



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Ciencias

Adición de *Lactobacillus farciminis* (probiótico) en la dieta de pollos de engorda (*Gallus gallus*) en desafío con una cepa de *Salmonella paratyphi*

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

Sebastian Laerzio Lara Calvario

ASESORES:

Dr. Abdel Fattah Zeidan Mohamed Salem

M. en. S.A. Roberto Vilchis Mendoza

TOLUCA, MÉXICO, JULIO 2017

Agradecimientos.

A una fuerza que influye en los aprendizajes de la vida y a la fe de culminar las cosas con un bien, que para mí lo llamo Dios.

A mi mamá, María Cristina Calvario y Pastrana que siempre al sentirme derrotado me daba ánimos para continuar mis estudios y por su gran amor de madre.

A mi papá Ing. Luis Lara Aguilar que siempre me dio la seguridad para culminar mis estudios y por ser ejemplo de profesionalismo para mí.

A mi hermano Luis Lara Calvario quien me compro mi primera casa de acampar y me mostró el mundo natural, refrendando mi interés por la profesión que elegí como forma de vida.

Al Dr. Juan Carlos Vázquez Chagoyan que me abrió las puertas del CIESA, facilitándome los recursos para la realización de ésta tesis así como brindarme sus enseñanzas, su gran humanismo y tenerme paciencia para culminar este trabajo de investigación.

Al M en S.A. Roberto Vilchis Mendoza quien con su profesionalismo y paciencia al guiarme al cuidado de las aves así como enseñarme los métodos que se debe de realizar en las necropsias y darme apoyo incondicional para culminar la tesis.

A la Dra. Petra Sánchez Nava, quien además de ser mi profesora durante mi formación académica por lo cual estoy muy agradecido de sus enseñanzas, también a su contribución con la realización de las mediciones de las vellosidades facilitándome su microscopio y su software especializado.

Al Dr. Abdel Fattah Zeidan Mohamed Salem por facilitar sus instalaciones y reactivos en el laboratorio de Bromatología.

A mi esposa María de la Luz Pineda Torres quien camino con migo en las buenas y en las malas en este trayecto de mi vida.

A mi hija Sofía Nirvana Lara Pineda quien es mi motor para nunca dejarme caer en esta vida.

A todos mis profesores de la facultad de ciencias quienes me infundieron el amor por la Biología.

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue evaluar la salud intestinal en pollos bajo la adición a su dieta de un probiótico proporcionado por la empresa SAFISIS (Es una empresa de biotecnología especializada en el desarrollo de ingredientes naturales a través de medios microbiológicos para la Industria de alimentos y bebidas, así como para los mercados nutracéuticos y farmacéuticos), un lactobacilo de la especie *Lactobacillus farciminis* y desafiados con una cepa de *Salmonella paratyphi*. Se usaron un total de 120 pollos de 3 días de nacidos, los cuales fueron divididos en cuatro grupos: el primer grupo fue el grupo testigo (alimento sin *Lactobacillus farciminis* ni infectado con *Salmonella paratyphi*), el segundo grupo fue control infectado (Con la cepa de *Salmonella paratyphi* sin adición del probiótico), el tercer grupo fue la dosis baja (0,003gr de *L. farciminis*/Kg de alimento e infectado con *Salmonella paratyphi*) y el cuarto grupo la dosis alta (0.03gr de *L. farciminis*/Kg de alimento e infectado con *Salmonella paratyphi*). A los 10 días de adaptación se inoculó con la cepa de *Salmonella paratyphi* 1×10^9 UFC. Se contabilizó el peso promedio diario, el consumo de alimento y consumo de agua, de manera grupal, con la finalidad de analizar los parámetros de producción, evaluar y el efecto de la inoculación de la cepa de *Salmonella paratyphi* en los grupos. Para evaluar la salud intestinal se hicieron sacrificios en tres tiempos diferentes (14, 18 y 21 días después de haber iniciado el tratamiento), tomando muestras de intestino delgado, en diferentes segmentos (duodeno, yeyuno, e íleon) los cuales fueron analizados mediante microscopía óptica midiendo las vellosidades intestinales del duodeno, yeyuno e íleon. Al final del experimento, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para peso corporal, consumo de alimento y consumo de agua. Sin embargo, existieron diferencias significativas al evaluar la salud intestinal (longitud de las vellosidades intestinales e integridad a través del estudio histopatológico), evidenciándose un mayor integridad y desarrollo de las vellosidades intestinales en los segmentos del duodeno yeyuno e íleon en el grupo que se les adicionó el probiótico en dosis alta.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

BAL bacterias ácido-lácticas

CE comisión europea

GC grupo control

DA dosis alta

DB dosis baja

GL Grados de Libertad

ID intestino delgado

D duodeno

I íleon

MGL modelo lineal generalizado

TGI tracto gastrointestinal

T Testigo

UE unión europea

UFC Unidades Formadoras de Colonias

Y yeyuno

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grupos establecidos para los tratamientos.....	18
Tabla 2. Ingredientes contenidos en el alimento y su proporción.....	20
Tabla 3. Mediciones de las vellosidades del duodeno.....	25
Tabla 4. Cuadro comparativo de las vellosidades del duodeno.....	27
Tabla 5. Mediciones de las vellosidades del yeyuno.....	30
Tabla 6. Cuadro comparativo de las vellosidades del yeyuno.....	32
Tabla 7. Mediciones de las vellosidades del íleon.....	34
Tabla 8. Cuadro comparativo de las vellosidades del íleon.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Consumo promedio de alimento por individuo.....	22
Figura 2. Consumo promedio de agua por individuo.....	23
Figura 3. Peso promedio individual.....	24
Figura 4. Longitudes de las vellosidades del duodeno.....	29
Figura 5. Longitudes de las vellosidades del yeyuno.....	33
Figura 6. Longitudes de las vellosidades del íleon.....	37
Figura 7. Medidas de las longitudes de las vellosidades en cada tratamiento.....	38
Figura 8. Medidas de las longitudes vs sección del intestino.....	38
Figura 9. Medidas de las longitudes en cada día de tratamiento.....	39

Í

AGRADECIMIENTOS.....	II
RESUMEN.....	III
ABREVIATURAS UTILIZADAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE.....	VI
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	2
Pollos de engorda (<i>Gallus gallus</i>).....	2
El intestino delgado del pollo.....	2
Vello­sidades del intestino de los pollos de engorda.....	3
<i>Salmonella</i>	5
Salmonelosis.....	5
Paratifoidea en aves.....	6
Probióticos una alternativa terapéutica al uso de antibióticos.....	6
Probióticos.....	7
Acción de los probióticos.....	8
Probióticos en la industria avícola.....	8
Exclusión competitiva de los probióticos.....	10
Características para seleccionar un probiótico.....	10
<i>Lactobacillus</i>	11

NDICE

Aplicación de Lactobacilos y su efecto en polluelos.....	13
<i>Lactobacillus farciminis</i> (Reuter1983).....	13
JUSTIFICACION.....	15
OBJETIVOS.....	16
OBJETIVO GENERAL.....	16
OBJETIVOS PARTICULARES.....	16
HIPOTESIS.....	17
MATERIAL Y METODOS.....	18
MATERIAL BIOLÓGICO.....	18
INSTALACIONES.....	18
Adición del probiótico (<i>Lactobacillus farciminis</i>).....	19
Peso.....	19
Parámetros de producción.....	19
Inoculación de la infección (<i>Salmonella paratyphi</i>).....	20
Sacrificios y necropsias.....	20
HISTOLOGIA.....	21
MICROSCOPIA Y MEDICIONES.....	21
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	21
RESULTADOS.....	22
PARAMETROS DE PRODUCCION ANALIZADOS.....	22
Consumo de alimento promedio.....	22
Consumo de agua promedio.....	22
Peso individual promedio.....	23
ESTUDIOS HISTOLÓGICOS.....	24

Longitudes de las vellosidades del duodeno.....	24
Longitudes de las vellosidades del yeyuno.....	29
Longitudes de las vellosidades del íleon.....	33
MODELO LINEAL GENERALIZADO (MGL).....	38
Longitud de vellosidad vs tratamiento.....	38
Longitud de vellosidad vs sección del intestinal.....	38
Longitud de vellosidad vs día de tratamiento.....	39
DISCUSIÓN.....	39
CONCLUSIONES.....	45
LITERATURA CITADA.....	46

INTRODUCCIÓN.

La integridad intestinal es necesaria para el funcionamiento óptimo del tracto intestinal y al mismo tiempo maximiza el desempeño productivo de los animales. En la crianza de pollos de carne, este aspecto es primordial para que les permita alcanzar el peso y la conversión alimenticia esperada para la línea genética en cuestión (Aguavil *et al.*, 2012) en ambientes libres de gérmenes, los pollos crecen 15% más rápido que los criados en ambientes convencionales, donde están expuestos de manera continua, a la microbiota. Las infecciones con bacterias del genero *Salmonella* provocan una gran variedad de enfermedades agudas y crónicas en la industria avícola; de hecho, las aves representan uno de los reservorios más importantes de *Salmonella* así como sus productos avícolas para el hombre (Calnek *et al*, 2000), hay gran variedad de enfermedades asociadas con *Salmonella*. Especies de *Salmonella* de origen aviario o de mamíferos causan “intoxicación alimentaria” en el hombre. La cepa de *Salmonella paratyphi* ocasiona la fiebre paratifoidea la cual produce una toxina que causa graves gastroenteritis con nauseas, vomito, dolor abdominal y diarrea que aparecen característicamente a las 12-24 horas de la ingestión del alimento contaminado (Smith, 1980; Halami *et al*, 1999; Cabezas, 2009). Una solución natural a estas infecciones de carácter bacteriano son los probióticos que actúan en el sistema digestivo (Sisson *et al*, 1982; Banks, 1986; Gómez *et al*, 1987; Horst *et al*, 2005). En el presente trabajo se eligió al *Lactobacillus farciminis* como probiótico debido a que es una bacteria ácido-láctica, la cual ha sido poco utilizada (en comparación con otros probióticos) y ha tenido resultados prometedores en cuanto a la salud animal, principalmente en cerdos. Sin embargo, no ha sido estudiado con detenimiento para la producción avícola. Esta bacteria fue descrita por primera vez en 1983, es una bacteria homofermentativa, lo que significa que el producto de su fermentación es ácido láctico, se caracteriza por presentar células en forma de bacilos largos y extendidos (Banwar, 1979; Frazier, 1993; Samaniego, 2000).

2. ANTECEDENTES

Pollos de engorda (*Gallus gallus*)

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, nutrición, sanidad y manejo. El proceso de selección genética fue orientado para mejorar el desempeño y el rendimiento de la pechuga, sin embargo el desarrollo de los órganos y tejidos relacionado a la respuesta inmunológica resulto perjudicial (Cheema *et al.*, 2003).

Los desafíos infecciosos son una forma común de estrés al cual están expuestos los pollos de engorde lo que puede resultar en la aparición de enfermedades clínicas, lo cual depende de varios factores, como la patogenicidad del microorganismo invasor y la competencia inmunológica del ave, el sistema inmune activado afectará negativamente el crecimiento con la disminución de los índices productivos (Klasing, 2006)

El intestino delgado del pollo

El tracto gastrointestinal tiene como principal objetivo la degradación y absorción de nutrientes necesarios para el mantenimiento, crecimiento y reproducción. Está caracterizado como un ambiente dinámico, constituido por interacciones complejas entre el contenido presente en el lumen intestinal, microorganismos y la células epiteliales de absorción, las cuales proporcionan protección física y defensa inmune (Koutsos, 2006). El 75% de todas las células de defensa del organismo están localizadas en el intestino, en forma de tejido linfoide, los anticuerpos tipo IgA de la mucosa, representa una importante fracción de la barrera inmunológica del intestino confiriendo protección al impedir la adherencia de las bacterias o toxinas a las células del epitelio intestinal (Tavernari *et al.*, 2008). El epitelio de la mucosa gástrica presenta en términos generales un área de absorción pequeña pero la mucosa del intestino delgado con sus circunvoluciones y vellosidades representa un área de contacto enorme con una gran capacidad de absorción. El intestino delgado de las aves es relativamente más corto que el de los mamíferos, aun cuando hay variación en la longitud dependiente de la edad. Algunos estudios han examinado el desarrollo de los órganos digestivos en el pollo después de la eclosión y han indicado que el peso del intestino se incrementa relativamente más rápido que el peso corporal, donde el epitelio generalmente consiste en células columnares de absorción y muchas células caliciformes que secretan moco (Uni *et al.*, 1999). El intestino delgado es el sitio principal de la digestión química, ya que involucra enzimas de origen pancreático en el intestino (Cuca *et al.*, 1996). En el intestino delgado también secreta hormonas que están involucradas

principalmente en la regulación de las acciones gástricas e intestinales; realiza tres funciones. La primera es recibir el jugo gástrico que contiene enzimas, estas enzimas completan la digestión de las proteínas y convierte los carbohidratos en compuestos más sencillos, como monosacáridos en el duodeno; la segunda función absorber el alimento, digerirlo pasarlo al torrente sanguíneo y la tercera, realiza una función peristáltica que empuja el material no digerible hacia los ciegos y el recto (Mack, 1986).

En el duodeno desembocan de dos a tres conductos pancreáticos, uno biliar y uno hepático. La reacción del contenido del duodeno es casi siempre ácida, presentando un pH de 6,31, por lo que posiblemente el jugo gástrico ejerce aquí la mayor parte de su acción. El yeyuno de la gallina consta de unas diez asas pequeñas, dispuestas como una guirnalda y suspendidas de una parte del mesenterio presenta un pH de 7,04 la longitud del yeyuno es de 85 a 120 cm, termina en el divertículo de Meckel, el cual es el vestigio del tallo del saco vitelino y funciona como órgano linfoide, y por último el Íleon, cuya estructura es estirada, se encuentra en el centro de la cavidad abdominal, el pH fluctúa entre 6,8 y 7,6 (Doyle *et al.*, 2000)

Vellosidades del intestino de los pollos de engorda

Las células que integran al sistema gastrointestinal de los pollos se han diferenciado para efectuar diferentes funciones específicas. Las células que lo recubren forman una superficie semipermeable que selectivamente permite el paso de líquidos, electrolitos y nutrientes disueltos. Forman parte de una barrera física natural ininterrumpida que sirve para restringir el acceso de agentes patógenos al intestino y por consiguiente al resto del organismo. Esta integridad se interrumpe cuando los agentes patógenos (bacterias, virus, protozoarios, etc.) o tóxicos dañan las células del epitelio intestinal. Dicho epitelio está en un constante estado de renovación en el que las células más viejas se desprenden de la superficie del epitelio dentro del lumen intestinal para ser reemplazadas por células nuevas mediante un proceso de regeneración en el que las células nuevas se diferencian para asumir las funciones de las células desechadas (Iji *et al.*, 1998).

La superficie de absorción del intestino se expande enormemente debido a un proceso de dobleces o proyecciones hacia el lumen intestinal que microscópicamente parecen dedos, conocidos como vellosidades intestinales que aumentan aún más la superficie de absorción. La longitud de las vellosidades intestinales decrece a partir del duodeno y hacia el íleon. Cada vellosidad está recubierta de un epitelio celular compuesto de enterocitos que poseen funciones diferentes de acuerdo a su localización dentro de cada vellosidad: los enterocitos

localizados en el ápice de las vellosidades absorben líquidos y nutrientes, mientras que los de las zonas laterales y las criptas de Lieberkün secretan electrolitos y líquidos. El mantenimiento óptimo de su estructura y funcionamiento es esencial para una mayor productividad de las parvadas. (Chumpawadee *et al.*, 2008) El intestino de las aves tiene una densidad más alta de vellosidades intestinales y un ritmo de reciclado epitelial más rápido que el de los mamíferos. Igualmente, la respuesta a las agresiones entéricas es más rápida; la respuesta inflamatoria es en las primeras 12 horas en vez de los 3 a 4 días de los mamíferos. Esto hace que las aves sean más susceptibles que los mamíferos a los trastornos que afectan la capacidad de absorción intestinal. (Santin *et al.*, 2001)

Hay una serie de barreras físicas naturales para prevenir la entrada de agentes patógenos al intestino y evitar su diseminación sistémica. Desempeñan una función importante al mantener la integridad y la salud intestinales del ave, tales como:

1. **Moco intestinal:** secretado por células especializadas localizadas en glándulas de la cavidad oral, esófago, epitelio proventricular e intestinal llamadas células caliciformes. Contiene mucina (glucoproteína) para prevenir la auto digestión de las células epiteliales de la mucosa y protegerlas de la invasión de patógenos; y también sirve para lubricar el paso del bolo alimenticio.
2. **Enterocitos:** células que recubren y forman el epitelio intestinal que forman una barrera física continua que mantiene la integridad intestinal. Poseen funciones diferentes de acuerdo a su localización dentro de cada vellosidad. Las agresiones por agentes virales, bacterianos, micóticos, tóxicos o parasitarios pueden interrumpir su continuidad y alterar la integridad intestinal.
3. **Secreción de líquidos:** La secreción de líquidos intestinales sirve para lubricar el epitelio intestinal y arrastrar los agentes infecciosos.
4. **Irrigación sanguínea:** la gran irrigación sanguínea permite transportar células protectoras del sistema inmunitario rápidamente cuando se necesita responder con una reacción inflamatoria rápida a alguna agresión o invasión de agentes infecciosos. Además, transporta rápidamente los nutrientes absorbidos a los tejidos.
5. **Tejido linfoide:** el intestino tiene la cantidad más grande de tejido linfoide del organismo diseminado por todas sus secciones, pero principalmente en la lámina propia. Además, hay ciertas zonas de alta congregación de tejido linfoide como en las placas de Peyer, la coyuntura del proventrículo con la molleja y las tonsilas cecales. Este tejido es de gran importancia cuando ocurre una agresión o invasión intestinal por agentes infecciosos (Pelicano *et al.*, 2005; Hooge *et al.*, 2003).

Salmonella

Los miembros del género *Salmonella* están ampliamente distribuidos en la naturaleza, se los encuentra como patógenos en el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves e insectos, causando un amplio espectro de enfermedades en el hombre y los animales (Caffer *et al.*, 2001).

El género *Salmonella* pertenece a la tribu *Salmonelleae*, de la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos Gram-negativos, de 0,7-1,5 x 2,0-5µm, generalmente móviles por flagelos peritricos (excepto *S. Gallinarum*), son anaerobios facultativos, no esporulados. No fermentan la lactosa (excepto *S. enterica* sub esp. *arizonae* y *S. enterica* subesp. *diarizonae*), fermentan glucosa con producción de gas (excepto *S. Typhi*); no producen indol; no degradan urea; decarboxilan lisina y ornitina (Caffer *et al.*, 2001).

Salmonelosis

Las salmonelosis constituyen una causa importante de enfermedad diarreica en los seres humanos. La *Salmonella typhi* la *S. paratyphi* colonizan únicamente a los humanos, lo cual hace necesaria para la transmisión la presencia de casos humanos o de portadores crónicos. Las salmonelosis no-typhi se presentan básicamente como resultado de la ingestión de alimentos de origen animal contaminados con estos microorganismos. (Saravia, 2010). Las bacterias del género *Salmonella* causan en el hombre una gastroenteritis aguda, con cefalalgia, dolores abdominales súbitos, diarrea, náuseas, fiebre y vómitos. La deshidratación puede ser grave sobre todo en menores de 1 año, ancianos e inmunocomprometidos. Aunque la morbilidad por salmonelosis es elevada, la mortalidad es baja, excepto, en niños de corta edad, ancianos e inmunocomprometidos. La infección que comienza con una diarrea aguda puede continuar hacia una infección focal o septicémica. Tiene un período de incubación de 6 a 72 horas, generalmente entre 12 a 36 horas y la gastroenteritis persiste de 24 a 72 horas. La dosis infectiva es de 10^5 UFC a 10^8 UFC. La transmisión que oscila entre varios días a varias semanas, ocurre durante toda la evolución de la infección. El estado de portador temporal puede persistir varias semanas, especialmente en lactantes y es raro el de portador crónico de más de un año (Caffer *et al.*, 2001). Las *Salmonella* es una bacteria invasora que penetra por la vía oral, deben superar varias barreras o líneas de defensa naturales para finalmente localizarse en el íleon terminal y el colon proximal. La primera barrera es la acidez gástrica; sin embargo, las salmonellas tienen capacidad de adaptarse a ésta y pueden sobrevivir a pH de 4,0. Además, deben evitar la lisis por las sales biliares, desplazarse a lo largo del intestino, competir con la flora endógena e invadir las células epiteliales intestinales. Son más susceptibles los individuos con

aclorhidria y quienes ingieren antiácidos. Después de pasar el estómago las salmonellas llegan al intestino delgado donde interactúan con las células de la pared intestinal. Los péptidos catiónicos antibacterianos, secretados por las células de Paneth del intestino delgado podrían representar una importante segunda línea de defensa contra *Salmonella* y otros patógenos (Saravia, 2010).

Síndrome de fiebre entérica: está asociado con *Salmonella typhi* (fiebre tifoidea), *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella paratyphi C* y *Salmonella paratyphi B* (fiebre paratifoidea). Los tres primeros microorganismos son patógenos exclusivos del hombre y *S. paratyphi B* se puede encontrar también en animales (Caffer *et al.*, 2001).

Paratifoidea en aves

La paratifoidea es una enfermedad bacteriana que es ocasionada por infecciones producidas por un amplio grupo de salmonellas no móviles, la más común de las cuales es *Salmonella paratyphi* que es una bacteria gramnegativa. Este grupo de salmonellas afecta primordialmente al aparato digestivo del hombre además de una gran variedad de aves y otras especies animales. Tiene consecuencias fatales cuando ataca a aves menores de tres semanas de edad, presentándose en las adultas por lo general como una infección crónica y subclínica limitada al intestino, en las aves las especies más susceptibles son los pavos y los pollos. En cuyo caso puede convertirse en septicemia y producir la muerte. Las consecuencias económicas de este tipo de infección son baja de la fertilidad; baja de la incubabilidad, baja de la producción de huevo; retraso en el desarrollo en aves jóvenes convalecientes y, en ocasiones; ha determinado la eliminación de lotes de pavos reproductores por la transmisión a través del huevo en esta especie (Gómez *et al.*, 1986; Mosqueda *et al.*, 2000).

Probióticos una alternativa terapéutica al uso de antibióticos.

En décadas pasadas, la utilización de antibióticos como un aditivo en contra enfermedades bacterianas en la industria ganadera fue el método más común para prevenir las enfermedades y aumentar la eficiencia alimentaria. Sin embargo, el uso de estos productos provoca efectos residuales en los alimentos, así como el desarrollo de cepas patógenas resistentes (Choct, 2001; Hillman *et al.*, 2003) además, daña el equilibrio de la microbiota gastrointestinal, han sido empleados de modo y en dosis inadecuadas, generando la aparición de cepas resistentes, cada vez más patógenas y con implicaciones negativas en la salud humana y animal (Griggs *et al.*, 2005) por lo tanto, la posibilidad de que el animal pueda contraer enfermedades es mayor (Devi 1998; Ferket *et al.*, 2002) por este motivo, la Unión Europea ha prohibido su utilización, impulsando la investigación en

aplicación de nuevas alternativas naturales (Nava *et al.*, 2005). Por ello, los probióticos se han introducido como una solución alternativa (Mulder, 1991).

Probióticos

En aves sanas la flora normal intestinal proporciona una barrera estable, eficaz contra la colonización por microorganismos patógenos del intestino en particular por *Salmonella spp.* Sin embargo, cuando el polluelo por primera vez se expone al ambiente, la flora intestinal acumula estrés por lo general se usan antimicrobianos para controlar o alterar su composición de la flora, Se ha desarrollado una serie de suplementos de alimentación llamados probióticos que comprenden mezclas de bacterias intestinales la cuales son capaces de ayudar a la devolución de la salud de la flora intestinal de los pollos de engorda y con esto prevenir la colonización de patógenos. Experimentalmente este principio de exclusión competitiva no ha sido bien aceptado para uso comercial. (Prescot *et al.*, 2000).

Con el paso de los años, la palabra probiótico se ha utilizado de diversas maneras. Originalmente se utilizó para describir las sustancias producidas por un protozoo estimulado por otro (Lilly *et al.*, 1965), pero posteriormente se utilizó para describir los suplementos alimenticios que tuvieron un efecto beneficioso sobre el animal huésped al afectar su flora intestinal (Parker, 1974). De acuerdo con la definición actualmente adoptada por FAO / OMS, los probióticos son: "microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud en el huésped" (FAO y WHO, 2001). Esta definición no sólo enfatiza la importancia del uso de los microorganismos probióticos en el mejoramiento de las propiedades de la microbiota autóctona de los animales, sino que incluye otros efectos tales como: la estimulación de la actividad inmunológica (Ramírez, 2005).

Schrezenmeir y de Vrese (2001), definen a los probióticos como aditivos alimentarios formados por microorganismos vivos, que tienen un efecto beneficioso en la salud del hospedero. Entre los probióticos, las bacterias más prominentes son los Lactobacilos (Brizuela, 2003), ya que constituyen parte mayoritaria de la flora natural del TGI (Tracto Gastro Intestinal) y son muy importantes en la producción de ácidos orgánicos, los que tienen un efecto beneficioso (Sainsbury, 1993). Los probióticos, se los ha descrito como un agente bioterapéutico el cual se podría utilizar para inhibir la colonización de un microorganismo patógeno en el tracto intestinal. Para que un microorganismo sea considerado probiótico debe cumplir con las siguientes características: No ser patógeno, ser resistente a los ácidos del intestino y la bilis, tener las características para sobrevivir en el tracto intestinal, debe influir en las actividades

metabólicas, provocar un efecto beneficioso en el hospedador y permanecer viable durante su almacenamiento y uso (Cabezas, 2009; Guilliot, 2000).

Acción de los probióticos

El uso de los probióticos provoca en general una mejor conversión alimenticia, un aumento del peso vivo y un mejor desarrollo del organismo; debido a que las bacterias ácido lácticas proporcionan nutrientes digeribles, vitaminas y enzimas digestivas, ayudando a la digestión, síntesis, adsorción de las vitaminas y minerales, lo cual facilita el metabolismo de los alimentos (Jadomus *et al*, 2001)

El modo de acción de los probióticos en aves de corral incluye: mantener la microbiota intestinal normal por exclusión competitiva y antagonismo (Jin *et al*, 1998); la alteración del metabolismo mediante el aumento de la actividad enzimática digestiva y la disminución de la actividad enzimática bacteriana (Cole *et al*, 1987), mejorar la ingesta de alimentos, la digestión y estimular el sistema inmune (Line *et al* 1998).

Existe un efecto de contaminación microbiológica de la cáscara que puede influir en las características de la microbiota intestinal. Además, también la secreción gástrica de HCl, que comienza a los 18 días de incubación, tiene un profundo impacto en la selección de la microbiota. Por lo tanto, un uso inmediato de suplementos de probióticos en el nacimiento es más importante y útil en las especies de aves que en otros animales. El pollo es un ejemplo extremo de un animal joven que está privado de contacto con su madre u otros adultos y que, por lo tanto, es probable que se beneficie de la suplementación con preparaciones microbianas diseñadas para restaurar la microbiota intestinal protectora. (Fuller, 2001; Yoon *et al*, 2004; Nayepor *et al*, 2007)

Probióticos en la industria avícola.

El aumento de la productividad en la industria avícola se ha acompañado de varios impactos, incluyendo la aparición de una gran variedad de patógenos y resistencia bacteriana. Estos impactos se deben en parte al uso indiscriminado de agentes quimioterapéuticos como resultado de las prácticas de manejo en los ciclos de cría (Kabir, 2009). Después del consumo, los probióticos entran muchas bacterias de ácido láctico en el tracto gastrointestinal. Estos microorganismos han sido reputados para modificar el medio intestinal y para entregar las enzimas y otras sustancias beneficiosas en los intestinos. La suplementación de *L. acidophilus* o una mezcla de cultivos de lactobacilos a pollos aumentó significativamente los niveles de amilasa después de 40 días de alimentación (Jin *et al.*, 2000). Este

resultado es similar al hallazgo de Collington *et al.*, 1990 que informó que la inclusión de un probiótico (una mezcla de múltiples cepas de *Lactobacillus spp.* Y *Streptococcus faecium*) dio lugar a significativamente mayor actividad de las enzimas carbohidrasas en el intestino delgado de los lechones (Collington *et al.*, 1990). Los lactobacilos que colonizan el intestino pueden secretar enzimas, aumentando así la actividad de la amilasa intestinal (Duke *et al.*, 1977; Sissons, 1989). Está bien establecido que los probióticos alteran el pH y la flora gastrointestinal para favorecer una mayor actividad de las enzimas intestinales y la digestibilidad de los nutrientes (Dierck, 1989).

Kabir *et al.*, 2009 trataron de evaluar el efecto de los probióticos con respecto a la eliminación de las infecciones bacterianas y la regulación de la flora intestinal mediante la determinación del recuento total viable (TVC) y el recuento total de lactobacilos (TLC) a los grupos alimentados convencionales en la 2^a, 4^a y 6^a semana de edad. Su resultado reveló un antagonismo competitivo. El resultado de su estudio también evidenció que los organismos probióticos inhibieron algunos patógenos no benéficos ocupando el espacio de la pared intestinal. También demostraron que los pollos de engorde alimentados con probióticos tenían una tendencia a mostrar pronunciados cambios histológicos intestinales como el impulso activo en la mitosis celular y el aumento del tamaño nuclear de las células, que los controles. Estos resultados de los cambios histológicos apoyan los hallazgos de Samanya y Yamauchi (Samanya *et al.*, 2002) e indicaron que las aves que fueron alimentados con *B. subtilis* var. Natto durante 28 días tuvieron una tendencia a mostrar un mayor rendimiento de crecimiento y pronunció histologías intestinales, tales como altura prominente de las vellosidades, área celular extendida y mitosis celular consistente, que los controles. Por otro lado, Chichlowski *et al.*, 2000 compararon los efectos de proporcionar microbios alimentados directamente con la alimentación de salinomicina en histomorfometría intestinal y microarquitectura y encontraron menos grosor mucoso en pollos tratados y la densidad de bacterias incrustadas en la manta mucosa parecía ser menor que en el control en todos los segmentos intestinales (Chichlowski *et al.*, 2000). Watkins y Kratzer (Watkins *et al.*, 1983) informaron que los pollitos dosificados con cepas de *Lactobacillus* tenían un menor número de coliformes en los macerados cecales que el testigo. Francis *et al.* (Francis *et al.*, 1978) también informaron que la adición del producto de *Lactobacillus spp.* a 75 mg / kg de pienso disminuyó significativamente el recuento de coliformes en el ceca y el intestino delgado de pavos. Utilizando pollitos gnotobióticos, Fuller 1977, encontró que las cepas de *Lactobacillus* específicas del huésped fueron capaces de disminuir *Escherichia coli* en el cultivo y el intestino delgado. Kizerwetter-Swida y Binek (Kizerwetter *et al.*, 2009) demostraron que *L. salivarius* cepa redujo el número de

Salmonella enteritidis y *Clostridium perfringens* en el grupo de pollos tratados con *Lactobacillus spp* (Watkins et al, 1983).

Exclusión competitiva de los probióticos.

Los métodos de exclusión probiótica y competitiva se han utilizado como un método para controlar los agentes endémicos y zoonóticos en aves de corral. En términos tradicionales, la exclusión competitiva en aves de corral ha implicado el uso de microorganismos intestinales naturales en pollitos y pavitos que estaban listos para ser colocados en criaderos. (Nurmi y Rantala, 1973). Aunque la exclusión competitiva se ajusta a la definición de probióticos, el enfoque de exclusión competitiva proporciona instantáneamente al polluelo con una microbiota intestinal adulta en lugar de agregar una o algunas especies bacterianas a una población microbiana establecida. La inoculación de pollitos de un día con cultivos de exclusión competitiva o probióticos más clásicos sirve como un buen modelo para determinar los modos de acción y la eficacia de estos microorganismos. Debido a la susceptibilidad de los pollitos de un día a la infección, esta práctica es también de importancia comercial. Mediante el uso de este modelo, una serie de probióticos (Owings *et al.*, 1989; Fritts *et al.*, 2000) se ha demostrado para reducir la colonización y el desprendimiento de *Salmonella* y *Campylobacter*. La exclusión competitiva es una medida muy eficaz para proteger a los polluelos recién nacidos, los pavos, las codornices y los faisanes y, posiblemente, otras aves de caza, también contra *Salmonella* y otros enteropatógenos (Schneitz, 2005).

Características para seleccionar un probiótico.

La utilización de probióticos en la dieta depende en parte de la cepa utilizada; pues, no todas las cepas tienen la misma capacidad de modulación de la microbiota intestinal o de unirse a las células intestinales. Jurado, (2009) hizo un estudio donde pretendió buscar una alternativa para reducir o eliminar el uso de antibióticos en cerdos mediante la caracterización de bacterias lácticas aisladas del intestino grueso de porcinos adultos y verificar su desempeño *in vitro* para el tratamiento de infecciones bacterianas durante el destete.

Las actuales perspectivas sobre aplicaciones biotecnológicas de probióticos requieren más *in vitro* e *in vivo* en la investigación para evaluar la seguridad del uso de organismos de tipo salvaje o las obtenidas por ingeniería genética. Se informó que para obtener efecto protector en los animales, el tratamiento con un agente probiótico tuvo que ser iniciado diez días antes desafío con un patógeno. (Oyetayo, 2003)

Los rasgos deseados percibidos para la selección de probióticos funcionales son muchos. La bacteria probiótica debe cumplir las siguientes condiciones: debe ser un habitante normal del intestino, y debe ser capaz de adherirse al epitelio intestinal para superar obstáculos potenciales, como el pH bajo del estómago, la presencia de ácidos biliares en los intestinos, y la competencia contra otros microorganismos en el tracto gastrointestinal (Chateau *et al.*, 1993). Las formas tentativas de selección de probióticos como agentes de control biológico en la industria avícola. Muchos ensayos *in vitro* se han desarrollado para la preselección de cepas probióticas (Ehrmann *et al.*, 2002; Koenen *et al.*, 2004). La competitividad de las cepas más prometedoras seleccionadas por ensayos *in vitro* se evaluó *in vivo* para el seguimiento de su persistencia en pollos. Además, los probióticos potenciales deben ejercer sus efectos beneficiosos (por ejemplo, nutrición mejorada y aumento de la respuesta inmune) en el huésped. Finalmente, el probiótico debe ser viable bajo condiciones normales de almacenamiento y tecnológicamente adecuado para procesos industriales (por ejemplo, liofilizado) (Garriga *et al.*, 1998).

Lactobacillus

El género *Lactobacillus* (*lactis*-leche; *bacillus*-pequeños bacilos), se ha caracterizado por sus beneficios para la salud, tanto humana como animal, por su capacidad antagónica, la cual se basa en la producción de ácidos orgánicos y otros metabolitos inhibidores, entre los que cabe mencionar el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y otros derivados del metabolismo del oxígeno, así como compuestos aromáticos (diacetilo, acetaldehído), derivados deshidratados del glicerol (reuterina), enzimas bacteriolíticas, bacteriocinas y otros (Ashenafi *et al.*, 1989). Las características del género *Lactobacillus* se caracteriza por presentar células en forma de bacilos largos y extendidos, aunque con frecuencia pueden observarse bacilos cortos o coco-bacilos coryneformes (Bergey, 1992); lo cual hace que se puedan confundir con géneros aislados habitualmente de materiales clínicos (Castellanos *et al.*, 1996).

La mayoría de las cepas de *Lactobacillus* son principalmente aerotolerantes; su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerófilas o anaeróbicas y se conoce que un incremento de la concentración de CO₂ (de aproximadamente 5% o hasta el 10%) puede estimular el crecimiento, sobre todo en el caso del crecimiento superficial sobre medios sólidos (Chung *et al.*, 1989). Los lactobacilos crecen bien en medios ligeramente ácidos, con pH inicial de 6,4 - 4,5 y con uno óptimo de desarrollo entre 5,5 y 6,2. Su crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores desde 4 hasta 3,6 en dependencia de especies y cepas y disminuye

notablemente en medios neutros o ligeramente alcalinos. Los *Lactobacillus* son capaces de disminuir el pH del sustrato donde se encuentran por debajo del valor 4,0 mediante la formación de ácido láctico. De esta forma evitan o al menos disminuyen considerablemente el crecimiento de casi todos los otros microorganismos competidores, exceptuando el de otras bacterias lácticas y el de las levaduras. (Conway *et al.*, 1986). Los carbohidratos les resultan indispensables para su buen desarrollo, pues los fermentan para dar lugar a ácido láctico (a veces con ácidos volátiles), alcohol y dióxido de carbono (CO₂) como subproductos. La resistencia a la bilis es también una propiedad importante a tener en cuenta para la colonización del intestino por los lactobacilos y se ha estudiado principalmente en el caso de *Lactobacillus acidophilus* (Barefoot *et al.*, 1994).

El género *Lactobacillus* pueden encontrarse en productos lácteos, quesos, granos, productos cárnicos o de pescado, agua, aguas cloacales, cervezas, vinos, frutas y jugos de frutas, col y otros vegetales fermentados, ensilajes, masas agrias y pulpas, aunque también forman parte de la flora normal de la boca, el tracto gastrointestinal y la vagina de muchos animales de temperatura estable, incluyendo al hombre. También pueden encontrarse en hábitats secundarios como los fertilizantes de origen orgánico. Algunas especies individuales se han adaptado a determinados nichos ecológicos, que son de hecho sus hábitats naturales, siendo muy difícil encontrarlos fuera de éstos (Venema *et al.*, 1996).

La patogenicidad de los *Lactobacillus spp.* es rara; aunque últimamente se han informado algunos procesos infecciosos en humanos donde estos microorganismos se han encontrado involucrados. Tales son los casos de abscesos, septicemias sistémicas y endocarditis bacterianas, provocados por *L. casei subsp. Rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* y ocasionalmente *Lactobacillus salivarius*. Sin embargo, las bases bioquímicas de tal patogenicidad aún se desconocen (Olesupo *et al.*, 1995).

Se plantea que *Lactobacillus* también tienen un efecto antimicrobiano *in vivo* contra cepas de *Escherichia coli*, *Streptococcus spp.*; *Pseudomonas spp.*; *Salmonella spp.*; *Bacteroides fragilis*, *Clostridium spp.* y *Bifidobacterium sp.* La sustancia inhibidora no es activa contra cepas de *Lactobacillus*, sin embargo, la actividad inhibidora no es sensible ni al calor ni a proteasas y el componente es activo solamente en valores de pH entre 3 y 5 (Saxelin; 1997).

Kandler y Weiss (1993) agrupan a los lactobacilos en los tres grupos tradicionales establecidos por Orla-Jensen: termobacterias, estreptobacterias y betabacterias. De modo que, sus definiciones son las siguientes: Grupo I (Termobacterias representativas y nuevas especies descritas): Lactobacilos homofermentativos obligados: Fermentan las hexosas casi exclusivamente a ácido láctico por la vía

Embden-Meyerhoff; no fermentan las pentosas ni el gluconato. Entre estas especies y subespecies se encuentran: *Lactobacillus farciminis* (Kandler *et al*, 1992).

Aplicación de Lactobacilos y su efecto en polluelos.

En un estudio, se determinó que fue durante la primera semana después de la eclosión que el polluelo fue más susceptible a las infecciones por *Salmonella*. El uso de una cepa de *Lactobacillus* no produjo protección, lo que les obligó a evaluar una población no manipulada de bacterias intestinales de pollos adultos que eran resistentes a *S. infantis*. En la administración oral de este cultivo mixto indefinido, se consiguió una resistencia de tipo adulto a *Salmonella*. Este procedimiento más tarde se conoció como el Nurmi o concepto de exclusión competitiva. El enfoque de exclusión competitiva de la inoculación de pollitos de un día con una microbiota de adultos demuestra con éxito el impacto de la microbiota intestinal sobre la función intestinal y la resistencia a la enfermedad (Nisbet *et al*, 1998; Stern *et al*, 2001).

***Lactobacillus farciminis*.**

Lactobacillus farciminis pertenece al grupo I (homofermentador estricto) del género *Lactobacillus*. Es una bacteria que se encuentra naturalmente presente en ciertos alimentos, como los productos cárnicos (especialmente salchichas) y la levadura de pan. Es capaz de producir óxido nítrico (NO) *in vitro*. Aunque el papel del óxido nítrico (NO) en el control de los procesos inflamatorios digestivos sigue siendo controvertido, se ha demostrado que el efecto antiinflamatorio observado en la colitis experimental se basa en mecanismos de acción que están principalmente relacionados con la liberación de óxido nítrico (NO) por el *Lactobacillus farciminis* en el lumen colónico. Los investigadores estudiaron el efecto de *Lactobacillus farciminis* sobre la respuesta inmune y las células epiteliales. Habiendo demostrado en la rata, que el estrés agudo produjo una mayor permeabilidad intestinal, causando dolor visceral, y que *L. farciminis* redujo este aumento en la permeabilidad intestinal inhibiendo las contracciones del citoesqueleto (red de fibras intracelulares) a través de la inhibición de la cadena ligera de miosina MLC). Además, establecieron que el tratamiento oral con *Lactobacillus farciminis* en diferentes modelos de inflamación digestiva podría reducir los niveles de citoquinas pro inflamatorias y favorecer la producción de citocinas antiinflamatorias, lo que sugiere un efecto inmunomodulador local de este tratamiento (Lorica, 1998; Belgnaoui *et al*, 2006). La anotación del genoma sugirió que *L. farciminis* tiene múltiples habilidades para metabolizar los productos que contienen nitrógeno (Chiou *et al*, 2016).

Efecto de *Lactobacillus farciminis*

Numerosas patologías del tubo digestivo, y en particular del intestino, implican en mayor o menor grado fenómenos inflamatorios. El uso de bacterias lácticas de la especie *Lactobacillus farciminis* para el tratamiento o prevención de una patología del tubo digestivo, especialmente una patología inflamatoria aguda o crónica del intestino. Los investigadores observaron que la actividad antiinflamatoria de *Lactobacillus farciminis* se debió a la producción *in situ* en el lumen digestivo de óxido nítrico (NO) por esta bacteria. La producción de óxido nítrico en cultivo por *Lactobacillus farciminis* ha sido descrita por Wolf *et al.* (1990). Un posible papel del óxido nítrico en la regulación de las funciones digestivas y / o la protección de la mucosa digestiva ha sido sugerido por varias observaciones. Se sabe que algunas células del epitelio intestinal pueden producir óxido nítrico después de la inducción por ciertas citoquinas pro inflamatorias y / o por las toxinas lipopolisacáridas (LPS) de bacterias entero invasoras. Se cree que este óxido nítrico endógeno participa, a través de sus propiedades antimicrobianas, en la defensa contra microorganismos patógenos. También se piensa que participa, cuando se produce en bajas cantidades, en la protección de la mucosa intestinal. Sin embargo, en mayores cantidades, se cree que contribuye a la aparición y mantenimiento de un estado inflamatorio crónico (Witthoft *et al.*, 1998; Fioramonti *et al.*, 1999).

Los investigadores han establecido que *L. farciminis* produce, en el tubo digestivo, una cantidad de óxido nítrico que le permite ejercer un efecto terapéutico, en particular un efecto antiinflamatorio y un efecto sobre el dolor relacionado con la distensión visceral. En el contexto de la presente investigación, las composiciones que comprenden *L. farciminis* se pueden administrar en forma de alimentos. Esto puede ser, por ejemplo, productos fermentados tales como productos lácteos; En este caso, *L. farciminis* puede formar parte del fermento utilizado para la producción de estos productos o, alternativamente, puede añadirse a ellos después de la fermentación. También se pueden administrar en forma de suplementos dietéticos para incorporarlos en la dieta o para ser ingeridos directamente. Ventajosamente, pueden empaquetarse en forma de dosis individuales que contienen la cantidad deseada de *L. farciminis* (Venturi, 1999). Estos resultados muestran que un tratamiento con *L. farciminis*, en condiciones basales o condiciones de hiperalgesia inducidas por una inflamación colónica o un estrés de restricción, reduce el número de contracciones del músculo abdominal, lo que indica una reducción del dolor visceral (Nobaek, 2000).

JUSTIFICACION

La salmonelosis es un problema para la salud humana, debido a la ingestión de alimentos contaminados entre otros la carne de pollo. Reduciendo este vector con la inclusión de probióticos en este caso *Lactobacillus farciminis* en la alimentación de las aves de corral, en diferentes concentraciones.

En el presente trabajo es una propuesta para mejorar la salud intestinal en los pollos y de esta manera contribuir a la salud humana.

Los costos que generan en las unidades de producción por la utilización en este caso de probióticos reducen las cargas económicas para los productores, al ser un método natural. Sin embargo vale la pena investigar los diferentes probióticos por la salud de los pollos y en beneficio de la humanidad.

OBJETIVOS

General

Determinar la respuesta en el mejoramiento de la salud intestinal en las aves al agregar un probiótico (*Lactobacillus farciminis*) en su dieta, al desafiarlo con una cepa de *Salmonella paratyphi*

Específicos

Determinar el consumo de alimento, conversión alimenticia y mortalidad para observar el efecto de los tratamientos del probiótico sobre estos parámetros

Determinar el efecto del probiótico sobre la cepa de salmonella en el intestino delgado por medio de cortes histológicos y observar los daños sobre la mucosa intestinal.

Realizar mediciones de las vellosidades intestinales para determinar el efecto positivo o negativo del probiótico sobre la infección de *Salmonella paratyphi*.

HIPÓTESIS

Se tendrá una mejoría en la salud intestinal en los pollos de engorda (*Gallus gallus*) con la adición de *Lactobacillus farciminis* (probiótico) a diferentes concentraciones en su dieta, al infectar las aves con una cepa de *Salmonella paratyphi*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico.

120 Pollos broiler (*Gallus gallus*) de 3 días de eclosión. Estos animales se mantuvieron en jaulas de 1.5 m x 0.5 m x 0.5 m. (con 2 divisiones para tener 3 compartimentos) en un cuarto de 3.0 m x 2.0 m x 3.0 m, que está en la sala de donadores del Centro de Investigación y Estudios avanzados en Salud Animal (CIESA). Cada grupo tenía su propia jaula y se encontraban superpuestas de la siguiente manera, de arriba hacia abajo: Grupo control, dosis baja (0.003 gr de *Lactobacillus farciminis*) y dosis alta (0.03 gr de *L.farciminis*) excepto el grupo testigo el cual fue separado en un cuarto aparte para evitar su infección. Debajo de cada jaula una había una charola de aluminio evitaba que los desechos de los pollos cayeran a los niveles inferiores. El grupo control y testigo estaba constituido por 15 animales, mientras que los otros dos grupos estaban constituidos por 16 animales cada uno. Los 4 grupos recibieron alimento *ad-libitum*.

Grupo	Tratamiento
Testigo	1) Sin lactobacilo sin infección
Control	2) Infectado de <i>Salmonella</i> , Sin lactobacilo
Dosis baja	3) 0.003 <i>L. Farciminis</i> e infectado
Dosis alta	4) 0.03 <i>L. farciminis</i> e infectado

Tabla 1. Grupos establecidos para los tratamientos

Instalaciones

El experimento se realizó en la sala de donadores del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx), ubicado en el kilómetro 15.5 de la Carretera Panamericana Toluca-Atacomulco, Toluca, Estado de México.

Previo a la llegada de los animales experimentales, las instalaciones fueron lavadas, desinfectadas con cuaternarios de amonio y encaladas para proveer a los pollos de un día de edad, de un ambiente libre de patógenos.

La ventilación estaba dada por una ventana lateral en el cuarto. La temperatura en los inicios del experimento (con la llegada de los pollitos recién eclosionados) fue controlada con focos incandescentes de 200 watts color blanco. Al principio, los pollitos se mantuvieron a una temperatura de 38°C y se redujo 2°C por día hasta llegar a 32°C, que fue la temperatura que se mantuvo el resto del experimento

Adición del probiótico (*Lactobacillus farciminis*)

Lactobacillus farciminis, el producto comercial fue almacenado según las especificaciones, a temperatura de 4°C, la presentación que se tiene es el frasco de 100gr SAFISIS (compañía biotecnológica especializada en el desarrollo de ingredientes naturales por medios microbiológicos).

La dosis se calculó de la siguiente manera: El producto comercial contiene una concentración de 3×10^{11} UFC/g-1. Se utilizaron 0.003 g y 0.03 g de producto por kg de alimento libre de antibióticos para dosis de 1×10^9 UFC/Kg-1 y 1×10^{10} UFC/Kg de alimento, respectivamente para las dosis baja y alta de probiótico.

Peso

Cada mañana, antes de alimentarlos, cada grupo experimental fue pesado en una balanza con capacidad de hasta 15 kg. Una vez pesados y anotados, se calculó el peso promedio, el cual fue anotado en la bitácora. Se suministró de alimento sin aditivo (*L. farciminis*), a todos los grupos de aves durante los primeros tres días como periodo de “adaptación”, al cuarto día, el alimento proporcionado se le adicionó con *L. farciminis* para los grupos experimentales.

Se preparó únicamente la cantidad consumida por día. Se pesaron en una balanza analítica 0.033gr de *L. farciminis*, los cuales se diluyeron en un tubo cónico (de 15ml) con 11 ml de agua destilada para ser llevado a un vórtex y mezclarlo, posteriormente se retiró 1ml y se disolvió en 9 ml de agua destilada (también en tubo cónico de 15ml). Esta agua fue vertida en el alimento y mezclada con una batidora Oster.®

Para evaluar la mezcla se hicieron cultivos en “Agar Man, Rogosa y Sharpe” (Agar MR S, agar exclusivo para lactobacilos) y posteriormente el alimento fue depositado en los comederos (Lourenco *et al*, 2012)

Parámetros de producción.

El agua total ofrecida diariamente fue de 5000 ml., para cada uno de los grupos experimentales. El alimento proporcionado no era de origen comercial, ya que estos alimentos contienen antibiótico que podría causar efectos en el experimento. Durante el inicio del experimento, a cada grupo de animales se les proporcionó una cantidad de 1000 gr de alimento (y la cantidad de alimento ascendió a 1500 gr cuando ya no fueron suficientes 1000 gr), cada día se pesó el alimento que sobró en los comederos y fue anotado en la bitácora para su análisis. Durante la primera semana del experimento, el agua fue adicionada con vitaminas (Perusquia *et al*, 1985).

Tabla 2. Ingredientes contenidos en el alimento y su proporción (aproximada) respecto a un Kg.

Ingrediente	Cantidad gr
Sorgo (8.5%)	547.30
P. Soya (46%)	368.0
Aceite Vegetal	38.0
Ortofosfato	17.0
Calcio (38%)	14.0
Pigmento (20 gr/Kg)	0.0
Sal Refinada	3.3
DI-Metionina	3.3
Bicarbonato de Sodio	2.2
Premezcla Vitaminas	2.0
Cloruro de Colina (60%)	1.0
L-Lisina	2.3
Premezcla Mineral	0.60
Coccidiostato	0.0
Carophil Rojo	0.0
Antioxidante	0.15
L-Treonina	0.30
TOTAL (gr)	1000

Inoculación de la infección (*Salmonella paratyphi*)

Se utilizó una cepa de *Salmonella paratyphi*, la cual se inoculó a tres de los cuatro grupos de pollos (Control, 0.003[DB] y 0.03 [DA]) en un lapso de 10 días de haber sido adaptados. Se preparó 250ml de caldo peptonado en un matraz Erlenmeyer, a la cual se añadió 1ml de la sepa de *Salmonella paratyphi* con el fin de obtener UFC 1×10^9 para administrar 1ml a cada pollo de los grupos experimentales excepto al grupo testigo (Oto *et al*, 1999)

Sacrificios y necropsias

Se hicieron los sacrificios en la sala de necropsias del CIESA, los sacrificios fueron realizados a los 14, 18 y 21 días de haber iniciado el experimento, por el método físico de dislocación cervical; bajo la NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres, es una técnica que se ha utilizado durante muchos años la cual es efectiva y humanitaria. Para darle colocación al cadáver, se desarticularon los muslos a nivel de la articulación coxofemoral, posteriormente se retiró la piel de la región abdominal. Se hizo un corte en la pechuga caudal y se jaló hacia la parte superior para exponer las vísceras torácicas y abdominales. Se tomó el duodeno de los animales sacrificados, esta se tomó del asa duodenal, después se hizo un amarre con hilo de tal forma que el intestino tendrá forma de

Ú, se le inyectó formalina al 10% y se introdujo en un frasco de PET de 250ml con formalina. El yeyuno se tomó antes del divertículo de Meckel y se efectuó el mismo procedimiento como con el duodeno. El íleon se tomó antes de los ciegos y se efectuó el mismo procedimiento con los anteriores cortes. (Perusquia *et al*, 1985).

Histología

Los tejidos fueron sacados de los frascos previamente clasificados (ver sección de Sacrificios y Necropsias), se tomó solo una parte de cada sección intestinal, donde se procesó un total de 120 secciones de cada parte del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon). De cada sección del intestino se cortó un segmento de aproximadamente de 6 mm y se colocaron en cassettes histosettes (pequeñas cajas especializadas en histología, ya que están hechas de poliacetal y son resistentes a los solventes, sus dimensiones son: 40 x 28 x 6 mm), ya que estuvieron en los cassettes, se sumergieron en agua para eliminar el residuo del alimento contenido en las secciones intestinales, después los cassettes fueron llevados para iniciar el proceso de deshidratación y aclaración sumergiéndolos en alcoholes a distintas concentraciones. Posteriormente, se realizó la inclusión de los tejidos en parafina fundida, una vez que la parafina se solidificó, se hicieron cortes de 10 µm en un micrótopo. Los cortes fueron colocados en portaobjetos y teñidos con hematoxilina-eosina (HE) (Tapia *et al*, 2012).

Microscopia y mediciones

Se utilizó un microscopio Motic® modelo BA210 (con cámara incluida), este microscopio fue conectado a una computadora que tiene instalado el software Motic-Images Plus 2.0 en el Centro de Investigación en Recursos Bióticos (CIRB) de la Facultad de Ciencias de la UAEMéx. Una vez enfocada la imagen, se tomó la foto desde la computadora, la imagen debió ser guardada inmediatamente, con la cual se pudo empezar a trabajar con las mediciones de las vellosidades. Las mediciones fueron tomadas a partir de la capa muscular de la mucosa (Horst *et al*, 1971), con el objetivo 4x, haciendo mediciones de las longitudes de cada sección del intestino delgado, realizando un total de 1080 mediciones; 360 de duodeno, 360 de yeyuno y 360 de íleon, de las cuales 90 de las mediciones correspondían a cada uno de los diferentes grupos (Testigo, control, dosis baja [DB] y dosis alta [DA]), a su vez 30 mediciones corresponden a cada día de sacrificio.

Análisis estadísticos.

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA simple) para determinar las diferencias entre los tratamientos, además, un Modelo Lineal Generalizado para analizar cuales variables influirán en la variable dependiente (Petrie *et al.*, 2006), utilizando el programa Statgraphics Centurión XV.

Resultados

Parámetros de producción analizados

Consumo de alimento promedio

Como se puede observar en la gráfica (Figura 1), el consumo de alimento fue variado para los cuatro grupos sobre todo para el grupo dosis alta (DA), al día nueve el grupo DA, es el grupo que consume la menor cantidad de alimento, en el día 17 el consumo de alimento en el grupo DA es menor a comparación de los demás grupos donde puede estar influenciado por el estrés ocasionado por la infección *Salmonella paratyphi*. Por último se observa que el grupo control (C) es el que consumió mayor alimento que los demás grupos, estadísticamente se puede observar diferencias significativas ($P < 0,05$)

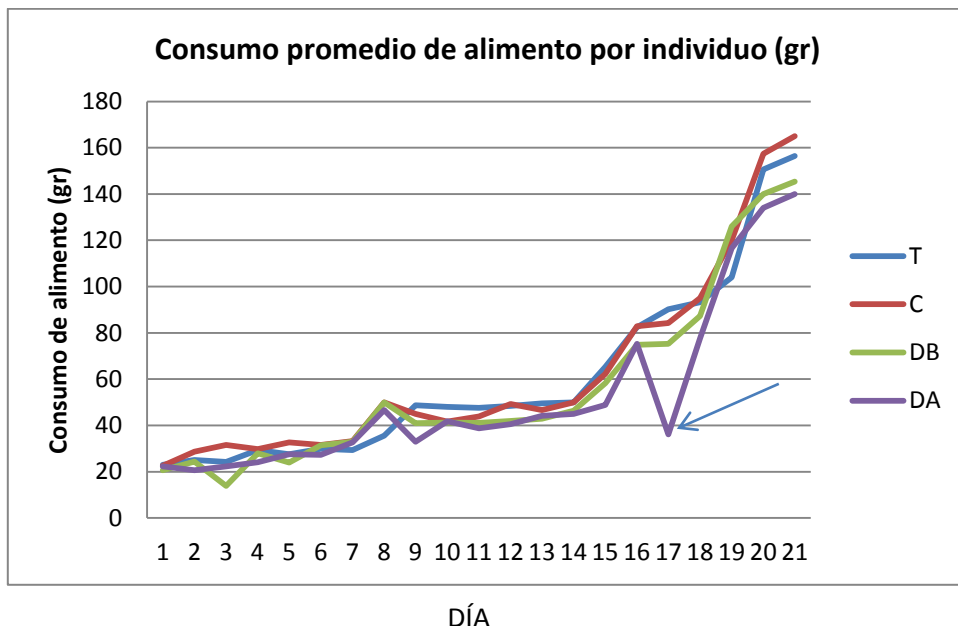


Figura 1. Consumo promedio de alimento a partir del inicio del tratamiento. Dónde la flecha indica las diferencias significativas en el grupo DA.

Consumo de agua promedio

Como se puede observar en la gráfica (figura 2), el consumo de agua promedio por individuo fue similar para los cuatro grupos excepto hasta el día 19 donde se puede observar que en el grupo C fue el que consumió más agua esto puede ser debido a los síntomas subclínicos de la *Salmonella paratyphi* en los cuales es la pérdida de electrolitos por deshidratación y por consecuencia el individuo tiene la

necesidad de saciar su sed a lo que también se puede observar el mismo caso en el día 20 donde el grupo infectado con salmonella dosis baja (DB) se puede observar que fue el grupo que tomó más agua debido a la necesidad por la pérdida de electrolitos, estadísticamente se pueden observar diferencias significativas ($P < 0,05$).

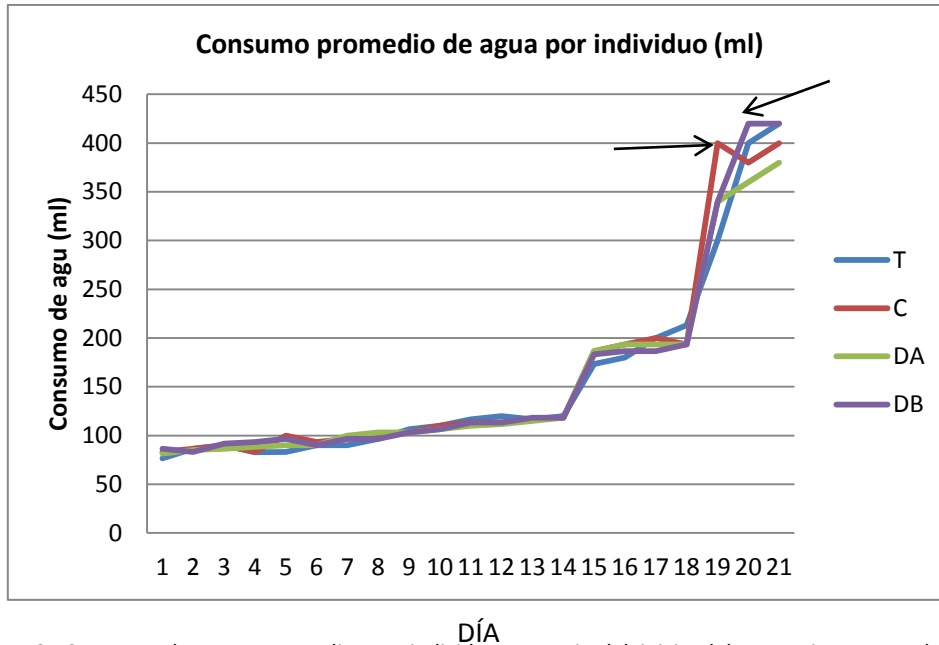


Figura 2. Consumo de agua promedio por individuo a partir del inicio del tratamiento. Donde las flechas indican diferencias significativas en los grupos C y DB

Peso individual promedio

Como se puede observar en la gráfica (figura 3), los pesos individuales por grupo, se observan diferencias de pesos entre los grupos. Donde se puede observar que el grupo testigo (T) es el grupo donde tiene más ganancia de pesos individuales a principio del experimento y es el más homogéneo hasta el final del experimento. En el día 19 se puede observar que el grupo con menor peso promedio fue el de DA, además se puede observar que los grupos infectados con salmonella tienen una diferencia de peso en comparación con el grupo Testigo. Al final del experimento se puede observar que el grupo control C tuvo un repunte en el peso promedio por individuo por lo que se le puede atribuir a que este grupo a pesar de la infección no estuvo bajo el estrés de la exclusión competitiva entre el lactobacilo y la infección de salmonella, estadísticamente existen diferencias significativas ($P < 0,05$).

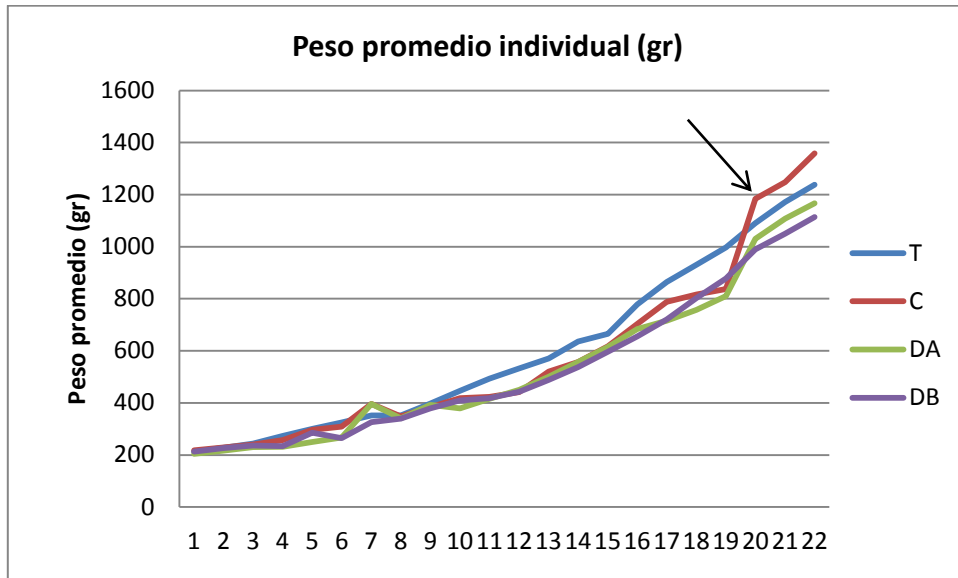


Figura 3. Peso promedio individual por grupo a partir del día en que comenzó el tratamiento. Donde la flecha indica las diferencias significativas en el grupo C

Estudios histológicos

Las mediciones de las longitudes de las vellosidades, fueron tomadas a partir de la capa muscular de la mucosa, debido a las diferentes formas que presentaron las vellosidades, se midieron formas completamente rectas y también vellosidades curvas, e incluso en forma de “S”, para las vellosidades que presentaban curvas, el programa Motic® contiene una opción que puede medir arcos, por lo que fue utilizado en estos casos.

Se midieron un total de 1080 vellosidades durante el experimento (360 de duodeno, 360 de yeyuno y 360 de íleon), en las cuales se observó que el duodeno siempre tuvo las mediciones más largas, seguido del yeyuno y las mediciones más cortas se encontraron en el íleon. Se pudo observar que el rango de las mediciones fue muy amplio en los grupos infectados con *Salmonella paratyphi* y tratados con *Lactobacillus farciminis*, en el segmento del yeyuno e íleon se obtuvo una mejora significativa bajo el efecto de la, DA donde en los segmentos del yeyuno e íleon se observaron efectos positivos del *Lactobacillus farciminis*.

Longitudes de las vellosidades del duodeno

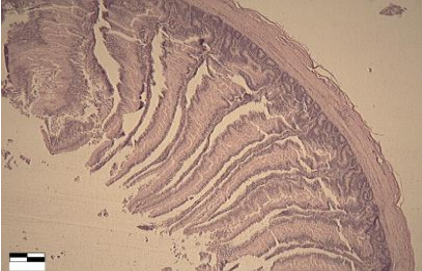
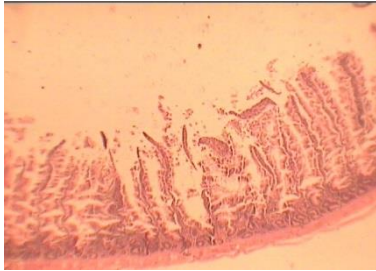
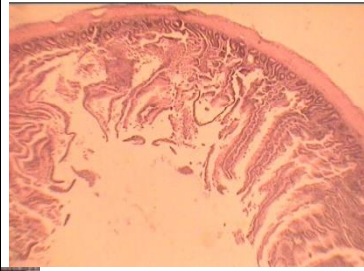
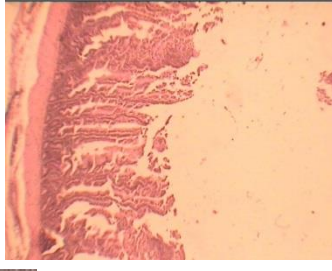
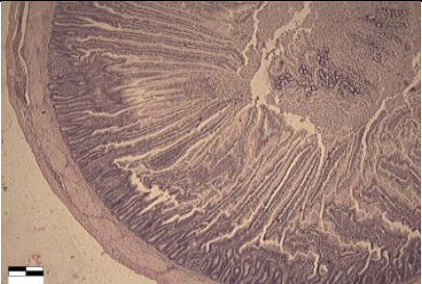
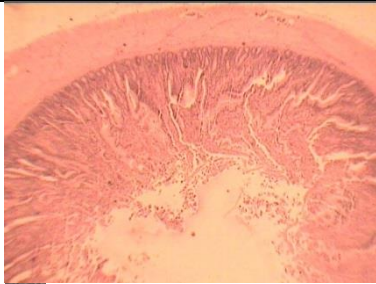
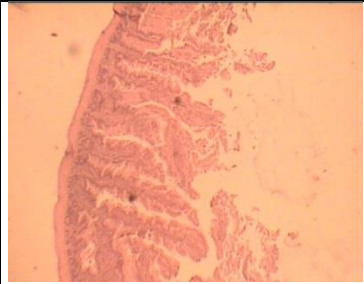
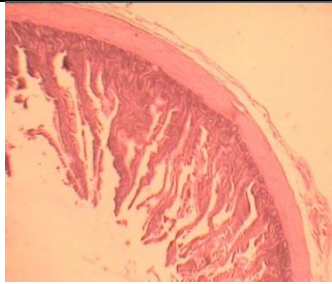
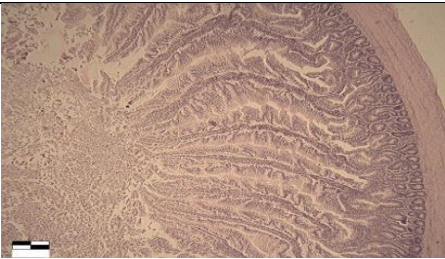
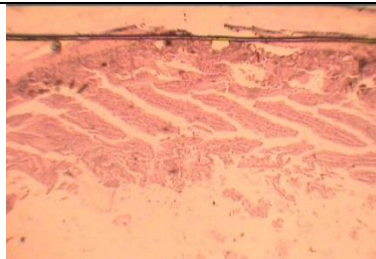
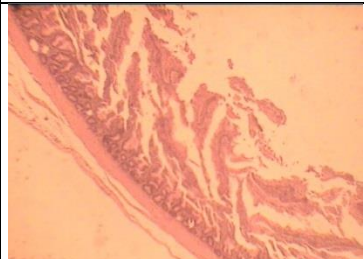
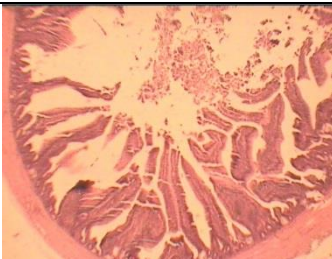
Los rangos de las mediciones de las vellosidades del duodeno (Tabla 3) fueron muy amplios para los cuatro grupos principalmente en el grupo testigo T. Durante el día 14 del tratamiento, la longitud más corta se encontró en el grupo DA y la más larga en el grupo T. Al tomar en cuenta el valor podemos observar que el grupo testigo T es el que muestra un valor mayor. En el día 18 de tratamiento el grupo DA tiene la longitud más corta. Mientras la medición más

larga se encuentra en el grupo Testigo. En el día 21 del tratamiento, el grupo DA tiene la longitud más corta, sin embargo al final del experimento la medición del grupo DA tuvo una medida más larga con respecto a los grupos infectados, C y DB por lo que se puede describir que el tratamiento de *Lactobacillus farciminis* tuvo un efecto ligeramente positivo con respecto a la infección de *Salmonella paratyphi*.

Duodeno			
Día 14 de tratamiento			
	Min (μm)	Max(μm)	$\bar{x}(\pm)S(\mu\text{m})$
Testigo	931.6	1479.75	1129.33 (180.1)
Control	340	1024	637.38 (161.3)
DB	277.6	1065.6	647.33 (209.78)
DA	219.2	1272.4	702.70 (313.84)
Día 18 del tratamiento			
Testigo	1057.7	1606.25	1306.3 (151.78)
Control	369.6	1003.6	665.73 (173.02)
DB	281.6	1145.6	693.48 (218.34)
DA	242	1040	689.84 (236.02)
Día 21 del tratamiento			
Testigo	840.1	1911.85	1415.7 (294.49)
Control	314.4	1202.8	772.84 (249.79)
DB	272.8	1166.8	710.64 (203.29)
DA	223.6	1358	785.37(246.01)

Tabla 3. Mediciones de las vellosidades del duodeno de los grupos de estudio en los diferentes días de tratamiento

Las vellosidades observadas (Tabla 4) en cada uno de los grupos, mostraron una morfología diferente. En el día 14, 18 y 21 se puede observar el grupo T el cual cuenta con vellosidades angostas, con un mejor desarrollo, con mayor recubrimiento de mucosidad y entre cada vellosidad un espacio muy corto. El grupo C a lo largo de los días (14, 18 y 21 días) mostró un menor desarrollo en cuanto al crecimiento longitudinal, se logra visualizar un menor número de vellosidades y los espacios entre cada una de estas es mayor con respecto al grupo T, en cuanto al recubrimiento de mucosa se observa ser menor. En el grupo DB a lo largo de los días las vellosidades logran tener una menor longitud, con respecto a los dos grupos anteriores además se observa un deficiente desarrollo de las vellosidades, los espacios entre cada vellosidad son aún más amplios que en el grupo C excepto al día 21 se observa una leve mejora en la morfología de las vellosidades donde se observa un mejor recubrimiento de mucosa en las vellosidades. En el grupo DA a lo largo de los días, las vellosidades se pueden observar un número mayor con respecto al grupo DB y menor con los grupos T y C. Podemos observar que el desarrollo de las vellosidades duodenales es mejor en los grupos T y DA sin embargo con respecto a los grupos con dosis de *Lactobacillus farciminis* e infectados con *Salmonella paratyphi* se observa que el grupo con DA tuvo una leve mejora ya que se puede observar un mejor recubrimiento de la mucosa con respecto al grupo C y dosis DB.

		DUODENO			
DÍA		TESTIGO	CONTROL	DOSIS BAJA	DOSIS ALTA
1 4					
1 8					
2 1					

La escala equivale a 100 μ m

Tabla 4. Cuadro comparativo de las vellosidades del duodeno de los grupos de estudio, en distintos días de tratamiento, vistas con un objetivo 4x. Tamaño de cada imagen 800x600.

La gráfica (figura 4) muestra las medias de las longitudes de las vellosidades del duodeno a lo largo del experimento. Durante el día 14 de tratamiento la media del grupo T se encuentra muy alejada de resto de los grupos, se puede observar una diferencia de media ente los grupos DB y DA. Se observa claramente que la media del grupo C, se empata con la media del grupo DB. Se le atribuye un efecto positivo con respecto a la infección de *Salmonella paratyphi* en la longitud de las vellosidades duodenales a los grupos que se les administró el lactobacilo, estos son el grupo DB y DA. El valor de $P= 0,0001 < 0,05$ lo que indica que existen diferencias significativas entre los grupos (Al día 18 del tratamiento el grupo T) mostró las longitudes de mayor tamaño, mientras el grupo control tiene la media más baja además se puede observar un empate entre la media del grupo DB y DA donde se puede observar, que el efecto del *Lactobacillus farciminis*, al día 18 presenta una leve mejora en contra de la *Salmonella paratyphi*. Sin embargo, estadísticamente existen diferencias significativas entre las longitudes de las vellosidades. Debido a que el valor de $P= 0,0001 < 0,05$ donde existen diferencias entre los grupos. En el día 21 de tratamiento se observa que la cepa de *Salmonella paratyphi* resulto agresiva donde se observa en el caso del grupo T, la media tiene una diferencia significativa con respecto a los grupos infectados, para el caso de DB hubo una respuesta negativa al tratamiento manifestándose en el día 21 con menor desarrollo de las vellosidades. En el caso del grupo DA se manifestó un crecimiento con la media más alta con respecto a los grupos infectados por lo que el tratamiento de *Lactobacillus farciminis* tuvo una leve mejora contra la infección de *Salmonella paratyphi*. Estadísticamente existen diferencias significativas entre los grupos debido al valor de $P=0.0001 < 0,05$

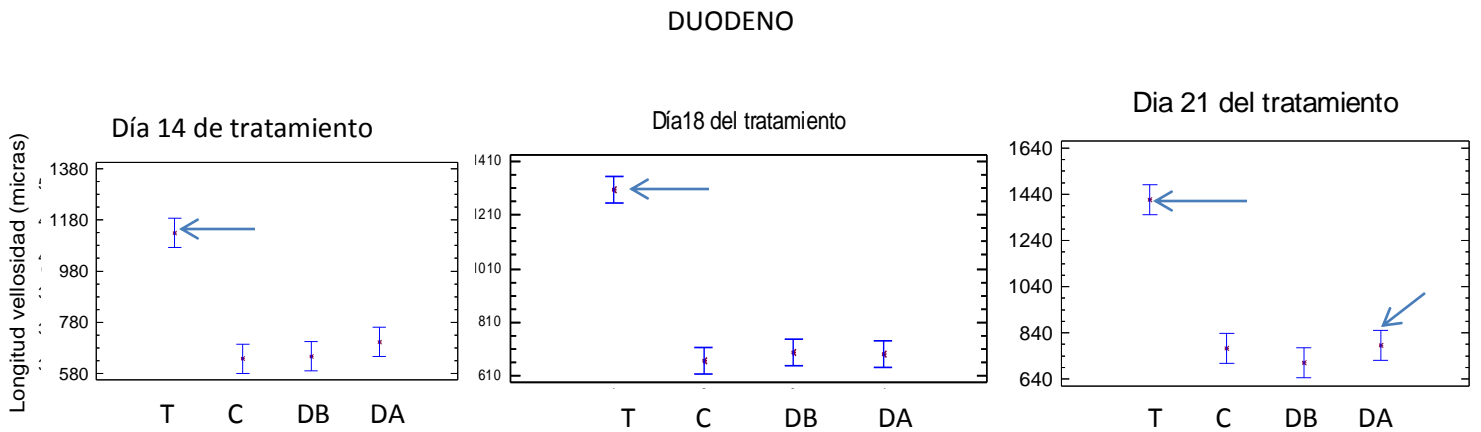


Figura 4. Comparación de las longitudes de las vellosidades del duodeno mostrando las medias de los tres diferentes días de tratamiento, donde las flechas indican las diferencias significativas entre los grupos.

Longitudes de las vellosidades del yeyuno

Los rangos de las mediciones de las vellosidades del yeyuno (figura 5) fueron muy amplios para los cuatro grupos principalmente en el grupo T. Durante el día 14 del tratamiento, la longitud más corta se encontró en el grupo dosis baja (DB) y la más larga en el grupo DA. Al tomar en cuenta el valor podemos observar que el grupo DA es el que muestra un valor mayor. En el día 18 de tratamiento el grupo C tiene la longitud más corta, mientras la medición más larga se encuentra en el grupo DA sin embargo el grupo control muestra un valor mayor. En el día 21 del tratamiento, el grupo DB tiene la longitud más corta, y al final del experimento la medición del grupo T tuvo una medición más larga. Con respecto a los grupos infectados el grupo C se observa con la mayor medida de vellosidades seguido de la DA por lo que se puede describir que el tratamiento de *Lactobacillus farciminis* en el yeyuno tuvo un efecto ligeramente positivo con respecto a la infección de *Salmonella paratyphi*.

Yeyuno			
Día 14 de tratamiento			
	Min(μm)	Max(μm)	$\bar{x}(\pm)S(\mu\text{m})$
Testigo	358.1	762.15	533.61 (100.66)
Control	267.2	633.2	412.94(100.94)
DB	206.4	749.6	483.28(129.169)
DA	302.4	813.2	606.37 (154.45)
Día 18 del tratamiento			
Testigo	365.2	945.8	476.1 (113.63)
Control	133.6	815.6	557.92(194.16)
DB	237.2	764.4	427.92 (104.019)
DA	198.8	984	506.10 (202.65)
Día 21 del tratamiento			
Testigo	612	1024.65	835.72 (118.36)
Control	189.6	972.4	617.32 (208.63)
DB	170.8	808.8	555.09 (177.79)
DA	209.6	952.8	531.37 (212.38)

Tabla 5. Mediciones de las vellosidades del yeyuno de los grupos de estudio en los diferentes días de tratamiento.

Las vellosidades observadas en cada uno de los grupos (tabla 6), mostraron una morfología diferente. En el grupo T a lo largo de los días de experimento se pueden observar vellosidades angostas, con un desarrollo de vellosidades con mayor mucosidad y entre cada vellosidad un espacio muy corto. El grupo C a lo largo de los días del experimento con respecto a ser uno de los grupos infectados mostró un menor desarrollo en cuanto al crecimiento longitudinal, además se logra visualizar un menor número de vellosidades, los espacios entre cada una de estas, y menor mucosidad en cuanto al desarrollo de vellosidades, parece ser menor que el del grupo T. En el grupo DB a lo largo de los días del experimento, las vellosidades tienen una menor longitud, con respecto a los dos grupos anteriores además se observa un deficiente desarrollo de las vellosidades, los espacios entre cada vellosidad son aún más amplios y existe un menor recubrimiento de mucosidad en las vellosidades que en el grupo C. En el grupo DA las vellosidades se puede observar una mejora con respecto a los grupos infectados donde se puede ver un número mayor de vellosidades y un mejor recubrimiento de la mucosidad. Podemos observar que el desarrollo de las vellosidades del yeyuno reaccionó favorablemente al tratamiento de *Lactobacillus farciminis* con respecto a la infección de *Salmonella paratyphi* en una dosis alta.


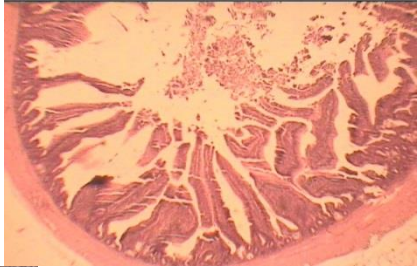
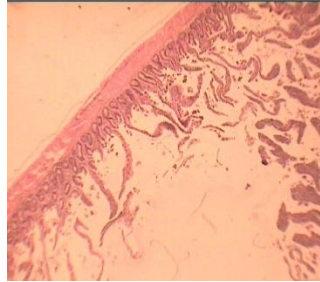
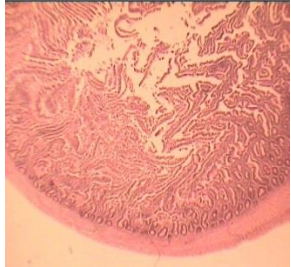
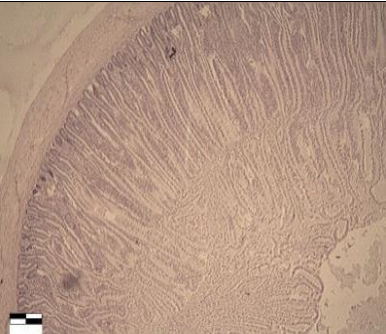
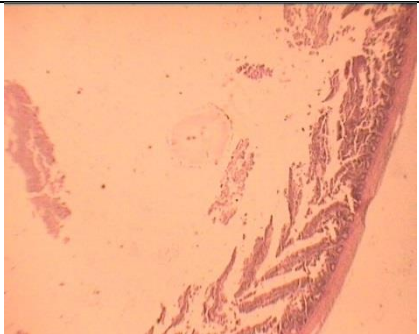
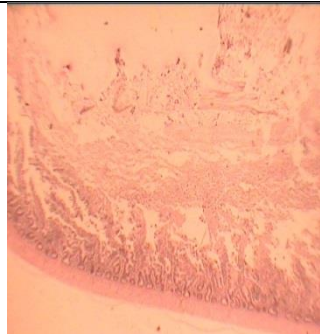
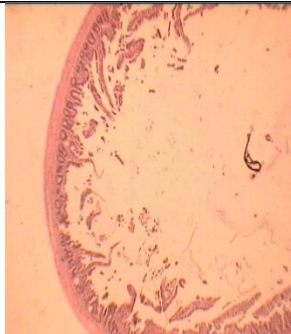
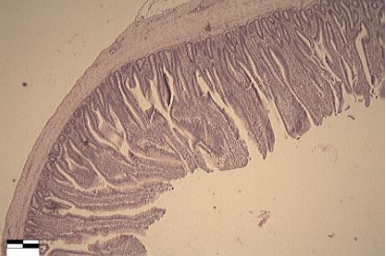
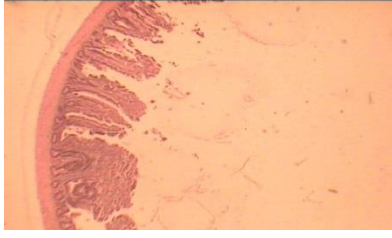
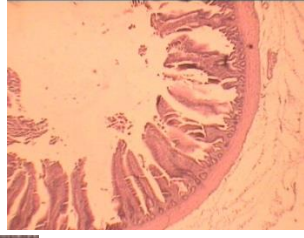


YEYUNO				
	TESTIGO	CONTROL	DOSIS BAJA	DOSIS ALTA
DÍA				
14				
18				
21				
 <p>La escala equivale a 100 μm</p>				

Tabla 6. Cuadro comparativo de las vellosidades del yeyuno de cada grupo de estudio, en diferentes días de tratamiento, vistas con un objetivo 4x. Tamaño de cada imagen 800x600

La gráfica (figura 5) muestra las medias de las longitudes de las vellosidades de la sección del yeyuno. Durante el día 14 de tratamiento la media del grupo DA se encuentra muy alejada de resto de los grupos, se puede observar una diferencia

de media ente los grupos C y DB. El efecto del grupo con DA de lactobacilos, se le atribuye un efecto positivo con respecto a la infección de *Salmonella paratyphi* en la longitud de las vellosidades del yeyuno a los grupos que se les administró el *Lactobacillus farciminis*, estos son el grupo DB y DA. El valor de $P=0,0001 < 0,05$ (GI 119) lo que indica que existen diferencias estadísticas entre los grupos. En el día 18 del tratamiento el grupo C mostró las longitudes de mayor tamaño, mientras el grupo DB tiene la media más baja además se puede observar que el efecto de la DA sigue con una constante mejora a través del tiempo de tratamiento con lactobacilos. Estadísticamente existen diferencias significativas entre las longitudes de las vellosidades. Debido a que el valor de $P=0,0184 < 0,05$ (GI 119) donde existen diferencias entre los grupos. En el día 21 de tratamiento se observa que la cepa de *Salmonella paratyphi* resulto agresiva donde se observa en el caso del grupo T la media tiene una diferencia significativa con respecto a los grupos infectados, para el caso de DB hubo una respuesta positiva al final del experimento con respecto al tratamiento manifestándose en el día 21 con una leve mejora en el desarrollo de las vellosidades. En el caso del grupo DA se manifestó un crecimiento con la media más baja al día 21 con respecto a los grupos infectados. Sin embargo a través del tiempo de tratamiento se puede observar una mejora constante con respecto a los días del experimento. Estadísticamente existen diferencias significativas entre los grupos debido a que el valor de $P=0,0001 < 0,05$ (GI 119).

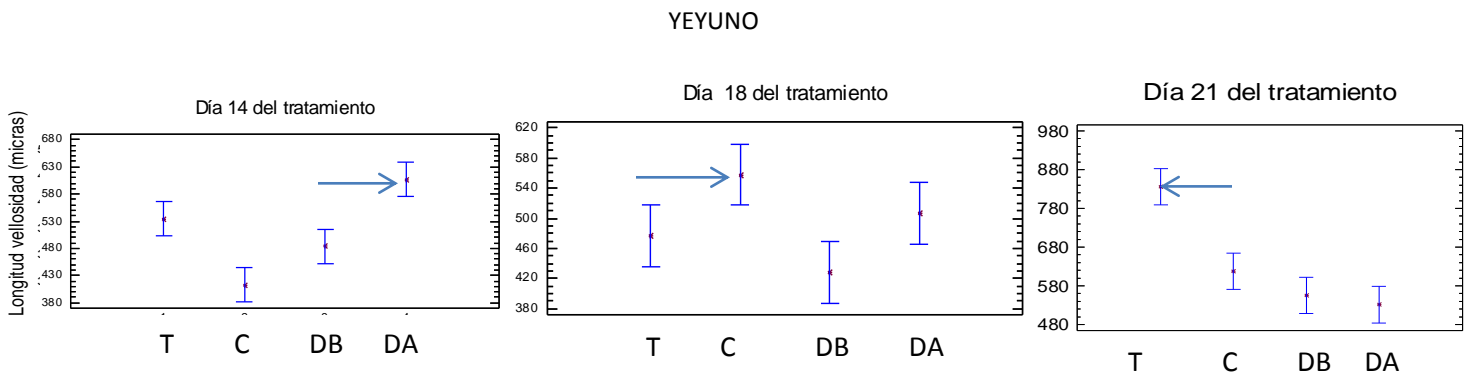


Figura 5. Comparación de las vellosidades del yeyuno mostrando las medias de los tres diferentes días de tratamiento donde, las flechas indican las diferencias significativas entre los grupos

Longitudes de las vellosidades del íleon

Los rangos de las mediciones de las vellosidades del íleon (Tabla 7) fueron muy amplios para los cuatro grupos. Durante el día 14 del tratamiento, la longitud más corta se encontró en el grupo DA y la más larga en el grupo T. Al tomar en cuenta el valor de podemos observar que el grupo T es el que muestra un valor mayor. En el día 18 de tratamiento el grupo DA tiene la longitud más corta, al igual

de tener medición más alta, sin embargo el grupo T muestra un valor mayor. En el día 21 del tratamiento, el grupo DB tiene la longitud más corta, sin embargo al final del experimento la medición del grupo C tuvo una medición más larga. Por otro lado con respecto a los grupos tratados con *Lactobacillus farciminis* e infectados con *Salmonella paratyphi* se pudo observar que el grupo DA tuvo un efecto positivo a través del tiempo del experimento.

Íleon			
Día 14 de tratamiento			
	Min(μm)	Max(μm)	$\bar{x}(\pm)S(\mu\text{m})$
Testigo	301.3	697.1	453.58 (112.56)
Control	272.4	704.8	398.00 (105.14)
DB	249.6	762.8	434.60 (148.91)
DA	181.6	602	331.37 (110.39)
Día 18 del tratamiento			
Testigo	266.25	551.15	414.79 (72.8)
Control	177.6	599.2	338.53 (106.57)
DB	168.4	629.2	395.53 (118.75)
DA	94.8	613.6	334.69 (142.92)
Día 21 del tratamiento			
Testigo	258.35	659.25	421.56 (105.98)
Control	192.4	820	415.00 (121.49)
DB	155.6	652.4	356.97 (106.20)
DA	266.8	703.6	461.21 (122.08)

Tabla 7. Mediciones de las vellosidades del íleon de los grupos de estudio en los diferentes días de tratamiento.

Las vellosidades observadas en cada uno de los grupos (tabla 8), mostraron una morfología diferente. En el grupo T a lo largo del experimento (14, 18 y 21 días) se pueden observar mayor número de vellosidades, con mayor recubrimiento de mucosidad y entre cada vellosidad un espacio muy corto. El grupo C a lo largo del experimento al ser uno de los grupos infectados mostró un buen desarrollo en cuanto al crecimiento longitudinal, además se logra visualizar menor número de vellosidades con respecto al grupo testigo y tener el mayor espacios entre cada una de estas, además de tener un menor recubrimiento de mucosidad. En el grupo DB, a lo largo del experimento las vellosidades tienen una mejor longitud, con respecto a los dos grupos anteriores además se observa un mínimo incremento en el desarrollo de las vellosidades, los espacios entre cada vellosidad más cortos que en el grupo C y tener mejor recubrimiento de la capa de la mucosidad. En el grupo DA a lo largo del experimento las vellosidades se puede observar una mejora con respecto a los grupos infectados donde se puede ver un número mayor de vellosidades con respecto al grupo DB y menor con el grupo T. Además de estar más integra la pared de la mucosa, Podemos observar que el desarrollo de las vellosidades del íleon reaccionó de manera positiva al tratamiento con DA de *Lactobacillus farciminis* en contra de la cepa de *Salmonella paratyphi*.

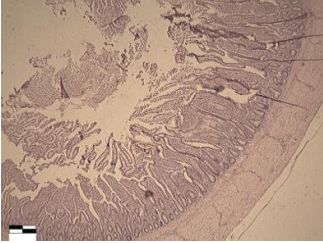
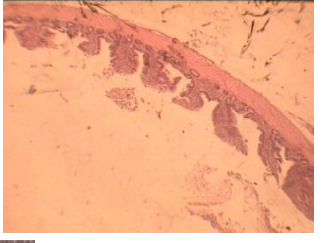
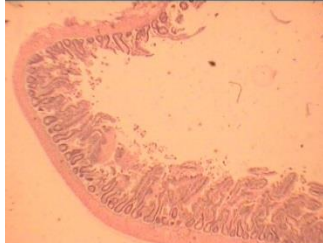

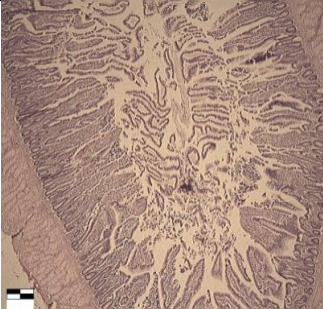
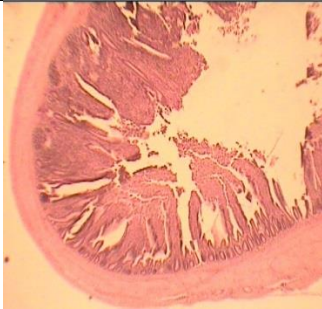
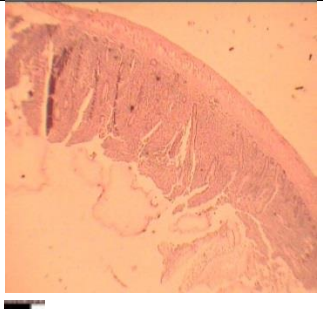
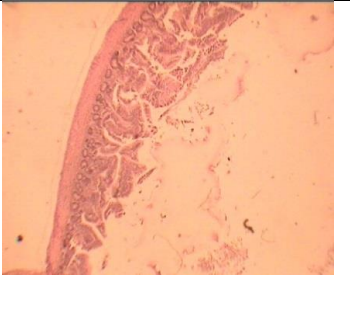
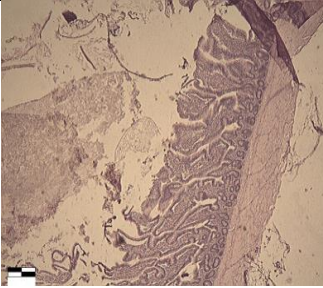
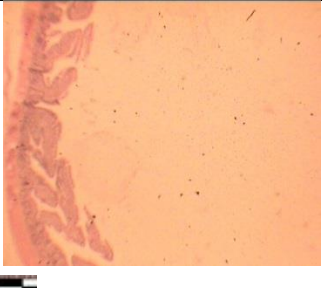
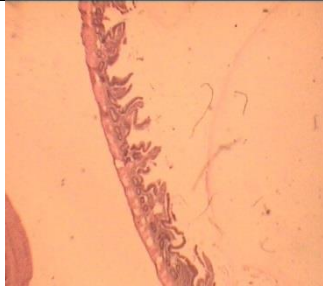
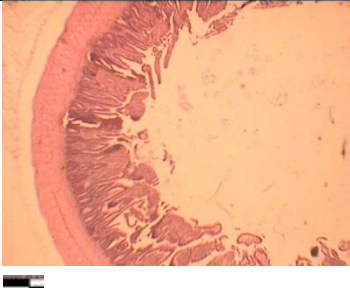

		ILEON			
D	DÍA	TESTIGO	CONTROL	DOSIS BAJA	DOSIS ALTA
	1 4				
	1 8				
	2 1				
		 <p>La escala equivale a 100 μm</p>			

Tabla 8. Cuadro comparativo de las vellosidades del ileon de los grupos de estudio, en cada día de tratamiento, vistas con un objetivo 4x. Tamaño de cada imagen 800x600

La gráfica (figura 6) muestra las medias de las longitudes de las vellosidades de la sección del íleon. Durante el día 14 de tratamiento la media del grupo DA se encuentra por debajo del resto de los grupos, se puede observar una mínima diferencia de media entre los grupos C y DB. El efecto del grupo con DB y DA de *Lactobacillus farciminis*, se le atribuye un efecto positivo con respecto a la infección de *Salmonella paratyphi*. En cuanto a los datos estadísticos de longitud de las vellosidades del íleon durante el día 14 de tratamiento los cuatro grupos obtuvieron un valor de $P=0.008 < 0,05$ (GI 119) lo que indica que existen diferencias significativas entre los grupos). En el día 18 del tratamiento el grupo C mostró las longitudes de similar tamaño, a las del grupo DA donde sus medias empatan. Mientras el grupo DB sigue con una constante mejora a través del tiempo de tratamiento con lactobacilos. Sin embargo, estadísticamente existen diferencias significativas entre las longitudes de las vellosidades. Debido a que el valor de $P=0,004 < 0,05$ (GI 119) donde existen diferencias entre los grupos). En el día 21 de tratamiento se observa que la cepa de *Salmonella paratyphi* resulto agresiva sin embargo se puede observar una notable mejora, para el caso de DB y DA donde hubo una respuesta positiva al final del experimento con respecto al tratamiento del *Lactobacillus farciminis*. En el caso del grupo DA se manifestó un crecimiento con la media más alta hasta día 21 con respecto a los grupos infectados. Estadísticamente existen diferencias significativas entre los grupos donde $P=0,006 < 0,05$ (GI 119)

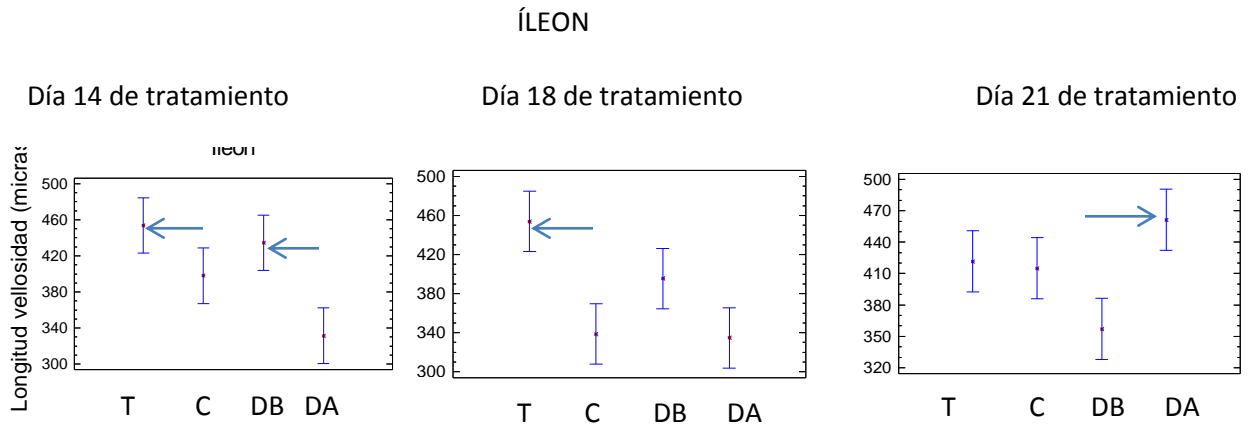


Figura 6. Comparación de las longitudes de las vellosidades del íleon mostrando las medias de los tres diferentes días de tratamiento, donde las flechas marcan las diferencias significativas entre los grupos.

Modelo lineal generalizado (MGL)

El modelo lineal generalizado, compara cada una de las variables independientes con la variable dependiente.

Longitud de vellosidad vs tratamiento

Se puede observar en la gráfica (Figura 7) que las longitudes de las vellosidades más largas (incluyendo el grupo testigo sin infección ni tratamiento) se encuentra en el grupo Testigo además se puede observar que no se observa alguna diferencia entre los grupos infectados por lo que la infección y el tratamiento fueron positivos al observarse en la gráfica que se generó un estrés entre los grupos control, dosis baja (DB) y dosis alta (DA). Estadísticamente se observan diferencias, por lo que $P=0.0001 < 0.05$.

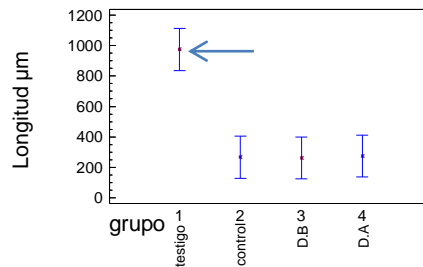


Figura 7. Medias de las longitudes de las vellosidades en cada tratamiento donde la flecha muestra las diferencias significativas en el grupo testigo

Longitud de vellosidad vs sección intestinal

Se puede observar en la gráfica (figura 8) que la sección intestinal que tuvo las longitudes más largas fue el duodeno, seguida del yeyuno y por último el íleon. Debido a la fisiología de cada sección, resulta lógico. Ya que la longitud de las vellosidades del duodeno son más largas y las íleon las más cortas. El valor de $P=0.02 < 0,05$.

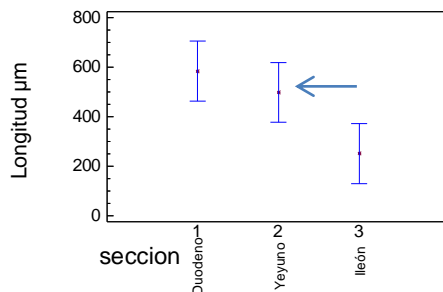


Figura 8. Medias de las longitudes vs la sección de intestino. Donde la flecha muestra las diferencias significativas entre los segmentos duodeno yeyuno e íleon

Longitud de vellosidad vs día de tratamiento

Durante el experimento, se puede observar en la gráfica (figura 9) que el factor tiempo (día de tratamiento y día de sacrificio) tiene influencia sobre la longitud de las vellosidades. El día 14 de tratamiento, se ve menor favorecido que el día 18 y el día 21, donde el día 18 es el que presenta las longitudes más largas. Esto podría indicar que el efecto del *Lactobacilo farciminis* no es el mismo con el paso del tiempo con respecto a la infección de *Salmonella paratyphi*. No existen diferencias entre los grupos el valor de $P=0.46 > 0,05$.

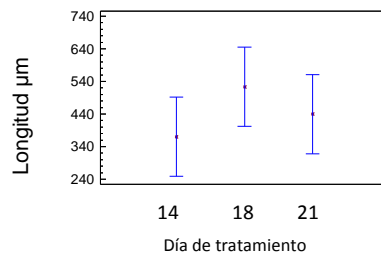


Figura 9. Medias de las longitudes vs día de tratamiento. Donde no existen diferencias significativas.

Discusión

Los probióticos son definidos como un suplemento alimenticio que benefician la salud del hospedero. Generalmente es considerado que éstos llevan a cabo un mejoramiento en el balance microbial. Sin embargo cada vez es más claro el beneficio que estos tienen en la salud vía inmunidad. El tracto gastrointestinal cumple varias funciones tales como la absorción y digestión de nutrientes. Una de estas es que el intestino es hospedero de una compleja mezcla de microbios, estos son parte de nuestra microbiota, los cuales juegan un papel importante en la salud. *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* son una fuerte asociación que mantiene el balance microbial de los intestinos (Cruz, 2009; Milian, 2005).

Gran parte del sistema inmune está dedicado a proteger el tracto gastrointestinal, por eso existen sistemas adicionales que protegen el sistema digestivo. Un elemento clave en la defensa del sistema digestivo es la microbiota endógena. Las bacterias benéficas compiten con los patógenos por los sitios de adhesión y por nutrientes, es por ello que se necesita de nuevos enfoques para limitar la concentración de patógenos en el tracto gastrointestinal (Spring, 2004). Por esta razón es importante el uso de probióticos para desarrollar en el ave una colonización microbiológica efectiva del tracto digestivo (Moreno, 2009). Pero este equilibrio se puede perturbar, cuando el ave sufre agresiones: estrés, desequilibrios nutricionales, vacunaciones, suministro masivo de antibióticos y sustancias que perturban el valor del pH del intestino. Entonces, los factores que

perturban el equilibrio de la flora intestinal, tienen una repercusión en la salud del animal (Botero, 2008).

Los lactobacilos crecen bien en medios ligeramente ácidos, con pH inicial de 6,4 - 4,5. La mayoría de las cepas de *Lactobacillus* son principalmente aerotolerantes; su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerofílicas o anaeróbicas. La mayor parte de los lactobacilos son mesófilos, con un límite superior de 40°C. Aunque su rango de temperaturas para el crecimiento oscila entre 2° y 53°C. Los miembros de este género transforman la glucosa y las hexosas aldehídicas similares, los carbohidratos que producen estos azúcares simples y los alcoholes polihidroxílicos en ácido láctico por homofermentación o bien, en ácido láctico y otros productos finales adicionales como ácido acético, etanol, dióxido de carbono, ácido fórmico y ácido succínico (Boonkumklao *et al.*, 2006)

Patterson y Burkholder, (2003) reportaron que los microorganismos como lactobacilos pueden actuar en la inhibición de patógenos a través de mecanismos como la competencia por sitios de unión o por nutrientes, la producción de compuestos tóxicos y la modulación del sistema inmunitario. Las bacterias del género *Lactobacillus* spp. han demostrado ser eficaces en la reducción de la presencia de *Salmonella minnesota*.

Los brotes de salmonelosis en los seres humanos se asocian a menudo con el consumo de huevos y carne de aves de corral contaminadas con esta bacteria (Molbak y Neimann, 2002). Por esta razón, la cadena avícola ha implantado estrictas medidas de bioseguridad destinadas a controlar la *Salmonella* spp., en las parvadas y reducir el potencial de contaminación de sus productos. Otras herramientas que también se utilizan para este propósito son el uso de probióticos, prebióticos, extractos de plantas y ácidos orgánicos en la dieta o en el agua potable destinada a los animales (Van Immerseel *et al.*, 2006). Las serovariedades no tíficas como *Salmonella paratyphi*, pueden causar septicemia, estado portador o infecciones como meningitis, artritis, osteomielitis, colangitis, neumonía, arteritis, endocarditis o infecciones del aparato urinario (Uribe *et al.*, 2006).

La adaptación del pollito al periodo post eclosión junto con diversos factores de estrés, derivados de las prácticas utilizadas en la producción intensiva de pollos de engorde, puede debilitar la función inmune y así la predisposición a los pollos a la colonización del tracto gastrointestinal por patógenos bacterianos, lo cual representa una amenaza para la salud de las aves. Para atenuar estas dificultades, las dietas son suplementadas con probióticos, los cuales han mostrado ser efectivos en la disminución de los trastornos diarreicos y en la promoción del crecimiento animal (Armstrong, 1986; Parker y Armstrong, 1987)

Lactobacillus farciminis ha sido usado como probiótico en cerdos hasta el destete, durante ese experimento se observó un incremento en los parámetros productivos (EFSA, 2008; Piloto *et al.*, 2010); también ha sido utilizado en ratas como tratamiento para reducir la inflamación del colon por estrés, los resultados fueron favorables ya que al parecer este lactobacilo previene la inflamación y la hipersensibilidad (Ait-belgnaoui *et al.*, 2009); en avicultura solamente ha sido reportado utilizado en una dosis veinte veces más alta sobre la mínima requerida, verificando que este probiótico no causa daño alguno sobre el sistema gastrointestinal de las aves, pero sin ningún dato sobre su influencia en la salud intestinal o los parámetros productivos (EFSA, 2006). Es por eso que se decidió formar cuatro grupos, en los que el grupo testigo no se le administro dosis de *Lactobacillus farciminis* ni se inoculo con infección de *Salmonella paratyphi* esto con el fin de tener una comparación de aves sanas con respecto a los demás grupos infectados. El grupo control (C) solo se le infecto con *Salmonella paratyphi* sin administrar tratamiento con lactobacilos con la finalidad de poder comparar un grupo infectado sin tratamiento con respecto a los grupos dosis baja y dosis alta los cuales se les administro el *Lactobacillus farciminis* y se les inoculo con *Salmonella paratyphi* con la finalidad de observar el efecto del lactobacilo contra una infección de *Salmonella paratyphi*. Smirnov *et al.* (2005) investigaron en pollos de engorde el efecto de un antibiótico promotor del crecimiento (avilamicina, 5 mg/kg de alimento) y de un suplemento probiótico (constituido por *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum* y *Enterococcus faecium*, 2 g/kg de alimento y concentración celular mínima de $1,0 \times 10^8$ UFC/g) en la población microbiana del intestino y la dinámica de la mucina. Cuando se compara con el grupo control (dieta sin antibióticos o probióticos), la dieta con antibiótico indujo a: un incremento de *Bifidobacterium spp.* En el duodeno, un aumento de la densidad de las células bordes en el yeyuno e íleon y menor nivel de glicoproteínas de la mucosa en el duodeno. Por su parte, las aves que se trataron con el probiótico: incrementaron la población de *Lactobacillus spp.* En el íleon, provocaron el engrosamiento significativo del área de las células bordes a través del intestino y elevaron los niveles de glicoproteínas de la mucosa en el yeyuno.

Se analizaron en los cuatro grupos el consumo de agua, consumo de alimento y ganancia de peso individual. Lo cual se obtuvo como resultado que existen diferencias significativas. El grupo testigo (T) se mantuvo con las mediciones más altas probablemente porque se mantuvieron las condiciones sanitarias correctas y no se indujo a un estrés del sistema inmune de los pollos. Sin embargo en los grupos de dosis alta (DA) y dosis baja (DB) con *Lactobacillus farciminis* decreció el consumo de alimento y de agua, probablemente por el estrés generado por las dosis de *Lactobacillus farciminis* y la inoculación de *Salmonella Paratyphi* ya que

se puede observar el efecto en los parámetros de producción debido a que la cepa inoculada de *Salmonella paratyphi* es considerada una enfermedad subclínica esto quiere decir que la sintomatología no es tan notoria ni tan agresiva con el organismo portador pero puede alterar el comportamiento de la obtención de nutrientes como la ingesta de alimento y el consumo de agua. Por lo que debe existir permanentemente un equilibrio entre el tipo de flora que se genera, la integridad de la mucosa intestinal y la dieta de los animales. Si se rompe este equilibrio, puede llevar a una lesión o enfermedad con esto conlleva a una pérdida en los parámetros de producción. (Sansalome, 2008).

Los resultados obtenidos de la morfometría de las vellosidades de diferentes segmentos (duodeno, yeyuno e íleon) donde la tasa de crecimiento es mayor en la sección duodenal, decreciendo progresivamente a medida que se acerca al colon. De hecho el duodeno muestra una mayor tasa de crecimiento temprano que el yeyuno e íleon (Barnes *et al.*, 1972). En la sección del duodeno se pudo observar que el efecto de *Lactobacillus farciminis* donde se obtuvo la respuesta esperada ya que en las mediciones los grupos con dosis de *Lactobacilos farciminis* están muy por debajo del grupo testigo (T). Un estudio de Santín *et al.*, en el 2001 y Artiga en el 2002, donde obtienen longitudes de vellosidades que van de entre 1900 y 1987 μm en la sección del duodeno. Por lo que también se puede observar en los cortes histológicos y las mediciones la influencia de la infección con *Salmonella paratyphi* debido a la disminución de las mediciones de las vellosidades y a los espacios entre ellas y el daño, como la disminución de la mucosa alrededor de las vellosidades probablemente la infección de la *Salmonella paratyphi* en el segmento del duodeno tenga mejor adaptación y fijación mientras que el lactobacilo necesite una mayor dosis para contrarrestar el efecto de la *Salmonella paratyphi*. Los microorganismos que se utilizan como probióticos se caracterizan por producir diferentes sustancias que inhiben a los microorganismos patógenos, estos últimos poseen la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal de los animales y causar enfermedades entéricas (Edelman *et al.*, 2003), ya que en los grupos infectados sobre todo en el grupo dosis baja (DB) se puede observar un mínimo recubrimiento de mucosa, una mayor separación entre cada vellosidad y tener vellosidades menos angostas, lo cual se puede comparar con el estado óptimo del grupo testigo probablemente fue debido a que los espacios de adhesión fueron ocupados por la infección de *Salmonella paratyphi* y el estrés al sistema inmune que causo la adición del lactobacilo a la microbiota intestinal por lo que, los factores estresantes pueden interferir en el establecimiento de una microbiota gastrointestinal normal (Vandelle *et al.*, 1990) y provocar mayor incidencia de enfermedades y más alta mortalidad (Álvarez, 1995). Al observar las gráficas de las mediciones de las vellosidades conforme paso el tiempo y los

diferentes días de sacrificio se puede observar que del día 14 de sacrificio al 21 la dosis baja (DB) no tuvo un efecto positivo frente a la infección de *Salmonella paratyphi* mientras que la dosis alta (DA) tuvo un efecto ligeramente positivo ya que al comparar con el grupo control (C) el cual no tiene tratamiento con *Lactobacillus farciminis* pero infectado con *Salmonella paratyphi*, el *Lactobacillus farciminis* en una dosis alta se adhirió ligeramente mejor proporción que la salmonella en el día 21, sin embargo, las mediciones fueron muy bajas en comparación con el grupo testigo (T) probablemente por el daño causado de la salmonella y el mínimo efecto positivo del lactobacilo en el segmento del duodeno. En un estudio usando un probiótico obtenido a partir del epitelio de la mucosa del ciego de pollos. Donde en un estudio el probiótico utilizado fue destacado como una biota acción del controlador o inhibidor de microorganismos patógenos, las aves mostraron un mejor desempeño en comparación con los tratamientos de control. En general, independientemente de los tratamientos empleados en este experimento, se produjo mejores tasas de crecimiento de las aves en relación a la línea estándar que se utiliza (Rossi *et al.*, 2005).

En los grupos del segmento yeyuno se puede observar los grupos con dosis de *Lactobacillus farciminis* e infectados con *Salmonella paratyphi* tuvieron un efecto significativo incluso se puede ver los días de tratamiento del 14 al 18 se obtuvieron valores más altos que el grupo testigo probablemente porque el *Lactobacillus farciminis* se estableció mejor en los primeros días de consumo, pero al pasar el tiempo el efecto de la *Salmonella paratyphi* tuvo un efecto negativo en el crecimiento de las vellosidades ya que este tipo de *Salmonella paratyphi* no es tan agresiva como las variedades tíficas, sin embargo, se puede observar en los cortes histológicos que las dosis alta (DA) y baja (DB) al final del experimento se visualizan vellosidades más angostas incluso con mayor recubrimiento de la mucosa pero con menor crecimiento con respecto al grupo testigo (T) probablemente el efecto del probiótico mejore a la acción de secreción de mucosa y se adhiera mejor al segmento del yeyuno sin embargo se puede observar en el día 21 que el grupo control (C) tiene mediciones más altas que las del grupo dosis alta (DA) pero al comparar los cortes histológicos el grupo de dosis alta (DA) tiene mayor recubrimiento en la mucosa por lo que el lactobacilo probablemente se enfoque a ser un auxiliar en la secreción de mucosa y engrosamiento de las vellosidades aun así el efecto de la salmonella es visible por lo que se debería aumentar la dosis de los lactobacilos. Además, los probióticos se describen como suplementos de microorganismos vivos que benefician la salud de los animales a través del equilibrio del tracto intestinal, tienen la capacidad de unirse a la pared intestinal, inhibiendo la adhesión de las bacterias patógenas (Brooker y Fuller, 1975). Estas bacterias también se pueden encontrar en grandes cantidades en el

intestino delgado lo cual mejora el engrosamiento de las vellosidades en el segmento del yeyuno, donde también se asocian con la inmunomodulación (Brooker *et al.*, 2011).

En los resultados analizados del segmento del íleon se puede observar en los grupos con tratamiento de lactobacilo e infectados con *Salmonella paratyphi* el día 14 la dosis alta tuvo una mínima repuesta probablemente generado por el estrés de la infección y la competencia por los espacios de adherencia en las vellosidades. Sin embargo, los días 18 al 21 se obtuvo una respuesta favorable del *Lactobacillus farciminis* ya que se muestran valores más altos en las mediciones de los grupos dosis baja (DB) y dosis alta (DA) probablemente el lactobacilo tuvo un medio donde favoreció a su crecimiento mejorando su adherencia a las vellosidades y teniendo éxito en la exclusión competitiva. La adherencia a la mucosa intestinal es una de las propiedades más importantes de los microorganismos seleccionados como probióticos. Esta habilidad tiene gran influencia en la defensa del organismo, ya que las bacterias beneficiosas conforman una barrera de exclusión a los microorganismos patógenos, fundamentalmente, por la ocupación de los sitios de adhesión y la estimulación del sistema inmune. De ahí que, una característica deseable de los probióticos, es que al menos colonicen temporalmente el TGI (tracto gastro intestinal) y si existe una interacción estrecha con la mucosa, aumentará su efecto (Ouwehand *et al.*, 1999). En la gráfica del íleon del día 21 de tratamiento se puede observar que el grupo dosis alta (DA) tuvo mayores diferencia entre los grupos incluso por encima del grupo testigo (T) lo que supone una efectividad de las dosis frente a una infección de salmonella además se puede observar vellosidades más integras con mucosa y espacios más cortos entre ellas además de tener una morfología más sana comparada con los demás grupos. Hay dos tipos de vellosidades en el duodeno y el íleon de pollos, las vellosidades en forma de dedo (finger like) y en forma de flecha (narrow plate-like) que presentan una disposición de zigzag. Las primeras son predominantes a una edad temprana, tanto que las segundas serán predominantes en aves con mayor desarrollo epitelial. La disposición en zigzag está relacionada con la función digestiva, ya que retrasa el paso de la digesta sobre la mucosa digestiva mejorando su contacto con el epitelio y es además característica de animales en buen estado de salud (Gerard *et al.*, 2008). En las gráficas del MLG se puede observar que la única diferencia de la longitud de las vellosidades y de los grupos es el grupo testigo tal vez por ser el único grupo que no tuvo un estrés en su sistema inmune además se trató de tener las medidas sanitarias apropiadas, esto en referencia con la exclusión competitiva entre el *Lactobacillus farciminis* y la infección de la *Salmonella paratyphi*, ya que un microorganismo patógeno en acción actúa un probiótico, si este no es tóxico o

causa enfermedad el probiótico debe ser capaz de resistir los ácidos y la bilis, así como el proceso de digestión del estómago del animal, el individuo que es capaz de establecerse y colonizar los intestinos; es cuando el probiótico establece la habilidad de inhibir el crecimiento de los patógenos (Rodríguez *et al.*, 2012). Mientras que los resultados de longitud de vellosidad y sección intestinal la diferencia fue normal ya que la morfología del intestino delgado desde el duodeno va decreciendo la longitud y el número de vellosidades hasta llegar al íleon (Barnes *et al.*, 1972). En la gráfica de longitud de vellosidad y día de tratamiento se observa que la mayor mediciones se encuentran al día 18 probablemente es la fase donde el *Lactobacillus farciminis* tiene una mejor adherencia a los diferentes segmentos del intestino donde al día 21 del experimento se necesita elevar la dosis para consolidar su adherencia y un efecto prolongado de *Lactobacillus farciminis* sin embargo también se pudo ver el efecto que tuvo la *Salmonella paratyphi* ya que al no ser tan agresiva como otras variedades de *Salmonella* se observó su efectos subclínicos en los segmentos del intestino, las mediciones de las vellosidades y en la morfología de las mismas.

Conclusiones

Este trabajo demostró que el efecto del *Lactobacillus farciminis* contra una cepa de *Salmonella paratyphi* tuvo un efecto positivo en el segmento del duodeno yeyuno e íleon.

También se observó que las dosis usadas de *Lactobacillus farciminis* no son suficientes para mantener estable la acción continua frente a una infección de *Salmonella paratyphi*

El efecto de la *Salmonella paratyphi* mermó la salud intestinal de los segmentos del ave ya que al ser comparada con el grupo testigo se puede observar la disminución notoria de las medidas de las vellosidades

Se debe continuar estudiando el efecto de *Lactobacillus farciminis* en aves de corral con una mayor dosis ofrecida que en este estudio, ya que al ser desafiado con *Salmonella paratyphi* se pudo observar una exclusión competitiva en la cual la infección interfirió con la salud intestinal de los pollos.

LITERATURA CITADA

Aguavil, Enríquez Juan Carlos (2012) Evaluación del efecto de un probiótico nativo elaborado en base a lact- *Bacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* sobre el sistema gastrointestinal en pollos broiler ross-308 en Santo Domingo de los Tsachilas. Informe técnico del proyecto de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de ingeniero agropecuario. P-22

Álvarez, P. 1995. Los probióticos como complemento alimenticio. Mundo Ganadero 11:38

Armstrong, D.G. 1986. Gut active growth promoters. En: Control and manipulation of animal growth. Editado por P. J. Buttery, D. Lindsay y N: B: Haymes Butterworth, London, pp 21-37

Ashenafi, M. and Busse, M. 1989. Inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* on *Salmonella infantis*, *Enterobacter aerogenes* and *Escherichia coli* during tempeh fermentation. J. Food Protect. 52: 169.

Axelsson, L. T; Chung, T. C; Dobrogosz, W. J. and Lindgren, S. E. 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri* . Microbial Ecology in Health and Disease 2: 131-136.

Banks William J. (1986) Histología veterinaria aplicada. Manual moderno Ed. Omega p.531

Banwar y Goergej. (1979) Microbiología básica de los alimento. Ed. Antrophosp. 290

Barnes E.M. Bormun, D.A Harry E.G y Mead G.C. 1972. The intestinal flora chicken in period 2 to 6 weeks if age. With particular reference to anaerobic bacteria. Br Poult sci P: 311

Barefoot, S. F; Ying-Ru Chen; Hughes, T. A; Bodine, A. B; Shearer, M. Y. and Hughes, M. D. 1994. Identification and purification of a protein that induces production of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin Lactacin B. Applied and Environmental Microbiology. Vol 60. No. 10: 3522

Belgnaoui, A., Han, W., Lamine, F., Eutamene, H., Fioramonti, J., Bueno, L., Theodorou, V. In Gut.2006. *Lactobacillus farciminis* treatment suppresses

stress-induced visceral hypersensitivity: a possible action through interaction with epithelial cells cytoskeleton contraction. Article in press Pp-4

Boonkumkiao P, Kongthong P, Assavanig A. 2006 Acid and Bile Tolerance of *Lactobacillus thermotolerans*, a novel species isolated from chicken feces. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*; 40: 13-17.

Botero L. 2008. Salmonelosis y su control. *Avicultura Ecuatoriana*. 2008. No, 128. Agroeditorial CIA. LTDA. P30

Brizuela, M.A. 2003. Selección de cepas de bacterias ácido lácticas para la obtención de un preparado con propiedades probióticas y su evaluación en cerdos. Tesis Dr. Cs. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba pp 3

BROOKER, B.E.; FULLER, R. 2011. Adhesion of Lactobacilli to the Chicken Crop Epithelium. *Journal of Ultrastructure Research*, v.52, p.21-31, 1975. CDC. Incidence and Trends Of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food-Foodborne disease Active Surveillance Network, 10 US Sites, 1996-2010. *MMWR*, v. 60, n.22, p. 749-755.

Cabezas, Alarcón María Alejandra (2009) Evaluación de la capacidad de colonización intestinal de un *Lactobacillus sp.* Proveniente de un fermento comercial 2-3

Chateau, N.; Castellanos, I.; Deschamps, A.M. 1993 Distribution of pathogen inhibition in the *Lactobacillus* isolates of commercial probiotic consortium. *J. Appl. Bacteriol.* Pp. 36.

Castellanos, María Inés; Chauvet, A; Deschamps, A. and Barreau, C. 1996. PCR methods for specification and specific detection of probiotic acid lactic bacteria. *Current Microbiology*. Vol. 33:100-103.

Calnek B.W, Hjhon Barnes, Charles W. beard Larry., R.M. Cougald, Y.M. Saif (2000) Enfermedades de las aves Infecciones por salmonella 79-80

Caffer María Inés y Terragno Raquel. 2001. Manual de procedimientos para la caracterización de salmonella Instituto de enfermedades infecciosas. Buenos Aires argentina pp3-4

Cole, C.B.; Fuller, R.; Newport, M.J. 1987 The effect of diluted yoghurt on the gut microbiology and growth of piglets. *Food Microbiol.* Pp, 83

Collington, G.K.; Parker, D.S.; Armstrong, D.G. 1990 The influence of inclusion of either an antibiotic or a probiotic in the diet on the development of digestive enzyme activity in the pig. Br. J. Nutr. Pp; 59

Conway, P & Kejelleberg, S. 1986. Patente sueca. N0 557029. Daeschel, M. A. 1993. Applications and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in foods and beverages, p. 63.

Cuca, M.E, Ávila, E.G y Pro, M. 1996. Alimentación de las aves. Universidad Autónoma de Chapingo Ed. Montoncillo Edo. Méx. Pp 3.

Cheema M.A, Quereshi M. y Havenstein G.B 2003. Poultry Science. 82: Pp.1519

Chiou T-Y, Oshima K, Suda W, Hattori M, Takahashi T. 2016. Draft genome sequence of *Lactobacillus farciminis* NBRC 111452, isolated from kôso, a Japanese sugar-vegetable fermented beverage. Genome Announc 4(1):e01514-15. doi:10.1128/genomeA.01514-15.

Chichlowski, M.; Croom, W.J.; Edens, F.W.; McBride, B.W.; Qiu, R.; Chiang, C.C.; Daniel, L.R.; Havenstein, G.B.; Koci, M.D. 2000 Microarchitecture and spatial relationship between bacteria. Pp. 121

Choque López José Alfredo. 2008. Evaluación del estado oxidativo y salud intestinal de pollos de carne en repuesta a la alimentación con grasas recicladas. Tesis doctoral universidad Autónoma de Barcelona P:8-10

Chumpawadee, S., O. Chinrasri, T. Somchan, S. Ngamluany and S. Soychuta. 2008. Effect of dietary inclusion of cassava yeast as probiotic source on growth performance, small intestine (ileum) morphology and carcass characteristic in broilers. Int. J. PoultrySci., 7(3):Pp.250

Chung, T. C; Axelsson, L. T; Lindgren, S. E. and Dobrogosz, W. J. 1989. In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. Microbial Ecology in Health and Disease 2: 137.

Choct, M. 2001. Alternatives to in-feed antibiotics in monogastric animal industry. ASA Technical Bulletin. AN 30

Clench M. H. 1999. The avian cecum: update and motility review. J. Exp. Zool. P: 441

Cruz Salvador F D. 2009 Nutracentricos. Universidad Autónoma de Chihuahua. Facultad de Zootecnia. México D.F.P:10

- Devi, S.B. 1998. La resistencia contra los antibióticos. Investigación y Ciencia. Mayo. p. 14
- Dierck, N.A. 1989 Biotechnology aids to improve feed and feed digestion: Enzymes and fermentation. Arch. Anim.Nutr. Berl. Pp; 261
- Doyle, F. and Slesson, S. 2000. Crecimiento compensatorio de animales de granja. Veterinaria aviar. P 12.
- Duke, G.E. 1977. Avian digestion. In Physiology of Domestic Animals, 9th ed.; Duke, G.E., Ed.; Cornell University Press: Ithaca, NY, USA, pp. 313.
- Ehrmann, M.A.; Kurzak, P.; Bauer, J.; Vogel, R.F. 2002. Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. J. Appl. Microbiol. Pp. 975.
- Edelman, S.; Leskela, S.; Ron, E.; Apajalahti, J.; Korhonen, T.K. 2003. In vitro adhesion of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain to surfaces of the chicken intestinal tract and ileal mucus. Veterinary Microbiology 91: 41–56.
- Ewing W.N. y Cole D.J.A. 1994. The gastrointestinal tract in the living gut and introduction to microorganisms in nutrition context. Ed. Townbridge UK. P: 28.
- FAO/WHO. 2001 Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria; FAO/WHO: American Córdoba Park Hotel, Córdoba, Argentina,; pp. 12.
- Ferret, P.R., Parks, C.W. & Grimes, J.L. 2002. Benefits of dietary antibiotic and mannanoligosaccharide supplementation for poultry. Multi-State Poultry Meeting. May. p. 14
- Fioramonti Jean, Bueno Lionel, Theodorou Vasilía, Lamine Florence. 2000 Use of *Lactobacillus farciminis* for the prevention or treatment of digestive pathologies US 7294337 B2 Institut National De La Recherche Agronomique (Inra) Pp: 22
- Fuller, R.c. 2001 The chicken gut microflora and probiotic supplements. J. Poult. Sci., Pp.189
- Francis, C.; Janky, D.M.; Arafa, A.S.; Harms, R.H. 1978. Interrelationship of *Lactobacillus* and zinc bacitracin in diets of turkey poults. Poult. Sci. Pp. 1687.
- Frazier W.C., D.C.westhoff (1993). Microbiología de los alimentos Ed .Acribia p.58.

Fritts, C.A.; Kersey, J.H.; Motl, M.A.; Kroger, E.C.; Yan, F.; Si, J.; Jiang, Q.; Campos, M.M.; Waldroup, A.L.; Waldroup, P.W. 2000. *Bacillus subtilis* C-3102 (Calsporin) improves live performance and microbiological status of broiler chickens. *J. Appl. Poult. Res.* Pp: 149.

Garriga, M.; Pascual, M.; Monfort, J.M.; Hugas, M. 1998. Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. *J. Appl. Microbiol.* Pp.132.

Gerard F., Brezilion C., Quére F., Solomon. 2008 characterization of cecla microbiota and response to an orally administered *Lactobacillus* probiotic strain in the broiler chickens. *J. molecular microb. Biotechnol* P: 115

Gómez. J. de Jesús, Mosqueda Ángel T. Ocampo Luis. 1986. *Terapéutica avícola*. Ed. Colibrí Pp.110

Guilliot J.R. 2000. The pros and cons of probiotics. *Make probiotics for poultry*. *World Poultry*. pp 18

Gunter K. 2003. Taxonomy, ecology and resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology* Volume 88, Issues 2-3, 1 December, P: 123

Griggs, J.P.; Jacob, J.P. 2005 Alternatives to antibiotics for organic poultry production. *J. Appl. Poult.*, 14, 750-756.

Halami, A. Chandrasekhar and K. Nand. (1999) "*Lactobacillus farciminis* MD, a newer strain with potential for bacteriocin and antibiotic assay" P.M. Department of Food Microbiology, Central Food Technological Research Institute, Mysore P 12

Hillman D.P, K. & Fenlon, D.R. 2003. The use of a model ileum to investigate the effects of novel and existing antimicrobials on indigenous porcine gastrointestinal microflora: using vancomycin as an example. *Anim. Feed Sci. Tech.* 103:123

Hooge DM, Sims MD, Sefton AE, Connolly A, Spring PS. 2003 Effect of dietary mannan oligosaccharide, with or without bacitracin or virginiamycin, on live performance of broiler chickens at relatively high stocking density on new litter. *J Appl Poult Res*; 12: Pp.461

Horst Erich König, Vienahans-Georgliebich, (2005) *Anatomía de los animales domésticos. Órganos, sistema circulatorio y sistema nervioso*. Ed. McGraw-Hill P-57

Horst, Dieter. 1971 *Veterinary Histology*. Ed. Lea y Febiger. 165

Iji PA, Tivey DR. 1998 Natural and synthetic oligosaccharides in broiler chicken diets. *Worlds Poult Sci*; 54:Pp.129

Jadomus. A, Vahjun W. Simon O. 2001. Growth behaviour of spore forming probiotics strain in the gastro intestinal tract of broile chicken and piglets. *Architiernerh* pp17

Jin, L.Z.; Ho, Y.W.; Abdullah, N.; Jalaludin, S.1998 Growth performance, intestinal microbial populations and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. *Poult. Sci.* pp 1259.

Jin S.H., Corless A. Y Soll J.L. 1998 digestive sysytem development in post hatch poultry worlds. *Poult. Sci J. P:* 335

Jurado Jiménez R., C. Arenas Muñoz, A. Doblás Delgado, A. Riveroa y J. Torre-Cisneros (2010). Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonella Unidad de Gestión Clínica de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario. P-22

Jurado G, M.Sc, Diana Aguirre F, 2 Biol, Cristina Ramírez T, 3 PhD. 2009 Caracterización de bacterias probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos como alternativa al uso de antibióticos *Rev.MVZ Córdoba.* Pp.1723

Kabir, S.M.L.; Rahman, M.M.; Rahman, M.B.; Hosain, M.Z.; Akand, M.S.I.; Das, S.K. 2005. Viability of probiotics in balancing intestinal flora and effecting histological changes of crop and caecal tissues of broilers. *Biotechnology.* Pp 330.

Kabir Lutful S.M 2009 The Role of Probiotics in the Poultry Industry. *International journal of molecular science* pp 10

Kandler, O. and Weiss, N. 1992. Regular nonsporing Gram-positive rods. P. 1208-1260. En P. H. A.

Kizerwetter-Swida, M.; Binek, M. 2009. Protective effect of potentially probiotic *Lactobacillus* strain on infection with pathogenic bacteria in chickens. *Pol. J. Vet. Sci.* Pp.15.

Koutsos, E. 2006. North Carolina Poultry nutrition conference. N.C. Pp: 29

Koenen, M.E.; van der Hulst, R.; Leering, M.; Jeurissen, S.H.M.; Boersma, W.J.A. 2004 Development and validation of a new in vitro assay for selection of probiotic bacteria that express immunestimulating properties in chickens in vivo. *FEMS Immunol. Med. Mic.* Pp.119

Klasing, K.C (2006) Avian gut function in health and disase. Series CAB interland. Pp. 210

Lastras P. 2009 Probióticos, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum*, Suplementos nutricionales, Pag. 72 Salud BIO. 12 p. Consultado el 15-12.

Line, E.J.; Bailey, S.J.; Cox, N.A.; Stern, N.J.; Tompkins, T. 1998. Effect of yeast-supplemented feed on *Salmonella* and *Campylobacter* populations in broilers. Poultry Sci. Pp, 405.

Lilly, D.M.; Stillwell, R.H. 1965 Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. Science pp, 147, 747-748.

Lorica 1998 Bactéries lactiques, Volumen I: Aspectos fundamentales y tecnológicos DE ROISSARD y LUQUET Pp-15

Lourenco Mariana, Kuritza Leandro, Westphal Patrick (2012) *Lactobacillus spp.* En el agua de bebida para el control de *Salmonella minnesota* en pollos de engorda. Laboratorio de Microbiología y Ornitopatología. Universidad federal de Paraná P-3

Mack, O. N 1986. Digestión y metabolismo. Cap 24, manual de producción agrícola. Ed. El manual moderno. México D.F. Pp 663

Milian G. 2005. Empleo de probióticos a base de *Bacillus sp* y sus endosporas en la producción avícola. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba. 2005. 16p. Consultado el 6-02-2010.

Mosqueda Ángel T, Lucio Benjamín (1986) Enfermedades comunes de las aves domésticas. Ed. UNAM Facultad de medicina veterinaria y zootecnia. 35

Molbak, K. E Neimann, J. 2002 Risk factors for sporadic infection with *Salmonella enteritidis*, Denmark, 1997 – 1999. American Journal of Epidemiology, v.156, p.654–661.

Moreno E. Probióticos y aves, Veterinaria Profesional, Islas Canarias- España. 1999. 5 p. Consultado el 25-10-2009. Disponible en <http://www.timbrado.com/artprobioticos.shtml>

Nava, G.M.; Bielke, L.R.; Callaway, T.R.; Castañeda, M.P. 2005 Probiotic alternatives to reduce gastrointestinal infections: The poultry experience. Animal Health pp, 6,105.

Nayebpor, M.; Farhomand, P.; Hashemi, A. 2007 Effects of different levels of direct fed microbial (Primalac) on growth performance and humoral immune response in broiler chickens. J. Anim. Vet. Adv. Pp.1308.

Nisbet, D.J.; Tellez, G.I.; Lowry, V.K.; Anderson, R.C.; García, G.; Nava, G.; Kogut, M.H.; Corrier, D.E.; Stanker, L.H. 1998 Effect of a commercial competitive

exclusion culture (Preempt) on mortality and horizontal transmission of *Salmonella gallinarum* in broiler chickens. *Avian Dis.* Pp: 651.

Nurmi, E.; Rantala, M. 1973 New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature* Pp: 211

OIE manual de la OIE sobre animales terrestres (2008) Capitulo 2.9.9. 16

Ouwehand, A.C.; Kirjavainen, P.V.; Grönlund M.-M.; Isolauri, E.; Salminen, S.J. 1999b. Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. *International Dairy Journal* 9: 623-630.

Olesupo, N. A; Olukoya, D. K. and Odunfa, S. A. 1995. Studies on bacterocinogenic *Lactobacillus* isolates from selected Nigerian fermented foods. *J. Basic. Microbiol.* 35: 319

Oto Zak, Sande A.Merle. 1999. Handbook of animal models of infection. Ed. Academic press. 109

Owings, W.J.; Reynolds, D.L.; Hasiak, R.J.; Ferket, P.R. 1989 Influence of dietary supplements with *Streptococcus faecium* M-74 on broiler body weight, feed conversion, carcass characteristics, and intestinal microbial colonization. *Poult. Sci.*Pp:1257

Oyetayo, v.o., adetuyi, f.c. and akinyosoye, f.a 2003. Safety and protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotic agent in vivo ISSN © 2003 Academic Journals Pp.1684–5315

Parker, R.B. 1974 Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Anim. Nutr. Health* Pp: 4-8.

Parker, D.S y Armstrong, D.G. 1987. Antibiotic feed additives and livestock production. *Proc. Nutr. Soc.* 46:415

Patterson, J.A.; Burkholder, K.M. 2003 Application of Prebiotics and Probiotics in Poultry Production. *Poultry Science*, v.82, p.627-631, 2003.

Pelicano, E., P. A. Souza, H. B. A. Souza, D.F. Figueiredo, M. Boiago, S. R. Carvalhoand V. F. Bordon. 2005. Intestinal Mucosa Development in Broiler Chickens Fed Natural Growth Promoters. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, 7(4):221-229.

Perusquia J. Trinidad María, Martínez Passch Leopoldo (1985) Necropsias en aves. Ed. Trillas. 23

Petrie Aviva, Watson Paul (2006) Statics for Veterinary and Animal Science. Ed. Blackwell. 54

Prescot J.F., Baggot. Walker (2000) Antimicrobial therapy in veterinary medicine. Ed Wright 641.

Ramírez Cuenca María del Socorro. (2005) Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo instituto de ciencias básicas e ingeniería centro de investigaciones químicas Pachuca de Soto, Hidalgo. P 33

Rebollar Serrano M. E. 2002 Evaluación de incubadora productivos en pollos de engorde al incluir maíz y pasta de soya extraído de cebada. Tesis Universidad de colima. Pp. 7

Rodríguez Haro Isela, Marco Salazar Castillo² y Eduard Villalobos Infante³ 2012 *Lactobacillus* spp. Del tracto intestinal de *Gallus gallus* con potencial probiótico. REBIOL Universidad de Trujillo Trujillo. Perú. P: 64

Rossi A, Sangoi M, Padilha J. 2005. Uso de probióticos en la prevención de salmonella en pollos de engorde. Zootécnica y medicina veterinaria. Brasil. P:8

Saravia Gómez Jaime 2010. Guías para manejo de urgencias. Universidad Nacional de Colombia. 13

Sainsbury, D. 1993. Protecting against stress. Probiotics boots natural resistance. Pigs. January/ February. p. 32

Samaniego F. L. M. Sosa del Castillo M. (2000) *Lactobacillus* spp.: Importantes promotores de Actividad probiótica y bioconservadora. Cuba Ed. Universitaria 10

Samanya, M.; Yamauchi, K. 2002 Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. Natto. Comp. Biochem. Physiol. Physiol. Pp.104.

Sansalone P. 2008. Conceptos sobre Alternativas no Antibióticas en aves de consumo. Listado de Memorias. Seminario AMEVEA. Lab. VENTACO S.A. Quito-Ecuador. 224 p

Santin E, Maiorka A, Macari M, Greco M, Sánchez JC, Okada TM *et al.* 2001 Performance and intestinal mucosa development of broiler chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. J Appl Poult; 10: Pp.244.

Saxelin, M. 1997. Lactobacillus GG: A human probiotic strain with thorough clinical documentation. Food Rev. Int. 13(2): 293.

Sumano López Héctor, Lilia Gutiérrez Olvera Lilia. (2010) Farmacología clínica en aves comerciales MC.graw

Hill. P-110,115

Schneitz, C. 2005 Competitive exclusion in poultry—30 years of research. Food Control 2005, Pp: 667.

Schrezenmeir, J. & de Vrese, M. 2001. Probiotics, prebiotics and synbiotics—approaching a definition. Am. J. Clin. Nutr. 73:361S

Silliker H., r.pelliot, a.cbaird Parker, f.lbryan, j.h.b Christian, d.s Clarkj.colson, jr.T.aroberys (1980) Ecología microbiana de los alimentos factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos. Ed. ACRIBIA 112

Smith Hilton Atmore (1980). Patología veterinaria. Ed. hispano-americana 394-395

Sisson-Grossman (1982). Anatomía de los animales domésticos. Quinta edición. Tomo 1. 118

Sissons, J.W. 1989. Potential of probiotic organisms to prevent diarrhea and promote digestion in farm animals: A review. J. Sci. Food Agric. PP.; 13.

Stern, N.J.; Cox, N.A.; Bailey, J.S.; Berrang, M.E.; Musgrove, M.T. 2001. Comparison of mucosal competitive exclusion and competitive exclusion treatment to reduce Salmonella and Campylobacter spp. Colonization in broiler chickens. Poult. Sci. P.156.

Spring P. Glycomics. 2004. El rol de carbohidratos específicos como nuevos aditivos alimenticios. Swiss College of Agriculture. Revista Avicultura Profesional. 22,(4): 17-19p.

Tapia Vázquez Olivia M. Montes Pérez María, Rodarte Venegas Deyanira (2012) Manual para el curso teórico práctico de histología y biología del desarrollo. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias. 65

Tavernari F., Salguero S., 2008. Nutrición, Patología y fisiología digestiva en pollos. Aspectos prácticos. Universidad Federal de Vicosa. Brasil. Pp. 32

Uni, Z. Noy, Y. and Skion, D. 1999 Post hatch development of small intestine function in poultry. Poultry science 78 Pp. 215

Uribe Catalina, m.v.1, Martha Cecilia Suárez, m.v., m.sc. 2006 Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar Colombia médica Vol. 37 N° 2, P: 1

Vanleeuwen, P. mouwmen y Verstegen M.W. 2004. Morphology of the small intestinal mucus surface of broiler in relation to agen diet formulation. Samll intestinal microflora and performance. Br. Poult. Sci. P: 335

Van Immerseel, F.; Russell, J.B.; Flythe, M.D.; Gantois, I.; Timbermont, I.; Pasmans, F.; Haesebrouck, F.; Ducatelle, R. 2006. The use of organic acids to combat Salmonella in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. Avian Pathology, v.35, n.3, p.188.

Vandelle, M., Teller, E. & Focant, M. 1990. Probiotics in animal nutrition: a review. Arch. Amm., Berlin 40:507

Venema, G; Huis, J. H. J. and Hugenholtz, J. 1996. Lactic Acid Bacteria: Genetics, metabolism and applications. Antonie van Leeuwenhoek. Volume 70. Nos. 2-4: 299-316.

Venturi. 1999 Impact on the composition of faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis, Aliment Pharmacol Ther, P: 1103.

Watkins, B.A.; Kratzer, F.H. 1983 Effect of oral dosing of Lactobacillus strains on gut colonization and liver biotin in broiler chicks. Poult. Sci. Pp. 2088.

Wray C., A.Wray (2000) Salmonella in Domestic Animals. CABI publishing 118

Yoon, C.; Na, C.S.; Park, J.H.; Han, S.K.; Nam, Y.M.; Kwon, J.T. Effect of feeding multiple probiotics on performance and fecal noxious gas emission in broiler chicks. Kor. J. Poult. Sci. Pp. 229