunológicos, como la estabilización de la barrera de la mucosa intestinal, el aumento de la secreción de moco, la mejora de la motilidad intestinal (Quigley, 2010; Giannenas *et al.*, 2012;).

Los probióticos también ejercen su efecto como adyuvantes inmunes modulando la respuesta inmune en la mucosa; pueden modular la respuesta inflamatoria, estimular la producción de algunas citoquinas y la actividad fagocítica de los macrófagos y neutrófilos; regular la actividad de las células NK, y mejorar las respuestas de anticuerpos específicos, especialmente la mucosa secretora de IgA (Castillo *et al.*, 2012; Feleszko & Jaworska, 2013).

### 1.9.5 Mejora de la respuesta Inmune

La ingesta de probióticos ha sido asociada con efectos benéficos sobre el sistema inmune, tales como la resistencia a la enfermedad y la reducción del riesgo de alergias. Los probióticos en el organismo de un animal sano pueden estimular la respuesta inmune no específica y mejorar la protección inmune. Las propiedades de los probióticos pueden influenciar el transporte en el epitelio del intestino delgado y aumentar la absorción de la glucosa, interpretándose como un efecto positivo para el animal. Los probióticos que mejoran los niveles de inmunoglobulinas tienen un efecto más positivo sobre el crecimiento, la producción y la capacidad de resistencia a las enfermedades (Musa *et al.*, 2009).

El efecto antiinflamatorio de ciertas bacterias probióticas podría estar también relacionado con la protección de estos microorganismos contra los patógenos. El uso de cepas probióticas en la alimentación de aves mostró un aumento significativo de IgA e IgG en el intestino. El aumento de los niveles de IgA locales resultantes de la ingestión de la fórmula probiótica puede contribuir a la mejora de la resistencia de la mucosa contra las infecciones gastrointestinales (Castillo *et al.*, 2012; Butel, 2014).

La IgA es un elemento primario de la respuesta inmune de la mucosa intestinal para defenderse contra agentes patógenos; es producida y diferenciada por las células plasmáticas de la mucosa intestinal. Se ha demostrado en diferentes estudios que las concentraciones de IgA e IgG mejoraron después de la administración de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* (Rajput *et al.*, 2013).

### 1.9.6 Acción sobre la mucosa intestinal

La permeabilidad intestinal puede ser alterada por toxinas producidas por agentes patógenos los cuales pueden inducir inflamación en el epitelio intestinal. Se ha demostrado que los probióticos inducen factores que son capaces de reforzar la integridad de la barrera intestinal y proteger contra las bacterias patógenas, induciendo la producción de moco o de defensinas (Butel, 2014).

El TGI de las aves posee una barrera intestinal que separa el medio interno del entorno luminal. La protección local de las superficies mucosas es mediada por los productos de secreción del epitelio, como moco, péptidos antimicrobianos (defensinas) y anticuerpos de secreción, principalmente IgA. El moco está compuesto por glicoproteínas que se sintetizan y secretan por las células caliciformes en respuesta a un estímulo fisiológico

(microbiota normal) o estímulos patológicos (patógenos entéricos). El moco protege el epitelio del contacto directo con los contenidos lumbinales, actuando como una barrera para evitar la invasión por organismos patógenos (Castillo *et al.*, 2012).

### **1.9.7 Producción de sustancias antimicrobianas**

Los probióticos trabajan de una manera extracelular para producir moléculas bioactivas eficaces, que estimulan el sistema inmunológico. Las bacterias probióticas liberan estas biomoléculas eficaces, llamados exopolisacáridos (EPS), a sus alrededores. Los microorganismos probióticos mejor estudiados son las BAL, que son también conocidas por producir sustancias antimicrobianas llamadas bacteriocinas. Las bacteriocinas producidas por enterococos se conocen como enterocinas, de los cuales los estudiados en más detalle son los producidos por el *E. faecium*. La Enterocina M, producido por la cepa *E. faecium* AL41, es una nueva bacteriocina con un amplio espectro de actividad inhibidora contra microorganismos (Placha *et al.*, 2010).

Varias cepas de probióticos son capaces de producir una amplia variedad de sustancias antimicrobianas, las más comunes son los ácidos orgánicos (ácido láctico y ácido acético) que inducen una reducción en el pH fecal, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, y compuestos antibacterianos (Castillo *et al.*, 2012; Butel, 2014).

### **1.9.8 Adherencia a las células intestinales**

El primer paso en la patogénesis es la adhesión a las células epiteliales del intestino; una de las principales propiedades de los probióticos es la capacidad que tienen para adherirse a la mucosa intestinal, la cual tiene gran influencia en la defensa del organismo, ya que las bacterias benéficas conforman una barrera de exclusión a los microorganismos patógenos, fundamentalmente, por la ocupación de los sitios de adhesión y la estimulación del sistema inmune (Castillo *et al.*, 2012).

## **1.10 REFERENCIAS**

Agostini, P. S., Solà-Oriol, D., Nofrarías, M., Barroeta, a. C., Gasa, J., & Manzanilla, E. G. (2012). Role of in-feed clove supplementation on growth performance, intestinal microbiology, and morphology in broiler chicken. *Livestock Science*, 147(1-3), 113–118. doi:10.1016/j.livsci.2012.04.010

Al-Sheraji, S. H., Ismail, A., Manap, M. Y., Mustafa, S., Yusof, R. M., & Hassan, F. A. (2013). Prebiotics as functional foods: A review. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1542–1553. doi:10.1016/j.jff.2013.08.009

Bengmark, S. (2013). Gut microbiota, immune development and function. *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 69(1), 87–113. doi:10.1016/j.phrs.2012.09.002

Butel, M. . (2014). Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 44(1), 1–8. doi:10.1016/j.medmal.2013.10.002

Castillo, N. a., de Moreno de LeBlanc, A., Galdeano, C. M., & Perdigón, G. (2012). Probiotics: An alternative strategy for combating salmonellosis. *Food Research International*, 45(2), 831–841. doi:10.1016/j.foodres.2011.04.031

Chambers, J. R., & Gong, J. (2011). The intestinal microbiota and its modulation for Salmonella control in chickens. *Food Research International*, 44(10), 3149–3159. doi:10.1016/j.foodres.2011.08.017

Chaucheyras, F., & Durand, H. (2010). Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial Microbes*, 1(1), 3–9. doi:10.3920/BM2008.1002

Cortés, L., & Villamarín, S. (2013). Características morfométricas de órganos linfoides y estudios serológicos en levante de ponedoras utilizando un inmunomodulador , vitaminas y aminoácidos. *Spei Domus*, 9(18), 29–36.

Cunningham, J., & Klein, B. (2009). *Fisiología Veterinaria* (cuarta., p. 718). Barcelona, España: ELSEVIER.

De Lange, C. F. M., Pluske, J., Gong, J., & Nyachoti, C. M. (2010). Strategic use of feed ingredients and feed additives to stimulate gut health and development in young pigs. *Livestock Science*, 134(1-3), 124–134. doi:10.1016/j.livsci.2010.06.117

Doyle, M. P., & Erickson, M. C. (2012). Opportunities for mitigating pathogen contamination during on-farm food production. *International Journal of Food Microbiology*, 152(3), 54–74. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.037

Feleszko, W., & Jaworska, J. (2013). Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases. *Bioactive Food as Interventions for Arthritis and*

Related Inflammatory Diseases (pp. 357–370). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-397156-2.00025-9

FINAGRO. (2013). Avicultura (pp. 1–19).

Franz, C. M. a P., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., & Gálvez, A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 151(2), 125–40. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.014

Gaggìa, F., Mattarelli, P., & Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, 141 Suppl , S15–28. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031

Gayon, J. (2000). History of the Concept of Allometry. *Amer. Zool.*, 40, 748–758.

Giannenas, I., Papadopoulou, E., Tsaliè, E., Triantafillou, E., Henikl, S., Teichmann, K., & Tontis, D. (2012). Assessment of dietary supplementation with probiotics on performance, intestinal morphology and microflora of chickens infected with *Eimeria tenella*. *Veterinary Parasitology*, 188(1-2), 31–40. doi:10.1016/j.vetpar.2012.02.017

Gómez, L. (2007). *Manual de inmunología veterinaria* (Primera Ed., p. 728). Madrid, España: Pearson Education.

Huyghebaert, G., Ducatelle, R., & Van Immerseel, F. (2011). An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *The Veterinary Journal*, 187(2), 182–8. doi:10.1016/j.tvjl.2010.03.003

Immerseel, F. V, Eeckhaut, V., Teirlynck, E., Pasmans, F., & Haesebrouck, F. (2006). Mechanisms of action of nutritional tools to control intestinal zoonotic pathogens. 16th European Symposium on Poultry Nutrition, 243–250.

Ingrao, F., Rauw, F., Lambrecht, B., & van den Berg, T. (2013). Infectious Bursal Disease: a complex host-pathogen interaction. *Developmental and Comparative Immunology*, 41(3), 429–38. doi:10.1016/j.dci.2013.03.017

Jaramillo, A. (2012). Evaluación de la mezcla de un ácido orgánico y un prebiótico en los parámetros productivos y alométricos de pollos de engorde con alimentación controlada. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 5(1), 52–66.

Korver, D. R. (2012). Implications of changing immune function through nutrition in poultry. *Animal Feed Science and Technology*, 173(1-2), 54–64. doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.12.019

Král, M., Angelovičová, M., & Mrázová, L. (2012). Application of Probiotics in Poultry Production. *Animal Science and Biotechnologies*, 45(1), 55–58.

Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A. K. M., Wertheim, H. F. L., Sumpradit, N., ... Cars, O. (2013). Antibiotic resistance-the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(12), 1057–98. doi:10.1016/S1473-3099(13)70318-9

Lodemann, U. (2010). Effects of Probiotics on Intestinal Transport and Epithelial Barrier Function. In *Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics* (First edit., pp. 303–333). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-374938-3.00021-9

Lutful, S. M. (2009). The role of probiotics in the poultry industry. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(8), 3531–46. doi:10.3390/ijms10083531

Makram, A., Galal, A., Fathi, M. M., & El-Attar, A. H. (2010). Carcass Characteristics and immunocompetence Parameters of Four Commercial Broiler Strain Chickens under Summer Season of Egypt. *International Journal of Poultry Science*, 9(2), 171–176. doi:10.3923/ijps.2010.171.176

Messaoudi, S., Manai, M., Kergourlay, G., Prévost, H., Connil, N., Chobert, J.-M., & Dousset, X. (2013). *Lactobacillus salivarius*: bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiology*, 36(2), 296–304. doi:10.1016/j.fm.2013.05.010

Mohamed Mahroop Raja, M., Raja, A., & Mohamed Imran, M. (2009). *Lactobacillus* as a Probiotic Feed for Chickens. *International Journal of Poultry Science*, 8(8), 763–767.

Musa, H. H., Wu, S. L., Zhu, C. H., Seri, H. I., & Zhu, G. Q. (2009). The Potential Benefits of Probiotics in Animal Production and Health. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8(2), 313–321.

Ohimain, E., & Ofongo, R. (2012). The Effect of Probiotic and Prebiotic Feed Supplementation on Chicken Health and Gut Microflora: A Review. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 4(2), 135–143.

Oso, a. O., Idowu, O. M. O., Hastrup, a. S., Ajibade, a. J., Olowonefa, K. O., Aluko, a. O., ... Bamgbose, a. M. (2013). Growth performance, apparent nutrient digestibility, caecal

fermentation, ileal morphology and caecal microflora of growing rabbits fed diets containing probiotics and prebiotics. *Livestock Science*, 157(1), 184–190. doi:10.1016/j.livsci.2013.06.017

Pastored, P., Griebel, P., Bazin, H., & Govaerts, A. (1998). *Manual de Inmunología Veterinaria* (p. 664). Estados Unidos: La prensa Académica.

Patel, P. J., Singh, S. K., Panaich, S., & Cardozo, L. (2014). The aging gut and the role of prebiotics, probiotics, and synbiotics: A review. *Journal of Clinical Gerontology and Geriatrics*, 5(1), 3–6. doi:10.1016/j.jcgg.2013.08.003

Placha, I., Simonova, M. P., Cobanova, K., Laukova, a, & Faix, S. (2010). Effect of *Enterococcus faecium* AL41 and *Thymus vulgaris* essential oil on small intestine integrity and antioxidative status of laying hens. *Research in Veterinary Science*, 89(2), 257–61. doi:10.1016/j.rvsc.2010.03.006

Ponton, F., Wilson, K., Holmes, A. J., Cotter, S. C., Raubenheimer, D., & Simpson, S. J. (2013). Integrating nutrition and immunology: a new frontier. *Journal of Insect Physiology*, 59(2), 130–7. doi:10.1016/j.jinsphys.2012.10.011

Quigley, E. M. M. (2010). Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacological Research*, 61(3), 213–8. doi:10.1016/j.phrs.2010.01.004

Rajput, I. R., Li, L. Y., Xin, X., Wu, B. B., Juan, Z. L., Cui, Z. W., ... Li, W. F. (2013). Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on intestinal ultrastructure modulation and mucosal immunity development mechanism in broiler chickens. *Poultry Science*, 92, 956–965. doi:dx.doi.org/ 10.3382/ps.2012-02845

Ravindran, V. (2013). Disponibilidad de piensos y nutrición de aves de corral en países en desarrollo. In *Revisión del desarrollo avícola* (Primera Ed., pp. 62–66).

SAC. (2013). Balance y perspectivas del sector agropecuario 2013 - 2013.

Sharma, P., Tomar, S. K., Goswami, P., Sangwan, V., & Singh, R. (2014). Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food Research International*, 57, 176–195. doi:10.1016/j.foodres.2014.01.025

Shingleton, A. (2010). Allometry : The Study of Biological Scaling. *Nature Education Knowledge*, 3(10), 1–5.

Singh, K., Kallali, B., Kumar, A., & Thaker, V. (2011). Probiotics: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(2), S287–S290. doi:10.1016/S2221-1691(11)60174-3

Stewart, C. R., Keyburn, A. L., Deffrasnes, C., & Tompkins, S. M. (2013). Potential directions for chicken immunology research. *Developmental and Comparative Immunology*, 41(3), 463–8. doi:10.1016/j.dci.2013.05.011

Tellez, G., Pixley, C., Wolfenden, R. E., Layton, S. L., & Hargis, B. M. (2012). Probiotics/direct fed microbials for Salmonella control in poultry. *Food Research International*, 45(2), 628–633. doi:10.1016/j.foodres.2011.03.047

Tizard, I. (2009). *Introducción a la Inmunología Veterinaria* (Octava Edi., p. 574). Barcelona, España: ELSEVIER.

Taskalová, H., Stěpánková, R., Kozáková, H., Hudcovic, T., Vannucci, L., Tučková, L., ... Funda, D. P. (2011). The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cellular & Molecular Immunology*, 8(2), 110–20. doi:10.1038/cmi.2010.67

Torok, V. a, Allison, G. E., Percy, N. J., Ophel-Keller, K., & Hughes, R. J. (2011). Influence of antimicrobial feed additives on broiler commensal posthatch gut microbiota development and performance. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(10), 3380–90. doi:10.1128/AEM.02300-10

Weis, J., Pál, G., Hrnčár, C., & Baraňska, B. (2010). The Comparison of Performance of Three Hybrid Combinations of Broiler Chicks at Different Dose of Probiotic. *Animal Science and Biotechnologies*, 43(2), 296–300.

Wichers, H. (2009). Immunomodulation by food: promising concept for mitigating allergic disease? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(1), 37–45. doi:10.1007/s00216-009-2838-1

Wigley, P. (2013). Immunity to bacterial infection in the chicken. *Developmental and Comparative Immunology*, 41(3), 413–7. doi:10.1016/j.dci.2013.04.008

## 2. Evaluación de cepas probióticas (*L. acidophilus*, *L. casei* y *E. faecium*) sobre los parámetros productivos en pollos de engorde

### 2.1 RESUMEN

Se ha demostrado que la utilización de probióticos en la alimentación de pollos de engorde mejora la conversión de alimento, la ganancia de peso vivo y el desarrollo inmunológico. El objetivo de este trabajo fue evaluar si la adición de diferentes cepas probióticas en agua favorece los parámetros productivos de pollos de engorde durante toda su etapa productiva. Se utilizaron 200 pollos machos (Cobb) de un día de edad obtenidos de una casa comercial. Se evaluaron los parámetros zootécnicos: consumo de alimento, peso corporal, mortalidad, ganancia de peso (GDP), conversión alimenticia (CA), eficiencia alimenticia (EA), índice productivo (IP), factor de eficiencia americana (FEA) y eficiencia europea (EE); a los días: 7, 14, 21, 28, 35 y 42. Las aves fueron alimentadas con dos dietas: dieta basal con y sin la adición de antibiótico. Los diferentes probióticos (*L. casei*, *L. acidophilus* ó *E. faecium*) se suministraron en el agua de bebida de los animales que consumieron la dieta basal sin antibiótico garantizando una concentración de  $10^7$  UFC/mL. El diseño estadístico utilizado fue de bloques al azar en arreglo de parcelas divididas. La inclusión de probióticos, específicamente de *E. faecium*, mejoró parámetros productivos ( $P < 0.05$ ) como: peso (2730 g), conversión (1.55), GDP (53,59 g/día), FEA (172), IP (393), EE (400) y EA (63,11%). Por todo lo anterior, la utilización de probióticos, especialmente *E. faecium*, pueden ser un reemplazo eficaz, seguro y rentable de los antibióticos durante todo el ciclo de producción del ave.

**Palabras Claves:** aditivos, aves de corral, broiler, bacterias ácido lácticas, promotores de crecimiento.

### 2.2 INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el sector avícola ha crecido drásticamente para lograr satisfacer la alta demanda que existe por este tipo de proteína. Sin embargo, para mantener un sistema de producción en constante crecimiento, los animales deben presentar un buen estado de salud, y a su vez, una rápida activación y respuesta por parte del sistema inmune (Cortés & Villamarin, 2013).

En la producción avícola, las enfermedades entéricas juegan un papel importante debido a que están relacionadas con pérdidas en la productividad, aumento en la mortalidad, y contaminación asociada a los productos finales de consumo humano (Ingrao *et al.*, 2013). En la actualidad la industria de la nutrición animal se enfrenta a un futuro sin antibióticos promotores de crecimiento (APC), el aditivo más eficaz con el que se contaba para controlar diferentes tipos de infecciones entéricas. La prohibición en la Unión Europea, y el retiro voluntario gradual de los APC en alimentos a nivel mundial, ha supuesto una presión adicional a favor de mejorar la salud intestinal y el bienestar de los animales (Gaggìa *et al.*, 2010).

Actualmente, hay un aumento sustancial de las líneas de investigación dirigidas a evaluar productos alternativos para mantener la flora intestinal benéfica y la salud intestinal, donde se incluyen diversas clases de productos como enzimas, probióticos, prebióticos, fitogénicos y ácidos orgánicos (Placha *et al.*, 2010; Agostini *et al.*, 2012; Oso *et al.*, 2013;). No obstante, durante los últimos años, se ha demostrado que la utilización de probióticos mejora la conversión de alimento, la ganancia de peso vivo y el desarrollo inmunológico del ave. Sin embargo, para ser aceptados por la industria, los efectos de éstos productos deben ser comprobados por una mejora en los rendimientos productivos de los animales similar a la alcanzada con los APC (Ravindran, 2013).

En la literatura se ha reportado que los probióticos pueden influir sobre el mantenimiento de la microbiota intestinal normal; la alteración del metabolismo mediante el aumento de la actividad de enzimas digestivas, la disminución de la actividad de las enzimas bacterianas y la producción de amoníaco; la mejora en el consumo de alimento y la digestión; la neutralización de enterotoxinas y la estimulación del sistema inmune; también poseen mecanismos no inmunológicos, como la estabilización de la barrera de la mucosa intestinal, el aumento de la secreción de moco, la mejora de la motilidad intestinal. Todo lo anterior, se ve reflejado sobre la salud y los parámetros productivos de los animales (Giang *et al.*, 2010; Tsirtsikos *et al.*, 2012).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar si la adición de diferentes cepas probióticas en agua favorece los parámetros productivos de pollos de engorde durante toda su etapa productiva.

## **2.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.3.1 Localización**

El trabajo de campo se realizó en la granja avícola comercial, Los Andes, dedicada a la producción de pollos de engorde, ubicada en el municipio de Girardota, vereda “El Totumo”, localizado a 1425 msnm, con una temperatura promedio de 22°C, correspondiendo a una zona de vida bosque húmedo premontano (bh-PM).

### **2.3.2 Animales**

Se utilizaron 200 pollos machos de un día de edad de la línea comercial Cobb obtenidos de una casa comercial, con un peso promedio inicial de 45,65 gramos. El período experimental tuvo una duración de 42 días. La cría se realizó siguiendo los procedimientos comerciales establecidos en la granja.

### **2.3.3 Instalaciones y Equipos**

Los pollos fueron alojados dentro de un galpón comercial con piso de cemento y con cama de viruta de madera, en el cual se realizaron las divisiones para los tratamientos utilizando cartón plast. Cada división tuvo una medida de 1.0 x 1.2 metros, además de comedero y bebedero independiente. Durante la primera y segunda semana se utilizaron comederos de bandeja, posteriormente se cambió a comedero de tolva. Durante todo el experimento se utilizaron bebederos de volteo de 3 Lt de capacidad, y el agua se suministraba dos veces al día. Para mantener la temperatura homogénea durante las primeras semanas se utilizaron criadoras a gas, y posteriormente cortinas alrededor del galpón para controlar la temperatura, humedad y entrada-salida de corrientes de aire. Para realizar el pesaje de los pollos y el alimento suministrado se utilizó una balanza digital.

### **2.3.4 Manejo Sanitario**

Para el recibimiento de los pollos, se realizó lavado, limpieza y desinfección del galpón, cortinas, comederos y bebederos; además, se hizo el control de roedores e insectos con productos obtenidos en casas comerciales. Las criadoras se encendieron cinco horas antes de la llegada de los animales.

### **2.3.5 Dietas**

Los animales se alimentaron con una dieta formulada de acuerdo con los requerimientos nutricionales establecidos por Rostagno (2011).

D1: Alimento comercial sin probiótico y sin antibiótico

D2: Alimento comercial + antibiótico (como APC)

D3: Alimento comercial sin antibiótico + *L. acidophilus*

D4: Alimento comercial sin antibiótico + *L. casei*

D5: Alimento comercial sin antibiótico + *E. faecium*.

Se elaboraron 2 dietas (Tabla 1), una para la etapa de iniciación (día 1 al 21), y la otra para la etapa de finalización (día 22 al 42).

Los probióticos fueron suministrados en el agua de bebida, la cantidad de probiótico adicionado (relación v/p) fue proporcional a 1 gr de probiótico por cada 20 Lt de agua, siguiendo las instrucciones para su preparación y adición según lo recomendado por el fabricante. La concentración de probióticos viables que se considera que debe llegar al intestino para producir un efecto beneficioso es de  $\geq 10^6$  UFC/mL, por tal motivo se utilizó en promedio  $10^7$  UFC/mL (Sharma *et al.*, 2014). No fue de interés modificar la dieta, sino la incorporación eficiente de los probióticos como una alternativa al uso de APC.

### 2.3.6 Parámetros Zootécnicos

Entre los parámetros zootécnicos se evaluaron: consumo de alimento, peso corporal, mortalidad, ganancia de peso (GDP), conversión alimenticia (CA), eficiencia alimenticia (EA), índice productivo (IP), factor de eficiencia americana (FEA) y eficiencia europea (EE). Estos parámetros se evaluaron los días: 7, 14, 21, 28, 35 y 42.

**2.3.6.1 Índice de Conversión Alimenticia (I.C.A):** permite cuantificar cuántos kilogramos de alimento necesita un ave para producir un kilogramo de carne. Cuanto más bajo sea el índice de conversión más eficiente ha sido criado el animal (Manzano *et al.*, 2010).

$$I. C. A = \frac{\text{Consumo}}{\text{Peso Vivo}}$$

**2.3.6.2 Ganancia Diaria de Peso (GDP):** se refiere a cuanto ha ganado un pollo en peso corporal al día. (Manzano *et al.*, 2010; Rosero *et al.*, 2012)

$$GDP = \frac{\text{Peso promedio por ave} - \text{peso promedio inicial}}{\text{días}}$$

**2.3.6.3 Mortalidad:** Porcentaje de pollos muertos en un período determinado.

$$\%M = \frac{\text{Número de pollos muertos}}{\text{Número de pollos iniciales}} \times 100$$

Tabla 1: Composición de la dieta basal				
Materia Prima	Dieta Basal Iniciación	Dieta Basal + Antibiótico Iniciación	Dieta Basal Finalización	Dieta Basal + Antibiótico Finalización
	%	%	%	%
Maiz	65,22	65,11	69,29	69,23
Torta de soya	28,22	28,22	14,19	14,19
Soya Frijol cocido	2,6	2,6	13	13
Carbonato de Calcio fino	1,37	1,37	1,23	1,23
Fosfato monocalcico	0,99	0,99	0,8	0,8
Aceite de Palma	0,5	0,5	0,5	0,5
Sal fina	0,33	0,33	0,33	0,33
DL-Metionina	0,18	0,18	0,14	0,14
L-Lisina HCL	0,15	0,15	0,11	0,11
GFC Broiler Premix 1.2 P	0,12	0,12	0,12	0,12
Bicarbonato de sodio	0,1	0,1	0,08	0,08
Atrapante de Micotoxinas(Mycofix Secure)	0,09	0,09	0	0
Cloruro de Colina 60 %	0,07	0,07	0,05	0,05
Zinc Bacitracina 15%	0	0,05	0	0
Maduramicina 0.75% & Nicarbazina 8%	0	0,05	0	0
Sulfato de Cobre 25%	0,04	0,04	0,04	0,04
Tryptophan	0,02	0,02	0,01	0,01
Neomicina 50%	0	0,02	0	0
L-Treonina	0,01	0,01	0,12	0,12
Salinomicina 12 %	0	0	0	0,05
Enramicina 8%	0	0	0	0,01
Colistina 50%	0	0	0	0,01
Análisis Proximal de las Dietas				
EM (Kcal/Kg)	2984	2984	3152	3152
PC (%)	19,16	19,16	17	17
EE (%)	4,047	4,047	6,023	6,023
FC (%)	2,742	2,742	2,748	2,748
HUMEDAD (%)	10,52	10,52	10,79	10,79

EM: Energía Metabolizable (Kcal/Kg); PC: Proteína Cruda (%); EE: Extracto Etéreo (%); FC: Fibra Cruda (%)

**2.3.6.4 Factor de Eficiencia Americana (FEA):** es el resultado de la interacción que existe entre el potencial genético del pollo, la alimentación que recibe y el manejo al que se somete durante su vida útil (Freire & Berrones, 2008)

$$FEA = \frac{\text{Peso promedio por ave}}{I. C. A}$$

**2.3.6.5 Índice de productividad (IP)**

$$IP = \frac{GDP \times \text{Viabilidad}}{I. C. A \times 10}$$

**2.3.6.6 Eficiencia Europea (EE):** Se utiliza para comparar los diferentes lotes dentro de una integración o país, no puede usarse para comparar rendimiento entre países. El número mínimo esperado para definir si un lote tiene buen comportamiento es de 200, por lo que cualquier resultado por debajo de 200 se estima que no fue un buen lote en cuanto a rendimiento (Awad *et al*, 2009).

$$EE = \frac{\text{Viabilidad} \times \text{Peso Vivo}}{\text{Edad (días)} \times I. C. A} \times 100$$

**2.3.6.7 Eficiencia alimentaria (EA):** Es la cantidad de kilogramos de carne que se producen con una tonelada de alimento (Rebollar, 2002).

$$EA = \frac{1000}{I. C. A}$$

### **2.3.7 Diseño estadístico**

El experimento se realizó según un diseño bloques al azar en un arreglo de parcelas divididas, donde los animales fueron aleatorizados a cada uno de los tratamientos (5 dietas por 6 períodos de evaluación), y cada tratamiento tuvo un total de 2 repeticiones. El análisis estadístico fue desarrollado usando el procedimiento GLM del SAS (2007).

### **2.3.8 Consideraciones éticas**

Esta investigación fue avalada por El Comité de Ética en la Experimentación Animal de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín (CEMED 045 del 10 de junio de 2014).

## 2.4 RESULTADOS

En general las aves que consumieron las diferentes dietas presentaron un buen estado de salud, y sin signo alguno de enfermedad que causara su retiro y/o sacrificio inmediato. Además, al nivel en que se fijó el suministro diario de alimento no hubo sobrantes.

Tabla 2: Parámetros zootécnicos e indicadores productivos de pollos que consumieron dietas con cepas probióticas ( <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> y <i>E. faecium</i> ) durante 42 días.						
Variable	Dietas					EEM
	D1	D2	D3	D4	D5	
<b>Parámetros zootécnicos</b>						
<b>Consumo (gr/animal)</b>	4415,34 <sup>A</sup>	4428,06 <sup>A</sup>	4383,61 <sup>B</sup>	4325,63 <sup>C</sup>	4250,66 <sup>D</sup>	6.82
<b>Peso (gr/animal)</b>	2595,86 <sup>A</sup>	2657,53 <sup>A</sup>	2693,01 <sup>B</sup>	2658,24 <sup>C</sup>	2730,03 <sup>D</sup>	4.94
<b>Conversión alimenticia</b>	1,70 <sup>A</sup>	1,67 <sup>A</sup>	1,63 <sup>C</sup>	1,62 <sup>C</sup>	1,55 <sup>D</sup>	0.006
<b>GDP (gr/animal)</b>	52,65 <sup>A</sup>	52,64 <sup>A</sup>	53,35 <sup>B</sup>	51,32 <sup>C</sup>	53,59 <sup>BD</sup>	0.11
<b>Indicadores productivos</b>						
<b>Supervivencia (%)</b>	92,50 <sup>A</sup>	92,50 <sup>A</sup>	92,50 <sup>A</sup>	90,00 <sup>A</sup>	97,50 <sup>B</sup>	0.54
<b>FEA</b>	160 <sup>A</sup>	159 <sup>A</sup>	166 <sup>B</sup>	159 <sup>A</sup>	172 <sup>C</sup>	0.93
<b>IP</b>	347 <sup>A</sup>	345 <sup>A</sup>	359 <sup>B</sup>	334 <sup>C</sup>	393 <sup>D</sup>	1.53
<b>EE</b>	353 <sup>A</sup>	351 <sup>A</sup>	365 <sup>B</sup>	340 <sup>C</sup>	400 <sup>D</sup>	1.92
<b>EA (%)</b>	60,20 <sup>A</sup>	60,01 <sup>A</sup>	61,42 <sup>B</sup>	61,06 <sup>B</sup>	63,11 <sup>C</sup>	0.15

D1: Alimento comercial sin probiótico y Sin antibiótico; D2: Alimento comercial + antibiótico; D3: Alimento comercial sin antibiótico + *L. acidophilus*; D4: Alimento comercial sin antibiótico + *L. casei*; D5: Alimento comercial sin antibiótico + *E. faecium*.

Consumo: consumo promedio en gr de alimento por animal en 42 días. *Peso*: Peso promedio por animal a los 42 días. *Conversión* = consumo/peso. *Conversión* = consumo/peso. *GDP*: Ganancia Diaria de Peso promedio.

*FEA*: Factor de Eficiencia Americana; *IP*: Índice Productivo; *EE*: Eficiencia Europea; *EA*: Eficiencia Alimenticia; *EA* = 100 / conversión = % producción de carne por cada Tonelada de alimento.

<sup>A,B,C,D</sup> Dentro de una misma fila medias con un superíndice común no difieren estadísticamente ( $P < 0.05$ ).

EEM: Error estándar de la media.

En este experimento no se encontró interacción estadística entre las diferentes dietas y los días de muestreo/sacrificio para ninguna de las variables en estudio, por lo que no fue necesario analizar y desglosar dichos factores de manera independiente. Para los parámetros zootécnicos en estudio no se presentaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ; Tabla 2) entre los animales que consumieron D1 y D2. Sin embargo, las aves alimentadas con D2 reportan un consumo mayor en comparación con las demás dietas, donde las aves que recibieron D5 presentaron el menor consumo ( $P < 0,05$ ). De igual manera, el mayor peso lo presentaron las aves alimentadas con D5, al igual que la menor conversión y la

mayor GDP ( $P < 0,05$ ); mientras que las aves que consumieron D1 y D2 presentaron menor peso, mayor conversión y menor GDP.

Para los indicadores productivos, no se presentaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ; Tabla 2) entre los animales que consumieron D1 y D2. Las aves alimentadas con D2 e comparación con las alimentadas con D3, D4 y D5 presentan los indicadores más bajos. Los animales que consumieron D5 (*E. faecium*) presentaron los mejores indicadores productivos para las variables supervivencia (%), factor de eficiencia americana, índice productivo, eficiencia europea y eficiencia alimenticia ( $P < 0,05$ ; Tabla 2).

En este estudio, se presentaron diferencias significativas en los parámetros zootécnicos de pollos durante diferentes períodos de tiempo ( $P < 0,05$ , Tabla 3). Con el paso de los días, las aves aumentaron el consumo de alimento, el peso, la conversión y la GDP (tabla 3).

Variable	Días						EEM
	7	14	21	28	35	42	
<b>Consumo acumulado (gr/animal)</b>	118,71 <sup>A</sup>	328,77 <sup>B</sup>	595,65 <sup>C</sup>	992,28 <sup>D</sup>	1108,21 <sup>E</sup>	1211,14 <sup>F</sup>	6.82
<b>Peso (gr/animal)</b>	157,26 <sup>A</sup>	389,42 <sup>B</sup>	802,61 <sup>C</sup>	1450,19 <sup>D</sup>	2084,16 <sup>E</sup>	2666,56 <sup>F</sup>	4.94
<b>Conversión</b>	0,75 <sup>A</sup>	1,15 <sup>B</sup>	1,30 <sup>C</sup>	1,40 <sup>D</sup>	1,51 <sup>E</sup>	1,64 <sup>F</sup>	0.006
<b>GDP (gr)</b>	15,94 <sup>A</sup>	33,15 <sup>B</sup>	59,02 <sup>C</sup>	82,40 <sup>D</sup>	90,29 <sup>E</sup>	92,36 <sup>F</sup>	0.11

Consumo: consumo promedio en gr de alimento por animal.

Peso: Peso promedio por animal.

Conversión = consumo/peso

GDP: Ganancia Diaria de Peso por animal

<sup>A,B,C,D,E,F</sup> Dentro de una misma fila medias con un superíndice común no difieren estadísticamente ( $P < 0.05$ ).

EEM: Error estándar de la media.

## 2.5 DISCUSIÓN

El análisis del comportamiento productivo de los pollos durante 42 días refleja que los animales bajo acción probiótica mostraron una mejora en todos los parámetros evaluados con respecto a los animales control (D1 y D2).

Durante el experimento se presentaron diferencias significativas en el consumo entre las diferentes dietas (Tabla 2), presentándose mayor consumo en las dietas (D1 y D2) que no

tenían suplementación con probiótico. Dentro de los diferentes factores que pueden alterar las respuestas productivas, se encuentra el consumo de alimento, el cual puede ser alterado por condiciones ambientales como temperatura ambiental, humedad relativa, ventilación, iluminación, altura (msnm); por factores inherentes al animal como sexo, estirpe, enfermedades; y el tipo de manejo como densidad, tipo de equipos (comederos, bebederos), cama, granulometría del alimento y concentración energética de la dieta (Jaramillo, 2012). Estas variables todas fueron idénticas para todos los tratamientos en esta investigación, pues todos los tratamientos fueron realizados en la misma área, tiempo y lugar, bajo condiciones iguales de manejo a un sistema comercial.

Las diferencias en el peso vivo de las aves que recibieron los diferentes probióticos concuerda con lo obtenido por Mansoub (2010), quien al ofrecer *L. acidophilus* y *L. casei* como suplemento en la dieta de pollos de engorde encontró un aumento en las ganancias de peso y una reducción en la conversión alimenticia, debido a que éstas bacterias mejoran la digestión, absorción y disponibilidad de nutrientes en el intestino del ave.

Karimi et al (2010) reportaron que el suministro de lactobacilos en el agua de bebida de pollos de engorde, aumentó la ganancia de peso y conversiones bajas durante todos los períodos evaluados en comparación con el grupo control, atribuyéndoles estos resultados a la mejora en la eficiencia digestiva provocada por los probióticos a nivel intestinal, ya que aumentan la retención de lípidos, proteínas y minerales y favorecen su absorción.

Samli et al (2007) estudiaron el efecto de *E. faecium* en la alimentación de pollos de engorde entre el día 1 y 21, y encontraron que las aves alimentadas con *E. faecium* presentaron mejores ganancias de peso y una mejor conversión alimenticia. Los resultados obtenidos en las aves alimentadas con *E. faecium* en este trabajo coinciden con los de Capcarova et al (2010) donde las aves mostraron una mejor conversión alimenticia frente al grupo control, indicando que los cambios metabólicos causados por acción de la exclusión competitiva del probiótico incrementó la actividad digestiva, la absorción y utilización de nutrientes.

La mejora en la ganancia diaria de peso en los animales que consumieron probióticos en este estudio, concuerda con la información obtenida por Alkhalif et al (2010) quienes encontraron que el uso de bacterias ácido lácticas mejora la GDP de pollos de engorde, y por ende la conversión, debido principalmente al aumento en los procesos de digestión y absorción de nutrientes. Las poblaciones de microorganismos en el tracto gastrointestinal juegan un papel importante en los procesos digestivos y en el mantenimiento de la salud de las aves debido a que favorecen el aumento en: la actividad catalítica de las enzimas digestivas, en la degradación de macromoléculas en otras más pequeñas de fácil difusión

por la pared intestinal, y en los procesos de absorción. (Chambers & Gong, 2011; Castillo et al, 2012; Giannenas et al., 2012).

Situaciones de estrés y enfermedad o variaciones en la alimentación, inducen cambios fisicoquímicos en el ambiente intestinal, los cuales pueden tener efectos sobre las poblaciones microbianas que causan cambios sobre el desarrollo y salud del ave. El efecto de los probióticos sobre el bienestar del animal se debe a la capacidad que tienen de reducir el conteo de microorganismos no deseables como: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Salmonella spp*, *Pseudomonas aeruginosa* entre otras, presentes en el tracto digestivo, lo que se ve reflejado en el buen estado de salud y en las ganancias de peso óptimas de los animales (Castillo et al., 2012). Por lo anterior, los resultados obtenidos con la adición de *E. faecium* en este estudio, sugieren un efecto benéfico sobre el rendimiento productivo de las aves, ya que este influye significativamente sobre la presencia de bacterias ácido lácticas a nivel intestinal (Giannenas et al., 2012), lo cual se ve reflejado en el aumento en la ganancia de peso y en la disminución de la conversión alimenticia.

El análisis de los indicadores productivos es importante para conocer el estado del lote y tener un control de la producción, garantizando que se cumplan los objetivos económicos. El FEA resulta de la interacción que existe entre el potencial genético del pollo, la alimentación que recibe y el manejo al que se somete durante su vida útil; el IP resulta de la interacción de la supervivencia (%), la GDP y la conversión alimenticia, la EE relaciona varios criterios como son: duración del periodo de crianza, peso vivo, viabilidad y conversión, los cuales se analizan en conjunto para evaluar en forma rápida cual lote fue más eficiente económicamente (Gous, 2010). El EE tiene un valor constante de 300, si el resultado es mayor a 300 el lote productivo es bueno en términos económicos y si fuese un valor menor a 300 su rentabilidad es menor (Jaramillo, 2012). En este estudio se obtuvieron valores por encima de los reportados en la literatura, para las aves alimentadas con *E. faecium*, demostrando que el uso de bacterias ácido lácticas en la alimentación de pollos de engorde tiene efectos positivos tanto en el desempeño productivo como en el rendimiento económico del lote.

## **2.6 CONCLUSIONES**

La inclusión de probióticos como promotores de crecimiento en la alimentación de pollos de engorde, mejora los parámetros productivos como peso, conversión, % de

supervivencia, factor de eficiencia americana, índice productivo, eficiencia europea y eficiencia alimenticia; lo que se vería reflejado en un aumento en el rendimiento económico para los productores, y en la disminución de antibióticos en el producto de consumo final. Por lo anterior, los probióticos, específicamente *E. faecium*, pueden ser considerados como un reemplazo eficaz, seguro y rentable de los antibióticos durante todo el ciclo de producción del ave.

## 2.7 REFERENCIAS

Agostini, P. S., Solà-Oriol, D., Nofrarías, M., Barroeta, a. C., Gasa, J., & Manzanilla, E. G. (2012). Role of in-feed clove supplementation on growth performance, intestinal microbiology, and morphology in broiler chicken. *Livestock Science*, *147*(1-3), 113–118. doi:10.1016/j.livsci.2012.04.010

Alkhalif, A., Alhaj, M., & Al-Homidan, I. (2010). Influence of probiotic supplementation on blood parameters and growth performance in broiler chickens. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *17*(3), 219–25. doi:10.1016/j.sjbs.2010.04.005

Awad, W. a, Ghareeb, K., Abdel-Raheem, S., & Böhm, J. (2009). Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poultry Science*, *88*(1), 49–56. doi:10.3382/ps.2008-00244

Capcarova, M., Weiss, J., Hrncar, C., Kolesarova, a, & Pal, G. (2010). Effect of *Lactobacillus fermentum* and *Enterococcus faecium* strains on internal milieu, antioxidant status and body weight of broiler chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *94*(5), e215–24. doi:10.1111/j.1439-0396.2010.01010.x

Castillo, N. a., de Moreno de LeBlanc, A., Galdeano, C. M., & Perdigón, G. (2012). Probiotics: An alternative strategy for combating salmonellosis. *Food Research International*, *45*(2), 831–841. doi:10.1016/j.foodres.2011.04.031

Chambers, J. R., & Gong, J. (2011). The intestinal microbiota and its modulation for *Salmonella* control in chickens. *Food Research International*, *44*(10), 3149–3159. doi:10.1016/j.foodres.2011.08.017

Cortés, L., & Villamarín, S. (2013). Características morfométricas de órganos linfoides y estudios serológicos en levante de ponedoras utilizando un inmunomodulador, vitaminas y aminoácidos. *Spei Domus*, 9(18), 29–36.

Freire, M., & Berrones, A. (2008). *Efecto de diferentes relaciones Lisina:Energía sobre parámetros zootécnicos de pollos de engorde en altura*. Escuela Politécnica del Ejército.

Gaggia, F., Mattarelli, P., & Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, 141 Suppl, S15–28. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031

Giang, H. H., Viet, T. Q., Ogle, B., & Lindberg, J. E. (2010). Growth performance, digestibility, gut environment and health status in weaned piglets fed a diet supplemented with potentially probiotic complexes of lactic acid bacteria. *Livestock Science*, 129(1-3), 95–103. doi:10.1016/j.livsci.2010.01.010

Giannenas, I., Papadopoulos, E., Tsalie, E., Triantafyllou, E., Henikl, S., Teichmann, K., & Tontis, D. (2012). Assessment of dietary supplementation with probiotics on performance, intestinal morphology and microflora of chickens infected with *Eimeria tenella*. *Veterinary Parasitology*, 188(1-2), 31–40. doi:10.1016/j.vetpar.2012.02.017

Gous, R. M. (2010). Nutritional limitations on growth and development in poultry. *Livestock Science*, 130(1-3), 25–32. doi:10.1016/j.livsci.2010.02.007

Huyghebaert, G., Ducatelle, R., & Van Immerseel, F. (2011). An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *The Veterinary Journal*, 187(2), 182–8. doi:10.1016/j.tvjl.2010.03.003

Immerseel, F. V., Eeckhaut, V., Teirlynck, E., Pasmans, F., & Haesebrouck, F. (2006). Mechanisms of action of nutritional tools to control intestinal zoonotic pathogens. *16th European Symposium on Poultry Nutrition*, 243–250.

Ingrao, F., Rauw, F., Lambrecht, B., & van den Berg, T. (2013). Infectious Bursal Disease: a complex host-pathogen interaction. *Developmental and Comparative Immunology*, 41(3), 429–38. doi:10.1016/j.dci.2013.03.017

Jaramillo, A. (2012). Evaluación de la mezcla de un ácido orgánico y un prebiótico en los parámetros productivos y alométricos de pollos de engorde con alimentación controlada. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 5(1), 52–66.

Karimi, M., Moghaddam, A., Rahimi, S., & Mojgani, N. (2010). Assessing the effect of administering probiotics in water or as a feed supplement on broiler performance and immune response. *British Poultry Science*, 51(2), 178–84. doi:10.1080/00071661003753756

Mansoub, N. H. (2010). Effect of Probiotic Bacteria Utilization on Serum Cholesterol and Triglycerides Contents and Performance of Broiler Chickens. *Global Veterinaria*, 5(3), 184–186.

Manzano, P., Peralta, E., Valarezo, E., Orellana, A., & Orellana, T. (2010). Evaluación de Parámetros Zootécnicos en Pollos de Engorde Alimentados con Raciones que Incluyen *Vallesia Glabra*, una Planta que crece Silvestre en la Costa Ecuatoriana. *Revista Tecnológica ESPOL – RTE*, 23(1), 129–134.

Oso, a. O., Idowu, O. M. O., Haastrup, a. S., Ajibade, a. J., Olowonefa, K. O., Aluko, a. O., ... Bamgbose, a. M. (2013). Growth performance, apparent nutrient digestibility, caecal fermentation, ileal morphology and caecal microflora of growing rabbits fed diets containing probiotics and prebiotics. *Livestock Science*, 157(1), 184–190. doi:10.1016/j.livsci.2013.06.017

Placha, I., Simonova, M. P., Cobanova, K., Laukova, a, & Faix, S. (2010). Effect of *Enterococcus faecium* AL41 and *Thymus vulgaris* essential oil on small intestine integrity and antioxidative status of laying hens. *Research in Veterinary Science*, 89(2), 257–61. doi:10.1016/j.rvsc.2010.03.006

Ravindran, V. (2013). Disponibilidad de piensos y nutrición de aves de corral en países en desarrollo. In *Revisión del desarrollo avícola* (Primera Ed., pp. 62–66).

Rebollar, M. (2002). *Evaluación de indicadores productivos en pollos de engorda al incluir maíz y pasta de soya extruidos y malta de cebada*. Universidad de Colima.

Rosero, J. P., Guzman, E. F., & Lopez, F. J. (2012). Evaluación del comportamiento productivo de las líneas de pollos de engorde Cobb 500 y Ross 308. *Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 10(1), 8–15.

Samli, H. E., Senkoğlu, N., Koc, F., Kanter, M., & Agma, A. (2007). Effects of *Enterococcus faecium* and dried whey on broiler performance, gut histomorphology and intestinal microbiota. *Archives of Animal Nutrition*, 61(1), 42–9. doi:10.1080/17450390601106655

Sharma, P., Tomar, S. K., Goswami, P., Sangwan, V., & Singh, R. (2014). Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food Research International*, *57*, 176–195. doi:10.1016/j.foodres.2014.01.025

Tsirtsikos, P., Fegeros, K., Balaskas, C., Kominakis, A., & Mountzouris, K. C. (2012). Dietary probiotic inclusion level modulates intestinal mucin composition and mucosal morphology in broilers. *Poultry Science*, *91*(1860-1868), 1860–1868. doi:dx.doi.org/ 10.3382/ps.2011-02005

### **3. Evaluación de cepas probióticas (*L. acidophilus*, *L. casei* y *E. faecium*) sobre el desarrollo alométrico y morfológico intestinal en pollos de engorde**

#### **3.1 RESUMEN**

A través de la alimentación los animales se exponen a diferentes agentes extraños, el epitelio intestinal actúa como una barrera natural contra las bacterias patógenas y sustancias tóxicas que estén presentes en el lumen intestinal. La ingesta de probióticos ha sido asociada a mejoras en parámetros productivos como conversión alimenticia y ganancia de peso, los cuales influyen y se ven reflejados sobre el desarrollo y función de órganos, específicamente el intestino. El objetivo de este trabajo fue ofrecer diferentes cepas probióticas y evaluar su efecto sobre el crecimiento alométrico y desarrollo intestinal de pollos de engorde durante su etapa productiva. Se utilizaron 200 pollos machos (Cobb) de un día de edad, obtenidos de una casa comercial. Las aves fueron alimentadas con dos dietas: dieta basal con y sin la adición de antibiótico. Los diferentes probióticos (*L. casei*, *L. acidophilus* ó *E. faecium*) se suministraron en el agua de bebida de los animales que consumieron la dieta basal sin antibiótico garantizando una concentración de  $10^7$ UFC/ml. El diseño estadístico utilizado fue de bloques al azar en arreglo de parcelas divididas. La inclusión de probióticos como promotores de crecimiento, específicamente *E. faecium*, en la alimentación de pollos de engorde, mejoraron el peso, desarrollo y crecimiento de órganos de importancia digestiva, específicamente intestino, lo cual se ve reflejado en vellosidades con mayor altura y ancho, y criptas menos profundas. Por lo anterior, los probióticos pueden ser utilizados en la alimentación de aves durante todo el ciclo productivo como reemplazo eficaz, seguro y rentable de los antibióticos.

**Palabras claves:** aditivos, aves de corral, bacterias ácido lácticas, broiler, promotores de crecimiento, sistema digestivo, vellosidades intestinales.

### 3.2 INTRODUCCIÓN

La avicultura es una actividad que ha alcanzado grandes avances en las últimas décadas y esto se debe principalmente a la acción conjunta entre genética, sanidad, manejo y nutrición (Kalmar *et al.*, 2013). Desde el punto de vista nutricional, los animales se exponen a diferentes agentes extraños a través de los diferentes alimentos utilizados, los cuales en un momento determinado podrían ocasionar una reacción inmunológica (Giannenas *et al.*, 2012; Korver, 2012).

La mucosa intestinal está cubierta por una membrana epitelial en forma de dedos, conocida como vellosidades, las cuales aumentan el área de absorción de nutrientes, y están tapizadas por una capa continua de células epiteliales, los enterocitos (Cunningham & Klein, 2009). En la base de las vellosidades hay una estructura conocida como criptas de Lieberkühn, las cuales renuevan el revestimiento del intestino y elaboran moco. Las células madre que residen en las criptas dan lugar a células progenitoras, que proliferan y se diferencian en enterocitos durante la migración a la punta de las vellosidades. Bajo condiciones normales enterocitos se desprenden constantemente y son reemplazados (Schokker, 2012).

El epitelio intestinal actúa como una barrera natural contra las bacterias patógenas y sustancias tóxicas que están presentes en el lumen intestinal. Algunos factores patógenos y sustancias químicas pueden causar alteraciones en la microbiota normal y/o en el epitelio intestinal que pueden alterar la permeabilidad de esta barrera natural, facilitando la invasión de patógenos y sustancias perjudiciales en la mucosa intestinal, las cuales provocan la aparición de procesos inflamatorios crónicos, y a su vez, la disminución en el tamaño de las vellosidades, y en los procesos de digestión y absorción de nutrientes (Lodemann, 2010; Chambers & Gong, 2011; Plaza, Gomez, Fontana, & Gil, 2014).

En los últimos años se venían utilizando en la alimentación animal antibióticos como promotores de crecimiento (APC) en dosis subterapéuticas, los cuales no sólo influyen en las poblaciones microbianas intestinales y sus actividades, sino que además, afectan el metabolismo de los animales y alteran específicamente la función intestinal (Huyghebaert *et al.*, 2011; Král *et al.*, 2012). La preocupación mundial sobre el desarrollo de la resistencia a los antimicrobianos y sobre la transferencia de genes de resistencia a los antibióticos de los animales a la microbiota humana, condujo a la prohibición del uso de antibióticos como promotores del crecimiento en la Unión Europea desde el 1 de enero 2006 (Gaggia *et al.*, 2010).

Por lo anterior, para disminuir o eliminar la utilización de antibióticos se han buscado alternativas “biológicamente seguras” como los probióticos (Placha *et al.*, 2010; Agostini *et al.*, 2012; Oso *et al.*, 2013). El uso de probióticos en la nutrición animal ayudan con el mantenimiento de la microbiota intestinal normal, aumentan la actividad de enzimas digestivas, disminuyen la actividad de las enzimas bacterianas y la producción de amoniaco; y estabilizan la barrera de la mucosa intestinal, aumentando la secreción de moco y la motilidad intestinal (Quigley, 2010).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue ofrecer diferentes cepas probióticas y evaluar su efecto sobre el crecimiento alométrico y desarrollo intestinal de pollos de engorde durante su etapa productiva.

### **3.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.3.1 Localización**

El trabajo de campo se realizó en la granja avícola comercial, Los Andes, dedicada a la producción de pollos de engorde, ubicada en el municipio de Girardota, vereda “El Totumo”, localizado a 1425 msnm, con una temperatura promedio de 22°C, correspondiendo a una zona de vida bosque húmedo premontano (bh-PM).

#### **3.3.2 Animales**

Se utilizaron 200 pollos machos de un día de edad de la línea comercial Cobb obtenidos de una casa comercial, con un peso promedio inicial de 45,65 gramos. El período experimental tuvo una duración de 42 días. La cría se realizó siguiendo los procedimientos comerciales establecidos en la granja.

#### **3.3.3 Instalaciones y Equipos**

Los pollos fueron alojados dentro de un galpón comercial con piso de cemento y con cama de viruta de madera, en el cual se realizaron las divisiones para los tratamientos utilizando cartón plast. Cada división tuvo una medida de 1.0 x 1.2 metros, además de comedero y bebedero independiente. Durante la primera y segunda semana se utilizaron comederos de bandeja, posteriormente se cambió a comedero de tolva. Durante todo el experimento se utilizaron bebederos de volteo de 3 Lt de capacidad, y el agua se suministraba dos veces al día. Para mantener la temperatura homogénea durante las primeras semanas se utilizaron criadoras a gas, y posteriormente cortinas alrededor del galpón para controlar la temperatura, humedad y entrada-salida de corrientes de aire. Para realizar el pesaje de los pollos y el alimento suministrado se utilizó una balanza digital.

### 3.3.4 Manejo Sanitario

Para el recibimiento de los pollos, se realizó lavado, limpieza y desinfección del galpón, cortinas, comederos y bebederos; además, se hizo el control de roedores e insectos con productos obtenidos en casas comerciales. Las criadoras se encendieron cinco horas antes de la llegada de los animales.

### 3.3.5 Dietas

Los animales se alimentaron con una dieta formulada de acuerdo con los requerimientos nutricionales establecidos por Rostagno (2011).

D1: Alimento comercial sin probiótico y sin antibiótico

D2: Alimento comercial + antibiótico (como APC)

D3: Alimento comercial sin antibiótico + *L. acidophilus*

D4: Alimento comercial sin antibiótico + *L. casei*

D5: Alimento comercial sin antibiótico + *E. faecium*.

Se elaboraron 2 dietas (Tabla 1), una para la etapa de iniciación (día 1 al 21), y la otra para la etapa de finalización (día 22 al 42).

Los probióticos fueron suministrados en el agua de bebida, la cantidad de probiótico adicionado (relación v/p) fue proporcional a 1 gr de probiótico por cada 20 Lt de agua, siguiendo las instrucciones para su preparación y adición según lo recomendado por el fabricante. La concentración de probióticos viables que se considera que debe llegar al intestino para producir un efecto beneficioso es de  $\geq 10^6$  UFC/mL, por tal motivo se utilizó en promedio  $10^7$  UFC/mL (Sharma *et al.*, 2014). No fue de interés modificar la dieta, sino la incorporación eficiente de los probióticos como una alternativa al uso de APC.

### 3.3.6 Eutanasias humanitarias y toma de muestras órganos

Durante la fase experimental se realizó eutanasia humanitaria a 65 aves de la siguiente forma: El día inicial, o Día 1, se sacrificaron 5 aves que representaron el grupo de referencia para verificar el estado general de salud y la evaluación macroscópica del estado de los órganos antes de suministrar las dietas experimentales. Durante la fase de eutanasias escalonadas se sacrificaron 90 aves de la siguiente forma: los días 7, 14, 21, 28, 35 y 42 se sacrificaron 10 aves/día (dos aves por tratamiento). Los animales se sedaron por inhalación con Nitrox<sup>®</sup> y posteriormente se les realizó eutanasia humanitaria con dióxido de carbono durante 3 minutos. Todas las aves fueron sacrificadas 2.5 horas después de su última comida.

Después del sacrificio, las aves se pusieron en posición ventral boca arriba, separando los miembros posteriores y extendiendo las alas lateralmente; luego se realizó un corte que iba desde la parte anterior del cuello hasta la cloaca, intentando cortar solo la piel. Las aves no tienen cavidad torácica y abdominal, sino una sola cavidad interna denominada cavidad celómica, donde se encuentran la mayoría de los órganos vitales. Para la apertura de la cavidad celómica se realizó un corte con las tijeras en la zona que se encuentra por debajo de la pechuga. Se realizaron dos pequeños cortes laterales hasta llegar a las costillas, y luego un corte de las costillas en dirección craneal. En este instante se evaluó la presencia de exudados diversos y el estado de sacos aéreos (Dolz & Majó, 2011).

Los órganos de la cavidad celómica se extrajeron conjuntamente. El corazón se removió cortando con una tijera en la base a nivel de los grandes vasos, y separado de los pulmones. Se retiró el tracto gastrointestinal con el hígado y el bazo. El bazo se localiza dorsalmente entre la molleja y el proventrículo, es de color café rojizo y su forma varía entre redondo y ovalado. El proventrículo y la molleja, se separan del intestino y se abrieron con tijera examinando el contenido y la mucosa. El intestino de las aves se divide en intestino delgado e intestino grueso; el intestino delgado empieza con la curvatura duodenal hasta el ciego, que marca la unión del intestino delgado con el grueso, se tomaron 20 cms de todas las porciones del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon); se tomó una muestra del páncreas que se encuentra adherido al mesenterio duodenal. Después de retirados todos los órganos, se extrajeron los pulmones que se encuentran in situ en la pared dorsal del tórax y finalmente los riñones que se encuentran adheridos a la carcasa (Acevedo, 2012). Todos los órganos extraídos fueron lavados con solución salina fría, y luego fueron pesados para los análisis alométricos.

Los pesos de los órganos fueron convertidos a porcentaje de peso vivo (%PV) por medio de la fórmula:

$$\%PV = \frac{\text{Peso \acute{o}rgano} \times 100}{\text{Peso promedio/ave}}$$

Para determinar la ontogénesis del crecimiento de los diferentes órganos y su relación con el peso corporal, se utilizó la constante de Crecimiento Alométrico (CA), según la siguiente ecuación:

$$CA = \frac{O_n/O_h}{P_n/P_h}$$

Donde: O= peso del órgano; n= días después del nacimiento; h= peso al nacimiento y PC= peso corporal.

Cuando el órgano crece en la misma proporción al peso corporal, CA es de 1; si el crecimiento del órgano es menor al peso corporal, CA es menor a 1; y cuando CA es mayor a 1, hay un crecimiento rápido en relación con la ganancia total de peso corporal (Cortés & Villamarin, 2013; Jaramillo, 2012).

### **3.3.7 Diseño estadístico**

El experimento se realizó según un diseño bloques al azar en un arreglo de parcelas divididas, donde los animales fueron aleatorizados a cada uno de los tratamientos (5 dietas por 6 períodos de evaluación), y cada tratamiento tuvo un total de 2 repeticiones. El análisis estadístico fue desarrollado usando el procedimiento GLM del SAS (2007).

### **3.3.8 Consideraciones éticas**

Esta investigación fue avalada por El Comité de Ética en la Experimentación Animal de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín (CEMED 045 del 10 de junio de 2014).

## **3.4 RESULTADOS**

En general las aves que consumieron las diferentes dietas presentaron un buen estado de salud, y no presentaron síntoma alguno de enfermedad que causara su retiro y/o sacrificio inmediato. Además al nivel en que se fijó el suministro diario de alimento no hubo sobrantes.

En este experimento no se encontró interacción estadística entre las diferentes dietas y los días de sacrificio para ninguna de las variables en estudio, por lo que no fue necesario analizar y desglosar dichos factores de manera independiente.

Para la variable peso de órganos (%PV) se presentaron diferencias significativas entre dietas, donde las aves que recibieron D5 presentaron los mayores valores con respecto a las demás dietas ( $P < 0,05$ ; Tabla 2). No obstante, los animales que consumieron D1 y D2 presentaron los menores valores para cada uno de los órganos en estudio ( $P < 0,05$ ). De igual manera, las aves alimentadas con D5 presentaron los mayores valores para análisis alométrico de órganos, mientras que los animales que recibieron D1 y D2 presentaron los

menores valores para cada uno de los órganos en estudio ( $P < 0,05$ ). Es importante resaltar que el corazón de las aves alimentadas con D5 presentó un crecimiento proporcional ( $CA=1$ ) con relación al peso corporal; mientras que el pulmón y riñón de las aves alimentadas con D4 y D5 presentaron un crecimiento rápido ( $CA > 1$ ) en relación con el peso corporal ( $P < 0,05$ ). El resto de órganos tuvo un crecimiento lento ( $CA < 1$ ) con relación al peso corporal (Tabla 4).

Tabla 4: Peso de órganos (%PV) y análisis alométrico (CA) de pollos que consumieron dietas con cepas probióticas ( <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> y <i>E. faecium</i> ) durante 42 días.							
Órgano	(%PV)	Dietas					EEM
	CA	D1	D2	D3	D4	D5	
Corazón		0,53 <sup>A</sup>	0,61 <sup>B</sup>	0,63 <sup>B</sup>	0,57 <sup>C</sup>	0,64 <sup>A</sup>	0,005
		0,64 <sup>A</sup>	0,79 <sup>B</sup>	0,94 <sup>C</sup>	0,87 <sup>D</sup>	1,00 <sup>E</sup>	0,009
Páncreas		0,23 <sup>A</sup>	0,26 <sup>B</sup>	0,28 <sup>B</sup>	0,27 <sup>B</sup>	0,30 <sup>C</sup>	0,003
		0,36 <sup>A</sup>	0,29 <sup>B</sup>	0,35 <sup>A</sup>	0,36 <sup>A</sup>	0,42 <sup>C</sup>	0,008
Hígado		2,87 <sup>A</sup>	2,97 <sup>A</sup>	3,24 <sup>B</sup>	3,19 <sup>AB</sup>	3,50 <sup>C</sup>	0,040
		0,70 <sup>A</sup>	0,82 <sup>B</sup>	0,69 <sup>A</sup>	0,58 <sup>C</sup>	0,65 <sup>D</sup>	0,005
Pulmón		0,46 <sup>A</sup>	0,53 <sup>B</sup>	0,58 <sup>C</sup>	0,55 <sup>B</sup>	0,58 <sup>C</sup>	0,004
		0,68 <sup>A</sup>	0,73 <sup>A</sup>	0,81 <sup>B</sup>	1,07 <sup>C</sup>	1,14 <sup>D</sup>	0,007
Intestino		<b>5,92<sup>A</sup></b>	<b>6,30<sup>B</sup></b>	<b>6,77<sup>C</sup></b>	<b>6,60<sup>C</sup></b>	<b>6,91<sup>D</sup></b>	<b>0,027</b>
		<b>0,45<sup>A</sup></b>	<b>0,46<sup>A</sup></b>	<b>0,48<sup>A</sup></b>	<b>0,53<sup>C</sup></b>	<b>0,56<sup>D</sup></b>	<b>0,004</b>
Proventrículo		0,46 <sup>A</sup>	0,51 <sup>B</sup>	0,51 <sup>B</sup>	0,52 <sup>B</sup>	0,56 <sup>C</sup>	0,003
		0,51 <sup>A</sup>	0,66 <sup>B</sup>	0,75 <sup>C</sup>	0,57 <sup>D</sup>	0,79 <sup>E</sup>	0,003
Molleja		1,98 <sup>A</sup>	2,02 <sup>A</sup>	2,32 <sup>B</sup>	2,39 <sup>C</sup>	2,47 <sup>D</sup>	0,015
		0,46 <sup>A</sup>	0,56 <sup>B</sup>	0,46 <sup>A</sup>	0,47 <sup>A</sup>	0,57 <sup>B</sup>	0,005
Riñón		0,58 <sup>A</sup>	0,60 <sup>B</sup>	0,61 <sup>B</sup>	0,60 <sup>B</sup>	0,65 <sup>C</sup>	0,002
		0,71 <sup>A</sup>	0,75 <sup>A</sup>	0,77 <sup>A</sup>	1,05 <sup>B</sup>	1,36 <sup>C</sup>	0,01

D1: Alimento comercial sin probiótico y Sin antibiótico; D2: Alimento comercial + antibiótico; D3: Alimento comercial sin antibiótico + *L. acidophilus*; D4: Alimento comercial sin antibiótico + *L. casei*; D5: Alimento comercial sin antibiótico + *E. faecium*.

$$\%PV = \frac{\text{Peso órgano} \times 100}{\text{Peso promedio/ave}}$$

CA= (On / Oh) / ( PCn / PCh); Donde: O= peso del órgano; n= días después del nacimiento; h= peso al nacimiento y PC= peso corporal.  $CA < 1$ : crecimiento lento con relación al peso corporal.  $CA = 1$ : crecimiento proporcional con relación al peso corporal.  $CA > 1$ : crecimiento rápido con relación al peso corporal

<sup>A,B,C,D</sup> Dentro de una misma fila medias con un superíndice común no difieren estadísticamente ( $P < 0.05$ ).

EEM: Error estándar de la media.

Se presentaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) para la variable peso de órganos (%PV) durante los diferentes períodos de tiempo de evaluación, donde páncreas y molleja

alcanzaron su mayor peso al día 21; corazón, pulmón, hígado, intestino y proventrículo al día 28; y riñón al día 42 (Tabla 4).

En el análisis alométrico de órganos en los diferentes días de sacrificio se presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ), obteniéndose que en la evaluación realizada el día 42 las aves presentaron los mayores valores para cada uno de los órganos, mientras que los menores valores se obtuvieron en la primera evaluación (día 14) (Tabla 5). El corazón de las aves presenta un crecimiento proporcional ( $CA=1$ ) en el día 42, mientras que riñón presenta un crecimiento rápido ( $CA > 1$ ) durante el mismo período de evaluación. El resto de órganos presentan un crecimiento lento ( $CA < 1$ ) en relación con el peso corporal en los diferentes períodos de tiempo (Tabla 5).

Tabla 5: Peso de órganos (%PV) y análisis alométrico de pollos que consumieron cepas probióticas (*L. acidophilus*, *L. casei* y *E. faecium*) durante diferentes períodos de tiempo

Órgano	(%)PV	Días						EEM
	CA	7	14	21	28	35	42	
Corazón		0,52 <sup>A</sup>	0,73 <sup>B</sup>	0,88 <sup>C</sup>	1,25 <sup>D</sup>	1,04 <sup>E</sup>	0,99 <sup>F</sup>	0,005
		-	0,71 <sup>A</sup>	0,86 <sup>B</sup>	0,96 <sup>C</sup>	0,95 <sup>C</sup>	1,00 <sup>D</sup>	0,009
Páncreas		0,49 <sup>A</sup>	0,29 <sup>B</sup>	0,51 <sup>C</sup>	0,42 <sup>D</sup>	0,30 <sup>E</sup>	0,40 <sup>F</sup>	0,003
		-	0,24 <sup>A</sup>	0,31 <sup>B</sup>	0,34 <sup>B</sup>	0,40 <sup>C</sup>	0,54 <sup>D</sup>	0,008
Hígado		3,33 <sup>A</sup>	4,21 <sup>B</sup>	4,95 <sup>C</sup>	5,45 <sup>D</sup>	5,33 <sup>E</sup>	4,77 <sup>F</sup>	0,040
		-	0,54 <sup>A</sup>	0,62 <sup>B</sup>	0,66 <sup>C</sup>	0,77 <sup>D</sup>	0,86 <sup>E</sup>	0,005
Pulmón		-	0,68 <sup>A</sup>	0,87 <sup>B</sup>	1,12 <sup>C</sup>	1,02 <sup>D</sup>	0,88 <sup>E</sup>	0,004
		-	-	0,71 <sup>A</sup>	0,88 <sup>B</sup>	0,96 <sup>C</sup>	0,99 <sup>C</sup>	0,007
Intestino		<b>8,95<sup>A</sup></b>	<b>6,75<sup>B</sup></b>	<b>10,91<sup>C</sup></b>	<b>11,30<sup>D</sup></b>	<b>9,62<sup>E</sup></b>	<b>10,33<sup>F</sup></b>	<b>0,027</b>
		-	<b>0,51<sup>A</sup></b>	<b>0,43<sup>B</sup></b>	<b>0,51<sup>A</sup></b>	<b>0,42<sup>B</sup></b>	<b>0,63<sup>C</sup></b>	<b>0,004</b>
Proventrículo		0,56 <sup>A</sup>	0,64 <sup>B</sup>	0,89 <sup>C</sup>	0,91 <sup>D</sup>	0,71 <sup>E</sup>	0,83 <sup>F</sup>	0,003
		-	0,50 <sup>A</sup>	0,56 <sup>B</sup>	0,66 <sup>C</sup>	0,78 <sup>D</sup>	0,82 <sup>E</sup>	0,003
Molleja		3,02 <sup>A</sup>	3,54 <sup>B</sup>	3,67 <sup>C</sup>	3,64 <sup>D</sup>	2,78 <sup>E</sup>	2,96 <sup>F</sup>	0,015
		-	0,36 <sup>A</sup>	0,37 <sup>A</sup>	0,49 <sup>C</sup>	0,63 <sup>D</sup>	0,80 <sup>E</sup>	0,005
Riñón		-	0,75 <sup>A</sup>	1,17 <sup>B</sup>	1,00 <sup>C</sup>	0,96 <sup>D</sup>	1,27 <sup>E</sup>	0,002
		-	-	0,76 <sup>A</sup>	0,80 <sup>A</sup>	0,94 <sup>B</sup>	1,19 <sup>C</sup>	0,01

$$\%PV = \frac{\text{Peso órgano} \times 100}{\text{Peso promedio/ave}}$$

CA= (On / Oh) / ( Pcn / PCh); Donde: O= peso del órgano; n= días después del nacimiento; h= peso al nacimiento y PC= peso corporal. CA<1: crecimiento lento con relación al peso corporal. CA=1: crecimiento proporcional con relación al peso corporal. CA>1: crecimiento rápido con relación al peso corporal

<sup>A,B,C,D,E</sup> Dentro de una misma fila medias con un superíndice común no difieren estadísticamente ( $P < 0.05$ ).

EEM: Error estándar de la media.

Para la variable altura de vellosidades, se presentó diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre los animales que consumieron D1 y D2, donde la sección intestinal duodeno presentó los mayores valores para D2. No obstante al comparar D2 con los demás dietas, D5 presentó diferencia significativa ( $P < 0.05$ ), donde duodeno tuvo los mayores valores; lo mismo ocurrió en yeyuno e íleon. Para la variable ancho de vellosidades D1 y D2 presentaron diferencia significativa ( $P < 0.05$ ), y los mayores valores fueron para D2 en las tres porciones del intestino; al comparar D2 con las demás dietas se presentan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) y D5 reporta los valores mayores en duodeno, yeyuno e íleon (tabla 6).

Tabla 6: Comparación entre vellosidades y criptas ( $\mu\text{m}$ ) en diferentes secciones del intestino de pollos que consumieron dietas con cepas probióticas ( <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> y <i>E. faecium</i> ) durante 42 días.							
Variable ( $\mu\text{m}$ )		Dietas					EEM
		D1	D2	D3	D4	D5	
<b>Vellosidades (<math>\mu\text{m}</math>)</b>							
Altura	Duodeno	742.4 <sup>A, X</sup>	805.2 <sup>B, X</sup>	884.3 <sup>C, X</sup>	921.6 <sup>D, X</sup>	996.1 <sup>E, X</sup>	3.14
	Yeyuno	708.1 <sup>A, X</sup>	779.3 <sup>B, Y</sup>	857.5 <sup>C, Y</sup>	904.6 <sup>D, XY</sup>	965.4 <sup>E, Y</sup>	
	Íleon	691.9 <sup>A, Y</sup>	764.4 <sup>B, Y</sup>	839.6 <sup>C, Y</sup>	884.2 <sup>D, Y</sup>	935.3 <sup>E, Z</sup>	
ancho	Duodeno	121.3 <sup>A</sup>	132.4 <sup>B, X</sup>	145.1 <sup>C, X</sup>	156.6 <sup>D, X</sup>	164.0 <sup>E, X</sup>	1.09
	Yeyuno	119.4 <sup>A</sup>	126.7 <sup>B, X, Y</sup>	137.2 <sup>C, Y</sup>	148.3 <sup>D, Y</sup>	157.3 <sup>E, Y</sup>	
	Íleon	117.2 <sup>A</sup>	122.2 <sup>B, Y</sup>	132.7 <sup>C, Y</sup>	145.7 <sup>D, Y</sup>	155.1 <sup>E, Z</sup>	
<b>Criptas (<math>\mu\text{m}</math>)</b>							
Profundidad	Duodeno	119.4 <sup>A, X</sup>	114.2 <sup>B, X</sup>	109.4 <sup>C, X</sup>	107.8 <sup>C, X</sup>	103.5 <sup>D, X</sup>	0.61
	Yeyuno	125.2 <sup>A, Y</sup>	121.5 <sup>B, Y</sup>	117.4 <sup>C, Y</sup>	112.6 <sup>D, Y</sup>	107.4 <sup>E, Y</sup>	
	Íleon	128.3 <sup>A, Y</sup>	124.6 <sup>B, Y</sup>	119.1 <sup>C, Y</sup>	114.7 <sup>D, Y</sup>	109.6 <sup>E, Y</sup>	
ancho	Duodeno	111.9 <sup>A, X</sup>	107.5 <sup>B, X</sup>	104.5 <sup>C, X</sup>	102.8 <sup>C, X</sup>	99.4 <sup>D, X</sup>	0.38
	Yeyuno	112.1 <sup>A, Y</sup>	109.2 <sup>B, Y</sup>	106.2 <sup>C, Y</sup>	106.1 <sup>C, Y</sup>	103.2 <sup>D, Y</sup>	
	Íleon	113.2 <sup>A, Z</sup>	110.3 <sup>B, Z</sup>	107.5 <sup>C, Z</sup>	107.1 <sup>CD, Y</sup>	106.7 <sup>C, Z</sup>	

D1: Alimento comercial sin probiótico y Sin antibiótico; D2: Alimento comercial + antibiótico; D3: Alimento comercial sin antibiótico + *L. acidophilus*; D4: Alimento comercial sin antibiótico + *L. casei*; D5: Alimento comercial sin antibiótico + *E. faecium*.

<sup>A, B, C, D, E</sup> Dentro de una misma fila medias con un superíndice común no difieren estadísticamente ( $P < 0.05$ ).

<sup>X, Y, Z</sup> Dentro de una misma fila medias con un superíndice común no difieren estadísticamente ( $P < 0.05$ ).

EEM: Error estándar de la media.

Para la variable profundidad de criptas se presentó diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre D1 y D2, donde D2 tuvo valores menores (tabla 6). D5 presentó los valores más bajos

( $P < 0.05$ ) en comparación con las demás dietas en todas las porciones del intestino. Para la variable ancho de cripta (tabla 6) D1 presentó los mayores valores ( $P < 0.05$ ) en comparación con D2. En las demás porciones del intestino D5 presentó los valores más bajos ( $P < 0.05$ ).

Comparando las porciones del intestino, también se presentaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en la altura y el ancho de las vellosidades, el duodeno presentó una mayor altura de vellosidades en comparación con el yeyuno e íleon, esto se observó en todas las dietas. Para las variables profundidad y ancho de criptas se encontró que el duodeno presentó mayor profundidad y menor ancho de criptas en comparación con yeyuno e íleon, lo cual se observó en todas las dietas (tabla 6).

Tabla 7: Comparación entre vellosidades y criptas ( $\mu\text{m}$ ) en diferentes secciones del intestino de pollos que consumieron cepas probióticas ( <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> y <i>E. faecium</i> ) durante diferentes períodos de tiempo					
Variable		Días			EEM
		1	21	42	
Vellosidades ( $\mu\text{m}$ )					
Altura	Duodeno	779.5 <sup>A, X</sup>	869.3 <sup>B, X</sup>	961.1 <sup>C, X</sup>	2.84
	Yeyuno	753.7 <sup>A, Y</sup>	834.9 <sup>B, Y</sup>	939.3 <sup>C, Y</sup>	
	Ileon	735.6 <sup>A, Y</sup>	820.4 <sup>B, Z</sup>	912.3 <sup>C, Z</sup>	
ancho	Duodeno	126.7 <sup>A, X</sup>	144.7 <sup>B, X</sup>	159.1 <sup>C, X</sup>	1.54
	Yeyuno	120.9 <sup>A, Y</sup>	143.2 <sup>B, XY</sup>	149.3 <sup>B, Y</sup>	
	Ileon	119.1 <sup>A, Y</sup>	136.7 <sup>B, Y</sup>	147.8 <sup>C, Y</sup>	
Criptas ( $\mu\text{m}$ )					
Profundidad	Duodeno	116.5 <sup>A, X</sup>	110.5 <sup>B, X</sup>	105.3 <sup>C, X</sup>	0.81
	Yeyuno	123.5 <sup>A, Y</sup>	116.1 <sup>B, Y</sup>	111.2 <sup>C, Y</sup>	
	Ileon	125.4 <sup>A, Y</sup>	120.7 <sup>B, Y</sup>	112.1 <sup>C, Y</sup>	
ancho	Duodeno	109.5 <sup>A</sup>	106.5 <sup>B</sup>	101.2 <sup>C, X</sup>	0.45
	Yeyuno	110.5 <sup>A</sup>	107.2 <sup>B</sup>	104.5 <sup>C, Y</sup>	
	Ileon	111.6 <sup>A</sup>	108.7 <sup>B</sup>	106.1 <sup>B, Y</sup>	

<sup>A,B,C,D,E</sup> Dentro de una misma fila medias con un superíndice común no difieren estadísticamente ( $P < 0.05$ ).

<sup>X,Y,Z</sup> Dentro de una misma fila medias con un superíndice común no difieren estadísticamente ( $P < 0.05$ ).

EEM: Error estándar de la media.

Con la inclusión de bacterias ácido lácticas en dietas de pollos de engorde durante 42 días, se presentaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en los tres períodos evaluados. El día 1 las aves presentaron menor altura y ancho de vellosidades en cada una de las porciones

del intestino y las criptas presentaron mayor profundidad y mayor ancho; al día 21 y 42 se observa como la altura y el ancho de las vellosidades aumentan y la profundidad y ancho de las criptas disminuye (tabla 7). También observamos que en cada periodo de tiempo evaluado si se comparan las porciones del intestino entre ellas, el duodeno presenta mayor altura y ancho de vellosidades y menor profundidad y ancho de criptas, en comparación con yeyuno e íleon.

### **3.5 DISCUSIÓN**

En este trabajo se encontraron mayores pesos de órganos en las aves alimentadas con cepas probióticas, específicamente con *E. faecium*, en comparación con la dieta que contenía antibiótico (D2), constatando que con la utilización de probióticos se incrementa la retención de nutrientes incluidos en la dieta, la ganancia de peso y el desarrollo de órganos del animal (Franz *et al*, 2011). Las líneas genéticas de pollos utilizadas actualmente tienen un crecimiento más rápido que las que se utilizaban antes, por lo que necesitan que sus órganos tengan un desarrollo rápido, lo que se logró con la utilización de probióticos, específicamente *E. faecium*.

Se encontró que durante la primera semana de vida del ave se da un crecimiento rápido de los órganos, coincidiendo con lo reportado por Cuervo *et al.*, (2002), donde el peso de órganos digestivos como intestino, hígado, páncreas, molleja y proventrículo aumentan significativamente durante la primera semana de vida, lo que conlleva al aumento de los procesos digestivos, y por ende, en el comportamiento productivo del ave. La inclusión de microorganismos probióticos en la dieta de pollos de engorde permite el rápido desarrollo de las bacterias benéficas en el tracto digestivo, mejorando su rendimiento. Como consecuencia, hay una mejora en el ambiente intestinal, aumentando la eficiencia de los procesos de digestión y absorción de nutrientes, los cuales se ven reflejados en las ganancias de peso y por consiguiente en el desarrollo de los órganos (Alkhalif *et al.*, 2010).

El crecimiento proporcional del corazón de las aves alimentadas con *E. faecium* podría estar relacionado con el aumento en el peso corporal, el cual puede aumentar la proliferación de tejido muscular o la deposición de grasa en éste órgano. Esto mismo pudo pasar con el crecimiento rápido del pulmón y del riñón de las aves alimentadas con *E. faecium* y con *L. casei* (Anwar *et al.*, 2012).

En este trabajo, proventrículo y molleja, presentaron el mayor crecimiento durante los días 28 y 42 en comparación con el resto de días. Cuando se añaden a la dieta

componentes que mejoran la disponibilidad de nutrientes, como en este caso los probióticos, se estimula el crecimiento y desarrollo de molleja y proventrículo (Svihus, 2011).

El páncreas mostró un crecimiento alométrico lento en relación con el peso corporal en cada uno de los tratamientos; sin embargo, el páncreas es un órgano pequeño e inmaduro funcionalmente durante los primeros días de vida del ave, pero luego sufre una rápida maduración debido a la actividad de las enzimas pancreáticas que ayudan a la digestión de carbohidratos, lípidos y proteínas (Cuervo *et al.*, 2002). No obstante, el intestino mostró un crecimiento lento en relación al peso corporal en esta investigación, lo que concuerda con Jaramillo (2012) quien encontró que durante la primera y segunda semana después de la eclosión, el intestino muestra una disminución en el tamaño relativo al peso corporal, lo que podría comprometer directamente la salud intestinal, la absorción de nutrientes, y por último el crecimiento y desarrollo del ave.

La diferencia de CA del hígado entre las diferentes dietas coincide con lo reportado por Anwar *et al* (2012), donde encontraron que aves suplementadas con probióticos tenían menor CA comparado con aves alimentadas sin aditivos probióticos, lo que puede estar relacionado con una mayor movilización de grasas y glucosa a partir del hígado.

El consumo de probióticos ha sido asociada a mejoras en parámetros productivos como conversión alimenticia y ganancia de peso, los cuales influyen y se ven reflejados sobre el peso y desarrollo de órganos, específicamente del intestino (Franz *et al.*, 2011). A nivel intestinal, los probióticos pueden aumentar el transporte y la absorción en el epitelio de nutrientes, debido a que favorecen el crecimiento de las vellosidades intestinales, y al mismo tiempo, minimizan la proliferación de agentes patógenos al competir por nutrientes y sitios de adhesión en las paredes intestinales, interpretándose como un efecto positivo para el animal (Musa *et al.*, 2009).

En pollos, la altura de las vellosidades intestinales aumenta y la profundidad de las criptas se disminuye rápidamente tras la eclosión, lo que incrementa la superficie de absorción de nutrientes. En este trabajo se encontró que las aves alimentadas con *E. faecium* presentaron mayor desarrollo intestinal reflejado en vellosidades con mayor altura y ancho, y criptas menos profundas (Franz *et al.*, 2011). Las aves alimentadas con la dieta basal presentaron criptas más profundas y más anchas, lo que implica mayor gasto de nutrientes por el alto recambio celular para el mantenimiento de este tejido (Giannenas *et al.*, 2012). Le Bon *et al* (2010) reportaron que la adición de probióticos en el alimento de lechones destetos durante 9 semanas tuvo una influencia positiva sobre la salud e

integridad intestinal, lo cual se vió reflejado en la disminución de los niveles de coliformes a nivel intestinal. Cao et al (2013) evaluaron la inclusion de *E. faecium* en pollos de engorde y encontraron que a nivel intestinal las vellosidades presentaron mayor altura y la profundidad de criptas fue menor, en comparación con el control, esto esta asociado con el aumento en la eficiencia de crecimiento, debido principalmente al aumento en la superficie de absorción de nutrientes; todo lo anterior coincide con lo reportado en este estudio.

Yu et al (2011) reportaron que la adición de probioticos en la alimentacion de ratas aumentó la altura de las vellosidades y el área superficial significativamente; Deng et al (2012) reportaron que gallinas de postura sometidas a estrés calorico presentaban una mejor estructura intestinal (vellosidades mas altas y criptas menos profundas) cuando se incluian en la alimentacion probioticos; Fallah et al (2013) incluyeron en la alimentación de pollos de engorde un probiotico comercial, obteniendo a nivel de yeyuno vellosidades mas altas; lo cual puede favorecer la absorción de nutrientes a nivel intestinal lo cual se ve reflejado en el crecimiento y desarrollo del animal.

Markovic *et al* (2009) reportaron que la adición de probioticos en la alimentación de pollos de engorde proporciona una microflora intestinal mas estable, mejorando las condiciones para la vida util de los enterocitos. Además vellosidades con mayor altura incrementan la superficie de absorción y criptas menos profundas indican una menor renovacion de los tejidos y por consiguiente menor demanda de nutrientes (Awad *et al*, 2009); Al-Fataftah & Abdelqader (2014) encontraron que la inclusion de probióticos en la alimentación de pollos de engorde incrementó la altura de vellosidades y el área de éstas a nivel del duodeno e íleon.

Salim et al (2013) encontraron que la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas en pollos de engorde alimentados con probioticos mejoró en comparación con el control significativamente, aumentando la superficie de absorción del intestino y mejorando la absorción de nutrientes para un optimo crecimiento y desarrollo de los animales. Un intestino sano no sólo tiene efectos positivos sobre la utilización de nutrientes, sino que tambien tiene influencias sobre el estado inmune y por consiguiente sobre la salud general del animal (Rajput et al., 2013; Lee et al., 2014).

### **3.6 CONCLUSIONES**

La inclusión de probióticos como promotores de crecimiento, específicamente *E. faecium*, en la alimentación de pollos de engorde, mejoraron el peso, desarrollo y crecimiento de órganos de importancia digestiva, específicamente intestino, igualmente mejoraron el desarrollo intestinal lo cual se vio reflejado en vellosidades más altas y criptas menos profundas, mejorando la absorción de nutrientes y por consiguiente la salud de los animales. Por lo anterior, los probióticos pueden ser utilizados en la alimentación de aves durante todo el ciclo productivo como reemplazo eficaz y seguro de los antibióticos.

### **3.7 REFERENCIAS**

Acevedo, M. (2012). Técnica de necropsia en aves. In *Mem. Conf. Interna Med. Aprovech. Fauna silv. Exót. Conv.* (pp. 4–15).

Agostini, P. S., Solà-Oriol, D., Nofrarías, M., Barroeta, a. C., Gasa, J., & Manzanilla, E. G. (2012). Role of in-feed clove supplementation on growth performance, intestinal microbiology, and morphology in broiler chicken. *Livestock Science*, *147*(1-3), 113–118. doi:10.1016/j.livsci.2012.04.010

Al-Fataftah, A.-R., & Abdelqader, A. (2014). Effects of dietary *Bacillus subtilis* on heat-stressed broilers performance, intestinal morphology and microflora composition. *Animal Feed Science and Technology*, *198*, 279–285. doi:10.1016/j.anifeedsci.2014.10.012

Alkhalaf, A., Alhaj, M., & Al-Homidan, I. (2010). Influence of probiotic supplementation on blood parameters and growth performance in broiler chickens. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *17*(3), 219–25. doi:10.1016/j.sjbs.2010.04.005

Anwar, H., Rahman, Z., Javed, I., & Muhammad, F. (2012). Efficacy of protein , symbiotic and probiotic supplementation on body performance and organs weight in molted layers. *Pakistan Veterinary Journal*, *33*(1), 117–119.

Awad, W. a, Ghareeb, K., Abdel-Raheem, S., & Böhm, J. (2009). Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poultry Science*, *88*(1), 49–56. doi:10.3382/ps.2008-00244

Cao, G. T., Zeng, X. F., Chen, A. G., Zhou, L., Zhang, L., Xiao, Y. P., & Yang, C. M. (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. *Poultry Science*, *92*, 2949–2955. doi:dx.doi.org/ 10.3382/ps.2013-03366

Chambers, J. R., & Gong, J. (2011). The intestinal microbiota and its modulation for *Salmonella* control in chickens. *Food Research International*, *44*(10), 3149–3159. doi:10.1016/j.foodres.2011.08.017

Cortés, L., & Villamarín, S. (2013). Características morfométricas de órganos linfoides y estudios serológicos en levante de ponedoras utilizando un inmunomodulador , vitaminas y aminoácidos. *Spei Domus*, *9*(18), 29–36.

Cuervo, M., Gómez, C., & Romero, H. (2002). Efecto de la utilización de un suplemento nutricional hidratado en pollos de engorde recién nacidos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, *15*(3), 319–329.

Cunningham, J., & Klein, B. (2009). *Fisiología Veterinaria* (cuarta., p. 718). Barcelona, España: ELSEVIER.

Dolz, R., & Majó, N. (2011). *Atlas de necropsia aviar* (p. 96). Zaragoza, España: Servet.

Fallah, R., Saghafi, M., Rezaei, H., & Parvar, R. (2013). Effect of Bioplus 2B<sup>®</sup> and Protoxin Probiotics Supplementation on Growth Performance , Small Intestinal Morphology and Carcass Characteristics of Broiler Chickens. *British Journal of Poultry Sciences*, *2*(2), 11–15. doi:10.5829/idosi.bjps.2013.2.2.73137

Franz, C. M. a P., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., & Gálvez, A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*, *151*(2), 125–40. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.014

Gaggìa, F., Mattarelli, P., & Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, *141 Suppl* , S15–28. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031

Giannenas, I., Papadopoulos, E., Tsalie, E., Triantafillou, E., Henikl, S., Teichmann, K., & Tontis, D. (2012). Assessment of dietary supplementation with probiotics on performance,

intestinal morphology and microflora of chickens infected with *Eimeria tenella*. *Veterinary Parasitology*, 188(1-2), 31–40. doi:10.1016/j.vetpar.2012.02.017

Huyghebaert, G., Ducatelle, R., & Van Immerseel, F. (2011). An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *The Veterinary Journal*, 187(2), 182–8. doi:10.1016/j.tvjl.2010.03.003

Immerseel, F. V, Eeckhaut, V., Teirlynck, E., Pasmans, F., & Haesebrouck, F. (2006). Mechanisms of action of nutritional tools to control intestinal zoonotic pathogens. *16th European Symposium on Poultry Nutrition*, 243–250.

Jaramillo, A. (2012). Evaluación de la mezcla de un ácido orgánico y un prebiótico en los parámetros productivos y alométricos de pollos de engorde con alimentación controlada. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 5(1), 52–66.

Kalmar, I. D., Vanrompay, D., & Janssens, G. P. J. (2013). Broiler ascites syndrome: collateral damage from efficient feed to meat conversion. *Veterinary Journal*, 197(2), 169–74. doi:10.1016/j.tvjl.2013.03.011

Korver, D. R. (2012). Implications of changing immune function through nutrition in poultry. *Animal Feed Science and Technology*, 173(1-2), 54–64. doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.12.019

Král, M., Angelovičová, M., & Mrázová, L. (2012). Application of Probiotics in Poultry Production. *Animal Science and Biotechnologies*, 45(1), 55–58.

Le Bon, M., Davies, H. E., Glynn, C., Thompson, C., Madden, M., Wiseman, J., ... Mellits, K. H. (2010). Influence of probiotics on gut health in the weaned pig. *Livestock Science*, 133(1-3), 179–181. doi:10.1016/j.livsci.2010.06.058

Lee, S. H., Ingale, S. L., Kim, J. S., Kim, K. H., Lokhande, A., Kim, E. K., ... Chae, B. J. (2014). Effects of dietary supplementation with *Bacillus subtilis* LS 1–2 fermentation biomass on growth performance, nutrient digestibility, cecal microbiota and intestinal morphology of weanling pig. *Animal Feed Science and Technology*, 188, 102–110. doi:10.1016/j.anifeedsci.2013.12.001

Lodemann, U. (2010). Effects of Probiotics on Intestinal Transport and Epithelial Barrier Function. In *Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics* (First edit., pp. 303–333). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-374938-3.00021-9

Markovic, R., Šefer, D., Krstic, M., & Petrujkic, B. (2009). Effect of different growth promoters on broiler performance and gut morphology. *Arch Med Vet*, *41*, 163–169.

Musa, H. H., Wu, S. L., Zhu, C. H., Seri, H. I., & Zhu, G. Q. (2009). The Potential Benefits of Probiotics in Animal Production and Health. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, *8*(2), 313–321.

Oso, a. O., Idowu, O. M. O., Haastrup, a. S., Ajibade, a. J., Olowonefa, K. O., Aluko, a. O., ... Bamgbose, a. M. (2013). Growth performance, apparent nutrient digestibility, caecal fermentation, ileal morphology and caecal microflora of growing rabbits fed diets containing probiotics and prebiotics. *Livestock Science*, *157*(1), 184–190. doi:10.1016/j.livsci.2013.06.017

Placha, I., Simonova, M. P., Cobanova, K., Laukova, a, & Faix, S. (2010). Effect of *Enterococcus faecium* AL41 and *Thymus vulgaris* essential oil on small intestine integrity and antioxidative status of laying hens. *Research in Veterinary Science*, *89*(2), 257–61. doi:10.1016/j.rvsc.2010.03.006

Plaza, J., Gomez, C., Fontana, L., & Gil, A. (2014). Modulation of immunity and inflammatory gene expression in the gut, in inflammatory diseases of the gut and in the liver by probiotics. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(42), 15632–15649. doi:10.3748/wjg.v20.i42.15632

Quigley, E. M. M. (2010). Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacological Research*, *61*(3), 213–8. doi:10.1016/j.phrs.2010.01.004

Rajput, I. R., Li, L. Y., Xin, X., Wu, B. B., Juan, Z. L., Cui, Z. W., ... Li, W. F. (2013). Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on intestinal ultrastructure modulation and mucosal immunity development mechanism in broiler chickens. *Poultry Science*, *92*, 956–965. doi:dx.doi.org/ 10.3382/ps.2012-02845

Salim, H. M., Kang, H. K., Akter, N., Kim, D. W., Kim, J. H., Kim, M. J., ... Kim, W. K. (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. *Poultry Science*, *92*(8), 2084–90. doi:10.3382/ps.2012-02947

Schokker, D. (2012). *Chicken intestinal development in health and disease*. Wageningen University.

Sharma, P., Tomar, S. K., Goswami, P., Sangwan, V., & Singh, R. (2014). Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food Research International*, *57*, 176–195. doi:10.1016/j.foodres.2014.01.025

Svihus, B. (2011). La molleja: influencia de la estructura de la dieta y efectos sobre la disponibilidad de nutrientes. *World Poultry Science Journal*, *67*(2), 1–11.

Yu, X.-Y., Yin, H.-H., & Zhu, J.-C. (2011). Increased gut absorptive capacity in rats with severe head injury after feeding with probiotics. *Nutrition*, *27*(1), 100–7. doi:10.1016/j.nut.2010.01.010

## 4. Efecto de cepas probióticas (*L. Acidophilus*, *L. casei* y *E. faecium*) sobre el crecimiento de órganos linfoides, pH intestinal y la producción de anticuerpos vacunales.

### 4.1 RESUMEN

Las aves se enfrentan diariamente a agentes patógenos que podrían desencadenar problemas a nivel intestinal y ocasionar que el sistema inmune no responda de manera efectiva. Los probióticos, pueden mejorar los mecanismos de defensa naturales a través de la modulación de la microbiota intestinal, la cual desempeña un papel crítico en el mantenimiento de la salud del hospedero. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de diferentes cepas probióticas sobre el sistema inmune de pollos de engorde. Se utilizaron 200 pollos machos (Cobb) de un día de edad a los cuales se les realizó análisis alométrico de órganos linfoides, pH intestinal y título de anticuerpos contra gumboro los días: 7, 14, 21, 28, 35 y 42. Las aves fueron alimentadas con dos dietas: dieta basal con y sin la adición de antibiótico. Los diferentes probióticos (*L. casei*, *L. acidophilus* ó *E. faecium*) se suministraron en el agua de bebida de los animales que consumieron la dieta basal sin antibiótico garantizando una concentración de  $10^7$ UFC/mL. El diseño estadístico utilizado fue de bloques al azar en arreglo de parcelas divididas. La inclusión de probióticos, específicamente de *E. faecium*, ayudaron a mantener un pH intestinal más bajo, un título mayor de anticuerpos post-vacunales contra gumboro y mayor peso de los órganos linfoides. Por lo anterior los probióticos pueden ser un reemplazo eficaz, seguro y rentable de los antibióticos durante todo el ciclo de producción del ave, llevando a un mejoramiento del sistema inmune del ave.

**Palabras Clave:** aditivos, aves de corral, broiler, bacterias ácido lácticas, promotores de crecimiento.

### 4.2 INTRODUCCIÓN

La avicultura es una actividad que ha crecido drásticamente alcanzando grandes avances en las últimas décadas (Stewart *et al.*, 2013). La selección genética para aumentar la ganancia de peso ha mejorado la conversión de alimento, sin embargo el desarrollo de

órganos y tejidos relacionados a la respuesta inmunológica ha resultado perjudicado (Korver, 2012; Ohimain & Ofongo, 2012).

El epitelio intestinal, junto con el moco, proporcionan la primera barrera de defensa sensorial mediada por un transporte activo entre las bacterias nativas, patógenos y otros antígenos. Las bacterias pertenecientes a la microbiota intestinal pueden ejercer una doble función, la estimulación de los mecanismos de defensa de la mucosa y el mantenimiento de la homeostasis de la respuesta inmune. La microbiota intestinal, con sus funciones metabólicas, tróficas y de protección, es capaz de afectar positivamente la integridad de la barrera intestinal (Gaggia *et al.*, 2010; Chambers & Gong, 2011). Cambios en el pH intestinal pueden tener un efecto sobre las poblaciones bacterianas benéficas y a su vez repercutir sobre la digestibilidad y absorción de nutrientes a nivel intestinal (Lutful, 2009).

Las enfermedades virales tienen un impacto económico y social importante, no solo por las pérdidas directas sino también por las pérdidas indirectas como consecuencia de la inmunosupresión de los animales. Entre estas se encuentra la enfermedad de Gumboro, también conocida como Enfermedad Infecciosa de la Bursa (IBD), la cual es altamente infecciosa en pollos jóvenes, y se caracteriza por la destrucción de los órganos linfoides, y, en particular, la bolsa de Fabricio. La célula blanco es el linfocito B en una etapa inmadura, y la infección causa inmunosupresión, y en la mayoría de los casos es difícil de determinar (Ingrao *et al.*, 2013).

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de los nutricionistas debe ser el de aumentar la resistencia a las enfermedades en animales; es decir, promover un nivel adecuado de respuesta inmune para que las aves ganen los desafíos sanitarios lo más rápidamente posible, reduciendo el uso masivo de antibióticos como promotores de crecimiento (APC) sin perjudicar el desarrollo productivo, ya que el uso de estos en dosis subterapéuticas, no sólo influyen en las poblaciones microbianas intestinales y sus actividades, sino que además afectan el metabolismo de los animales y alteran específicamente la función intestinal (Huyghebaert *et al.*, 2011).

La preocupación mundial sobre el desarrollo de la resistencia a los antimicrobianos y sobre la transferencia de genes de resistencia a los antibióticos de los animales a la microbiota humana, condujo a la prohibición del uso de antibióticos como promotores del crecimiento en la Unión Europea desde el 1 de enero 2006 (Gaggia *et al.*, 2010; Huyghebaert *et al.*, 2011), lo que ha llevado a que se utilicen aditivos microbianos, como los probióticos, que influyen de manera positiva sobre el rendimiento y bienestar de las

aves, mejorando los mecanismos de defensa naturales a través de la modulación de la microbiota intestinal, la cual desempeña un papel crítico en el mantenimiento de la salud del hospedero (Tellez *et al.*, 2012). Los probióticos pueden prevenir la adherencia, establecimiento, replicación y/o acción de bacterias patógenas, modificando el pH del lumen intestinal, debido a la producción de ácidos orgánicos principalmente lactato (Lutful, 2009; Gaggia *et al.*, 2010).

Por lo anterior, El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes cepas probióticas sobre el tamaño de órganos linfoides, pH intestinal y título de anticuerpos post-vacunales contra gumboro en pollos de engorde.

## **4.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.3.1 Localización**

El trabajo de campo se realizó en la granja avícola comercial, Los Andes, dedicada a la producción de pollos de engorde, ubicada en el municipio de Girardota, vereda “El Totumo”, localizado a 1425 msnm, con una temperatura promedio de 22°C, correspondiendo a una zona de vida bosque húmedo premontano (bh-PM).

### **4.3.2 Animales**

Se utilizaron 200 pollos machos de un día de edad de la línea comercial Cobb obtenidos de una casa comercial, con un peso promedio inicial de 45,65 gramos. El período experimental tuvo una duración de 42 días. La cría se realizó siguiendo los procedimientos comerciales establecidos en la granja.

### **4.3.3 Instalaciones y Equipos**

Los pollos fueron alojados dentro de un galpón comercial con piso de cemento y con cama de viruta de madera, en el cual se realizaron las divisiones para los tratamientos utilizando cartón plast. Cada división tuvo una medida de 1.0 x 1.2 metros, además de comedero y bebedero independiente. Durante la primera y segunda semana se utilizaron comederos de bandeja, posteriormente se cambió a comedero de tolva. Durante todo el experimento se utilizaron bebederos de volteo de 3 Lt de capacidad, y el agua se suministraba dos veces al día. Para mantener la temperatura homogénea durante las primeras semanas se utilizaron criadoras a gas, y posteriormente cortinas alrededor del galpón para controlar la temperatura, humedad y entrada-salida de corrientes de aire. Para realizar el pesaje de los pollos y el alimento suministrado se utilizó una balanza digital.

#### **4.3.4 Manejo Sanitario**

Para el recibimiento de los pollos, se realizó lavado, limpieza y desinfección del galpón, cortinas, comederos y bebederos; además, se hizo el control de roedores e insectos con productos obtenidos en casas comerciales. Las criadoras se encendieron cinco horas antes de la llegada de los animales.

#### **4.3.5 Dietas**

Los animales se alimentaron con una dieta formulada de acuerdo con los requerimientos nutricionales establecidos por Rostagno (2011).

D1: Alimento comercial sin probiótico y sin antibiótico

D2: Alimento comercial + antibiótico (como APC)

D3: Alimento comercial sin antibiótico + *L. acidophilus*

D4: Alimento comercial sin antibiótico + *L. casei*

D5: Alimento comercial sin antibiótico + *E. faecium*.

Se elaboraron 2 dietas (Tabla 1), una para la etapa de iniciación (día 1 al 21), y la otra para la etapa de finalización (día 22 al 42).

Los probióticos fueron suministrados en el agua de bebida, la cantidad de probiótico adicionado (relación v/p) fue proporcional a 1 gr de probiótico por cada 20 Lt de agua, siguiendo las instrucciones para su preparación y adición según lo recomendado por el fabricante. La concentración de probióticos viables que se considera que debe llegar al intestino para producir un efecto beneficioso es de  $\geq 10^6$  UFC/mL, por tal motivo se utilizó en promedio  $10^7$  UFC/mL (Sharma *et al.*, 2014). No fue de interés modificar la dieta, sino la incorporación eficiente de los probióticos como una alternativa al uso de APC.

#### **4.3.6 Eutanasias humanitarias y toma de muestras órganos**

Durante la fase experimental se realizó eutanasia humanitaria a 65 aves de la siguiente forma: El día inicial, o Día 1, se sacrificaron 5 aves que representaron el grupo de referencia para verificar el estado general de salud y la evaluación macroscópica del estado de los órganos antes de suministrar las dietas experimentales. Durante la fase de eutanasias escalonadas se sacrificaron 90 aves de la siguiente forma: los días 7, 14, 21, 28, 35 y 42 se sacrificaron 10 aves/día (dos aves por tratamiento). Los animales se sedaron por inhalación con Nitrox<sup>®</sup> y posteriormente se les realizó eutanasia humanitaria con dióxido de carbono durante 3 minutos. Todas las aves fueron sacrificadas 2.5 horas después de su última comida.

Después del sacrificio, las aves se pusieron en posición ventral boca arriba, separando los miembros posteriores y extendiendo las alas lateralmente; luego se realizó un corte que iba desde la parte anterior del cuello hasta la cloaca, intentando cortar solo la piel. Las aves no tienen cavidad torácica y abdominal, sino una sola cavidad interna denominada cavidad celómica, donde se encuentran la mayoría de los órganos vitales. Para la apertura de la cavidad celómica se realizó un corte con las tijeras en la zona que se encuentra por debajo de la pechuga. Se realizaron dos pequeños cortes laterales hasta llegar a las costillas, y luego un corte de las costillas en dirección craneal. En este instante se evaluó la presencia de exudados diversos y el estado de sacos aéreos (Dolz & Majó, 2011).

Los órganos de la cavidad celómica se extrajeron conjuntamente. El corazón se removió cortando con una tijera en la base a nivel de los grandes vasos, y separado de los pulmones. Se retiró el tracto gastrointestinal con el hígado y el bazo. El bazo se localiza dorsalmente entre la molleja y el proventrículo, es de color café rojizo y su forma varía entre redondo y ovalado. El proventrículo y la molleja, se separan del intestino y se abrieron con tijera examinando el contenido y la mucosa. El intestino de las aves se divide en intestino delgado e intestino grueso; el intestino delgado empieza con la curvatura duodenal hasta el ciego, que marca la unión del intestino delgado con el grueso, se tomaron 20 cms de todas las porciones del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon); se tomó una muestra del páncreas que se encuentra adherido al mesenterio duodenal. Después de retirados todos los órganos, se extrajeron los pulmones que se encuentran in situ en la pared dorsal del tórax y finalmente los riñones que se encuentran adheridos a la carcasa (Acevedo, 2012). Todos los órganos extraídos fueron lavados con solución salina fría, y luego fueron pesados para los análisis alométricos.

Los pesos de los órganos fueron convertidos a porcentaje de peso vivo (%PV) por medio de la fórmula:

$$\%PV = \frac{\text{Peso \acute{o}rgano} \times 100}{\text{Peso promedio/ave}}$$

Para determinar la ontogénesis del crecimiento de los diferentes órganos y su relación con el peso corporal, se utilizó la constante de Crecimiento Alométrico (CA), según la siguiente ecuación:

$$CA = \frac{O_n/O_h}{P_n/P_h}$$

Donde: O= peso del órgano; n= días después del nacimiento; h= peso al nacimiento y PC= peso corporal.

Cuando el órgano crece en la misma proporción al peso corporal, CA es de 1; si el crecimiento del órgano es menor al peso corporal, CA es menor a 1; y cuando CA es mayor a 1, hay un crecimiento rápido en relación con la ganancia total de peso corporal (Cortés & Villamarin, 2013; Jaramillo, 2012).

#### **4.3.7 Toma de muestra y determinación del pH intestinal**

Para la determinación del pH intestinal se tomó 1 g de muestra (mezcla) de contenido de duodeno, yeyuno, íleon y ciegos, para luego suspenderlo en 12,5 ml de agua destilada desionizada. Esta mezcla se agitó manualmente con agitador de vidrio lavándolo después de cada registro con agua destilada. Posteriormente se insertó en la mezcla un electrodo de pH y se realizaron las lecturas en un potenciómetro con precisión de tres decimales. El pH de la suspensión fue medido dentro de los 45 minutos subsiguientes al sacrificio de las aves (Jaramillo, 2012).

#### **4.3.8 Toma de muestra y determinación de títulos de anticuerpos post-vacunales**

Después del sacrificio con nitrox y CO<sub>2</sub> de cada ave, se tomó una muestra de sangre (3 ml aprox) de cada animal decapitándolo para facilitar su extracción, ésta fue almacenada en tubos de ensayos tapa roja debidamente identificados, e inmediatamente centrifugada para separar el suero. La muestra fue almacenada a -70°C hasta la realización de los análisis de laboratorio, en el Laboratorio comercial BIOARA, de la ciudad de Bogotá (títulos de anticuerpos post-vacunales contra gumboro).

#### **4.3.9 Diseño estadístico**

El experimento se realizó según un diseño bloques al azar en un arreglo de parcelas divididas, donde los animales fueron aleatorizados a cada uno de los tratamientos (5 dietas por 6 períodos de evaluación), y cada tratamiento tuvo un total de 2 repeticiones. El análisis estadístico fue desarrollado usando el procedimiento GLM del SAS (2007).

#### **4.3.10 Consideraciones éticas**

Esta investigación fue avalada por El Comité de Ética en la Experimentación Animal de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín (CEMED 045 del 10 de junio de 2014).

#### 4.4 RESULTADOS

En general las aves que consumieron los diferentes tratamientos presentaron un buen estado de salud, y no presentaron síntoma alguno de enfermedad que causara su retiro y/o sacrificio inmediato. Además al nivel en que se fijó el suministro diario de alimento no hubo sobrantes.

En este experimento no se encontró interacción estadística entre las diferentes dietas y los días de sacrificio para ninguna de las variables en estudio, por lo que no fue necesario analizar y desglosar dichos factores de manera independiente.

Tabla 8: pH intestinal, peso (%PV) y crecimiento alométrico de órganos linfoides, y títulos de anticuerpos post-vacunales de pollos que consumieron dietas con cepas probióticas ( <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> y <i>E. faecium</i> ) durante 42 días.							
Órgano		Dietas					EEM
		D1	D2	D3	D4	D5	
Bursa	(%)PV	0,13 <sup>A</sup>	0,13 <sup>A</sup>	0,14 <sup>A</sup>	0,14 <sup>A</sup>	0,15A <sup>B</sup>	0.003
	CA	0,16 <sup>A</sup>	0,15 <sup>A</sup>	0,15 <sup>A</sup>	0,17A <sup>B</sup>	0,18B <sup>C</sup>	
Bazo	(%)PV	0,15 <sup>A</sup>	0,14 <sup>A</sup>	0,15 <sup>A</sup>	0,15 <sup>A</sup>	0,16A <sup>B</sup>	0.002
	CA	0,16 <sup>A</sup>	0,16 <sup>A</sup>	0,17A <sup>B</sup>	0,18B <sup>C</sup>	0,19C <sup>D</sup>	
Timo	(%)PV	0,25 <sup>A</sup>	0,26 <sup>A</sup>	0,25 <sup>A</sup>	0,27 <sup>A</sup>	0,29A <sup>B</sup>	0.004
	CA	0,32 <sup>A</sup>	0,34 <sup>A</sup>	0,32 <sup>A</sup>	0,36A <sup>B</sup>	0,38B <sup>C</sup>	
pH intestinal		6,21 <sup>A</sup>	6,18 <sup>A</sup>	6,19A <sup>B</sup>	6,02 <sup>C</sup>	5,98 <sup>C</sup>	0.005
Anticuerpos post-Vacunales		295,29 <sup>A</sup>	265,98 <sup>A</sup>	325,25 <sup>A</sup>	444,94A <sup>B</sup>	655,07 <sup>C</sup>	8,19

D1: Alimento comercial sin probiótico y Sin antibiótico; D2: Alimento comercial + antibiótico; D3: Alimento comercial sin antibiótico + *L. acidophilus*; D4: Alimento comercial sin antibiótico + *L. casei*; D5: Alimento comercial sin antibiótico + *E. faecium*.

$$\%PV = \frac{\text{Peso \acute{o}rgano} \times 100}{\text{Peso promedio/ave}}$$

CA= (On / Oh) / ( PCn / PCh); Donde: O= peso del \acute{o}rgano; n= d\iacuteas despu\es del nacimiento; h= peso al nacimiento y PC= peso corporal. CA<1: crecimiento lento con relaci\on al peso corporal. CA=1: crecimiento proporcional con relaci\on al peso corporal. CA>1: crecimiento r\apido con relaci\on al peso corporal

<sup>A,B,C,D</sup> Dentro de una misma fila medias con un super\iacutendice com\un no difieren estad\isticamente (P < 0.05).

EEM: Error est\andar de la media.

No se presentaron diferencias significativas entre D1 y D2 para la variable crecimiento alométrico de bursa, bazo y timo (tabla 8); se presentaron diferencias significativas ( $P<0,05$ ) para D5, las aves que recibieron esta dieta presentaron los mayores valores. No obstante, bursa, bazo y timo presentaron un crecimiento lento ( $CA<1$ ) con relación al peso corporal en todas las dietas. Para la variable pH intestinal, las aves que consumieron D5 presentaron un menor valor en comparación con los demás tratamientos, donde los animales que consumieron D1 y D2 presentaron los mayores valores ( $P<0,05$ ). Para la producción de títulos de anticuerpos post-vacunales contra gumboro no se presentaron diferencias significativas entre D1 y D2, las cuales presentaron valores mucho más bajos y significativamente diferentes en los títulos de anticuerpos, comparados con las dietas que recibieron probióticos ( $P<0,05$ ). Las aves que recibieron D5 presentaron los mayores títulos ( $P<0,05$ ; Tabla 8).

Para el análisis del peso de los órganos linfoides (%PV) se presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $P<0,05$ ), obteniéndose que durante la primera semana de vida se alcanza un desarrollo rápido de los órganos. No obstante, bursa y el bazo después del día 7 comienzan a disminuir su crecimiento alcanzando su mínimo peso en el día 42; por el contrario, el timo sigue creciendo y se reporta su mayor peso en el día 42 (Tabla 9). En el análisis alométrico de los órganos linfoides se presentaron diferencias significativas ( $P<0,05$ ), encontrándose que bursa y bazo presentan un mayor crecimiento en el día 7, a diferencia del timo que presenta un mayor crecimiento en el día 42. Todos los órganos presentan un crecimiento lento ( $CA<1$ ) en relación con el peso corporal en los diferentes períodos de tiempo. El pH intestinal de las aves alimentadas con cepas probióticas durante los diferentes períodos de evaluación presentó diferencias significativas ( $P<0,05$ ), encontrándose que en el día 7 las aves presentaron el mayor pH intestinal, en comparación con los días 35 y 42 donde se registraron los pH intestinales más bajos ( $P<0,05$ ; Tabla 9). Para la producción de anticuerpos post-vacunales contra gumboro durante los diferentes periodos evaluados, se presentaron diferencias significativas ( $P<0,05$ ), donde la mayor producción de anticuerpos se observó el día 42.

Tabla 9: pH intestinal, peso (%PV) y crecimiento alométrico de órganos linfoides, y títulos de anticuerpos post-vacunales de pollos que consumieron dietas con cepas probióticas (*L. acidophilus*, *L. casei* y *E. faecium*) durante diferentes períodos de tiempo

Órgano		Dietas						EEM
		7	14	21	28	35	42	
Bursa	(%)PV	0,49 <sup>A</sup>	0,29 <sup>B</sup>	0,26 <sup>C</sup>	0,21 <sup>D</sup>	0,09 <sup>E</sup>	0,09 <sup>E</sup>	0,003 <sup>E</sup>
	CA		0,40 <sup>A</sup>	0,23 <sup>B</sup>	0,22 <sup>C</sup>	0,08 <sup>D</sup>	0,07 <sup>D</sup>	
Bazo	(%)PV	0,49 <sup>A</sup>	0,29 <sup>B</sup>	0,21 <sup>C</sup>	0,19 <sup>D</sup>	0,17 <sup>E</sup>	0,12 <sup>F</sup>	0,002
	CA		0,40 <sup>A</sup>	0,20 <sup>B</sup>	0,16 <sup>C</sup>	0,16 <sup>C</sup>	0,14 <sup>C</sup>	
Timo	(%)PV	0,49 <sup>A</sup>	0,33 <sup>B</sup>	0,21 <sup>C</sup>	0,31 <sup>D</sup>	0,40 <sup>E</sup>	0,74 <sup>F</sup>	0,004
	CA		0,46 <sup>A</sup>	0,23 <sup>B</sup>	0,26 <sup>C</sup>	0,32 <sup>D</sup>	0,57 <sup>E</sup>	
pH intestinal		6,54 <sup>A</sup>	6,17 <sup>B</sup>	6,12 <sup>C</sup>	ND	5,90 <sup>D</sup>	5,90 <sup>D</sup>	0,005
Anticuerpos Post-Vacunales		ND	266,59 <sup>A</sup>	ND	55,49 <sup>B</sup>	ND	3587,62 <sup>C</sup>	8,19

$$\%PV = \frac{\text{Peso \acute{o}rgano} \times 100}{\text{Peso promedio/ave}}$$

CA= (On / Oh) / ( Pcn / PCh); Donde: O= peso del \acute{o}rgano; n= d\iacuteas despu\es del nacimiento; h= peso al nacimiento y PC= peso corporal. CA<1: crecimiento lento con relaci\on al peso corporal. CA=1: crecimiento proporcional con relaci\on al peso corporal. CA>1: crecimiento r\apido con relaci\on al peso corporal

<sup>A,B,C,D</sup> Dentro de una misma fila medias con un super\ndice com\un no difieren estad\sticamente (P < 0.05).

ND: No determinado

EEM: Error est\andar de la media.

#### 4.5 DISCUSI\ON

El timo es el principal \acute{o}rgano linfoide en las aves, es el lugar donde se maduran principalmente los linfocitos T y peque\as cantidades de c\elulas B. La bolsa de Fabricio es el sitio principal de maduraci\on de linfocitos B para la s\ntesis de inmunoglobulinas. El bazo tambi\en se considera un \acute{o}rgano linfoide esencial que juega un papel importante en la inmunidad mediada por c\elulas, por ejemplo, su funci\on en el desarrollo de las c\elulas T supresoras (He *et al.*, 2013).

Durante la evaluaci\on, el crecimiento de la Bursa present\o un descenso en el peso, lo que coincide con lo reportado por Perozo *et al.*, (2004), donde encontraron que la disminuci\on de este \acute{o}rgano fue inducida por atrofia tisular normal. Un tama\o y peso adecuado del

Timo es un indicador sensible del estado de salud así como de la respuesta tanto aguda como crónica a situaciones de estrés, ya que el timo responde con atrofia tisular a la presencia de glucocorticoides y factores estresantes (Perozo *et al.*, 2004). El peso del Timo tuvo un crecimiento constante a lo largo de los diferentes períodos de tiempo evaluados, y presentó su peso máximo el día 42, indicando que los animales se encontraban en una zona de confort tolerable por ellos (Perozo *et al.*, 2004; Li, Zhao, & Wang, 2009; Cortés & Villamarin, 2013). El aumento del tamaño de estos órganos, especialmente de la bursa la cual contiene numerosos folículos linfoides en los que se concentran las células linfocitarias que participan en la respuesta inmunitaria como los linfocitos B, y del timo en el que se encuentran los linfocitos T, permiten una mejor respuesta inmune (He *et al.*, 2013; Rajput *et al.*, 2013).

El uso de probióticos tiene ventajas considerables en comparación con los aditivos antibacterianos, no inducen resistencia a los antibióticos, no son tóxicos y por tanto no producen efectos secundarios indeseables cuando son utilizados en la alimentación; además, en el caso de animales destinados al consumo, no se producen residuos tóxicos en la canal (Gaggia *et al.*, 2010). Las aves que consumieron D5 (*E. faecium*) presentaron un pH más bajo en comparación con los demás tratamientos, debido principalmente a que estos microorganismos crecen rápidamente en el intestino, y provocan un descenso del pH que funciona como un antiséptico del sistema digestivo, y al mismo tiempo minimiza la proliferación de microorganismos patógenos al competir por nutrientes y espacio en las paredes intestinales (Franz *et al.*, 2011). La disminución en el pH intestinal se produce debido a la fermentación por parte de la microbiota, la cual aumenta la producción de ácidos grasos e cadena corta (Abdelqader *et al.*, 2013).

Los probióticos en el organismo de un animal sano pueden estimular la respuesta inmune no específica y mejorar la protección inmune; además, pueden mejorar los niveles de IgA a nivel intestinal, lo que repercute en un efecto positivo sobre el crecimiento, la producción y la capacidad de resistencia a las enfermedades (Musa *et al.*, 2009; He *et al.*, 2013; Rajput *et al.*, 2013; Butel, 2014). Los títulos de anticuerpos vacunales contra gumboro presentaron diferencias según el tipo de dieta que consumieron las aves, donde las que consumieron D5 (*E. faecium*) presentaron un mayor título de anticuerpos contra gumboro, demostrando que el uso de inmunomoduladores, en este caso bacterias ácido lácticas ayuda al desarrollo y maduración del sistema inmune, incrementando la producción de anticuerpos (Machado & Jurado, 2013). En este trabajo los títulos de anticuerpos vacunales contra gumboro presentaron un descenso entre el día 14 y 28 (tabla 9) a pesar de las vacunaciones en incubadora y en campo. Este fenómeno puede explicarse como la consecuencia de la interferencia de los anticuerpos maternos con la

respuesta inmune a la vacunación, ya que la inmunidad pasiva genera una incapacidad de la progenie de responder adecuadamente a las vacunaciones (Perozo *et al.*, 2004).

Stringfellow *et al* (2011) reportaron que el suministro de probióticos en el agua de bebida de pollos de engorde mejoraron los títulos de anticuerpos post-vacunales, debido a que las bacterias probióticas activan el sistema inmune de la mucosa a través de la estimulación de las células presentadoras de antígeno para promover la protección. La administración de probióticos puede ofrecer una mayor protección en el momento de la vacunación o tener un efecto adyuvante modulando el sistema inmune del hospedero. Salim *et al* (2013) reportaron que se presentó mayor cantidad de anticuerpos en pollos alimentados con probióticos en comparación con el control debido a que los probióticos aumentan la respuesta humoral, mejorando la función inmune y promoviendo a la síntesis de péptidos antimicrobianos endógenos en el intestino, los que se ve reflejado en animales más sanos.

#### **4.6 CONCLUSIONES**

La inclusión de probióticos como promotores de crecimiento, específicamente *L. acidophilus* y *E. faecium*, en la alimentación de pollos de engorde, influyeron en el peso de órganos linfoides, lo cual se vio reflejado en la mayor producción de anticuerpos post-vacunales, favoreciendo la salud del animal, y a su vez, influyendo de manera positiva sobre el bienestar y rendimiento de las aves. Por lo anterior los probióticos pueden ser un reemplazo eficaz y seguro de los antibióticos cuando se adicionan en la alimentación de aves.

#### **4.7 REFERENCIAS**

Abdelqader, A., Al-Fataftah, A.-R., & Daş, G. (2013). Effects of dietary *Bacillus subtilis* and inulin supplementation on performance, eggshell quality, intestinal morphology and microflora composition of laying hens in the late phase of production. *Animal Feed Science and Technology*, 179(1-4), 103–111. doi:10.1016/j.anifeedsci.2012.11.003

Acevedo, M. (2012). Técnica de necropsia en aves. In *Mem. Conf. Interna Med. Aprovech. Fauna silv. Exót. Conv.* (pp. 4–15).

Butel, M. . (2014). Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 44(1), 1–8. doi:10.1016/j.medmal.2013.10.002

Chambers, J. R., & Gong, J. (2011). The intestinal microbiota and its modulation for Salmonella control in chickens. *Food Research International*, 44(10), 3149–3159. doi:10.1016/j.foodres.2011.08.017

Cortés, L., & Villamarin, S. (2013). Características morfométricas de órganos linfoides y estudios serológicos en levante de ponedoras utilizando un inmunomodulador , vitaminas y aminoácidos. *Spei Domus*, 9(18), 29–36.

Dolz, R., & Majó, N. (2011). *Atlas de necropsia aviar* (p. 96). Zaragoza, España: Servet.

Franz, C. M. a P., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., & Gálvez, A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 151(2), 125–40. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.014

Gaggìa, F., Mattarelli, P., & Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, 141 Suppl , S15–28. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031

He, J., Zhang, K. Y., Chen, D. W., Ding, X. M., Feng, G. D., & Ao, X. (2013). Effects of vitamin E and selenium yeast on growth performance and immune function in ducks fed maize naturally contaminated with aflatoxin B1. *Livestock Science*, 152(2-3), 200–207. doi:10.1016/j.livsci.2012.12.018

Huyghebaert, G., Ducatelle, R., & Van Immerseel, F. (2011). An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *The Veterinary Journal*, 187(2), 182–8. doi:10.1016/j.tvjl.2010.03.003

Ingrao, F., Rauw, F., Lambrecht, B., & van den Berg, T. (2013). Infectious Bursal Disease: a complex host-pathogen interaction. *Developmental and Comparative Immunology*, 41(3), 429–38. doi:10.1016/j.dci.2013.03.017

Jaramillo, A. (2012). Evaluación de la mezcla de un ácido orgánico y un prebiótico en los parámetros productivos y alométricos de pollos de engorde con alimentación controlada. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 5(1), 52–66.

Korver, D. R. (2012). Implications of changing immune function through nutrition in poultry. *Animal Feed Science and Technology*, 173(1-2), 54–64. doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.12.019

Li, S. P., Zhao, X. J., & Wang, J. Y. (2009). Synergy of Astragalus polysaccharides and probiotics (*Lactobacillus* and *Bacillus cereus*) on immunity and intestinal microbiota in chicks. *Poultry Science*, 88(3), 519–25. doi:10.3382/ps.2008-00365

Lutful, S. M. (2009). The role of probiotics in the poultry industry. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(8), 3531–46. doi:10.3390/ijms10083531

Machado, L. S. C., & Jurado, S. C. V. (2013). Características morfológicas de órganos linfoides y estudios serológicos en levante de ponedoras utilizando un inmunomodulador, vitaminas y aminoácidos. *Spei Domus*, 9(18), 29–36.

Musa, H. H., Wu, S. L., Zhu, C. H., Seri, H. I., & Zhu, G. Q. (2009). The Potential Benefits of Probiotics in Animal Production and Health. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8(2), 313–321.

Ohimain, E., & Ofongo, R. (2012). The Effect of Probiotic and Prebiotic Feed Supplementation on Chicken Health and Gut Microflora: A Review. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 4(2), 135–143.

Perozo, F., Nava, J., Mavárez, Y., Arenas, E., Serje, P., & Briceño, M. (2004). Caracterización morfológica de los órganos linfoides en pollos de engorde de la línea ross criados bajo condiciones de campo en el estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica*, 14(3), 1–18.

Rajput, I. R., Li, L. Y., Xin, X., Wu, B. B., Juan, Z. L., Cui, Z. W., ... Li, W. F. (2013). Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on intestinal ultrastructure modulation and mucosal immunity development mechanism in broiler chickens. *Poultry Science*, 92, 956–965. doi:dx.doi.org/ 10.3382/ps.2012-02845

Salim, H. M., Kang, H. K., Akter, N., Kim, D. W., Kim, J. H., Kim, M. J., ... Kim, W. K. (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. *Poultry Science*, 92(8), 2084–90. doi:10.3382/ps.2012-02947

Sharma, P., Tomar, S. K., Goswami, P., Sangwan, V., & Singh, R. (2014). Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food Research International*, *57*, 176–195. doi:10.1016/j.foodres.2014.01.025

Stewart, C. R., Keyburn, A. L., Deffrasnes, C., & Tompkins, S. M. (2013). Potential directions for chicken immunology research. *Developmental and Comparative Immunology*, *41*(3), 463–8. doi:10.1016/j.dci.2013.05.011

Stringfellow, K., Caldwell, D., Lee, J., Mohnl, M., Beltran, R., Schatzmayr, G., ... Farnell, M. (2011). Evaluation of probiotic administration on the immune response of coccidiosis-vaccinated broilers. *Poultry Science*, *90*(8), 1652–8. doi:10.3382/ps.2010-01026

Tellez, G., Pixley, C., Wolfenden, R. E., Layton, S. L., & Hargis, B. M. (2012). Probiotics/direct fed microbials for Salmonella control in poultry. *Food Research International*, *45*(2), 628–633. doi:10.1016/j.foodres.2011.03.047