

Artículo original

Actividad antibacteriana del aditivo simbiótico PROBIOLEV® en pollos de ceba infectados con *Salmonella enterica*

Marlen Rodríguez Oliva^{a,*}, Grethel Milián Florido^a, Ana J. Rondón Castillo^a, Agustín Beruvides Rodríguez^a, Fátima Arteaga Chávez^b

^aCentro de Estudios Biotecnológicos, Laboratorio de Biotecnología, Universidad de Matanzas, Cuba. ^bEscuela Superior Politécnica Agropecuaria "Manuel Félix López", Manabí, Ecuador.

Recibido 23 de junio de 2019; aceptado 22 de noviembre de 2019

Resumen: El presente trabajo tuvo como objetivo realizar una evaluación del potencial antibacteriano de PROBIOLEV® un aditivo simbiótico obtenido por biotecnología que contiene oligosacáridos de glucano y manano con actividad prebiótica y un cultivo de *Bacillus subtilis* conocido por su actividad probiótica y su relación con la respuesta inmune y fermentativa en aves expuestas con *Salmonella enterica* FVE1284. Se demostró, que al suministrar este bioproducto a las aves infectadas con la bacteria se redujo la infección ($p < 0,05$), mientras que en el grupo control, además de la infección (100% en tonsilas cecales), se detectó la presencia de este patógeno en hígado y bazo (70%). No solo se redujo el número de aves infectadas por este microorganismo (65%) sino que se incrementó la población ($2,47 \times 10^{11}$) de bacterias beneficiosas (*Lactobacillus* spp.). Además, se generó una respuesta fisiológica favorable, al mejorar los patrones fermentativos en el ciego (pH 6,6) y la estimulación del estado inmune, a través de un mayor tamaño de los órganos linfoides (bolsa de Fabricio y bazo) y la concentración de inmunoglobulina M ($1,12 \text{g.L}^{-1}$) en el plasma sanguíneo de las aves. Los resultados indican que PROBIOLEV® actúa como controlador de microorganismos potencialmente patógenos en el tracto digestivo de las aves.

Palabras clave: aditivo simbiótico; potencial antibacteriano; pollos de ceba; *Salmonella enterica*.

Antibacterial activity of the PROBIOLEV® symbiotic additive in broiler chickens infected with *Salmonella enterica*

Abstract: The purpose of this work was to carry out an evaluation of the antibacterial potential of PROBIOLEV® a symbiotic additive obtained by biotechnology containing glucan and mannan oligosaccharides with prebiotic activity and a culture of *Bacillus subtilis*, known for its probiotic activity and its relation with the immune response and fermentation in birds challenged with *Salmonella enterica* FVE1284. It was shown that by supplying this bioproduct to birds challenged with the bacteria, the infection was reduced ($p < 0,05$) while in the control group, in addition to the infection (100 % in cecal tonsils), the presence of this pathogen was detected in liver and spleen (70 %). Not only was the number of birds infected by this microorganism reduced (65%) but the population of beneficial bacteria (*Lactobacillus* spp.) was increased (2.47×10^{11}). In addition, a favourable physiological response was generated, by improving the fermentative patterns in the cecum (pH 6.6) and the stimulation of the immune state, through a larger size of the lymphoid organs (Fabricius bursa and spleen) and immunoglobulin M concentration (1.12g.L^{-1}) in the blood plasma of birds. The results indicate that PROBIOLEV® acts as a controller of potentially pathogenic microorganisms in the digestive tract of birds.

Keywords: symbiotic additive; antibacterial potential; broiler chickens; *Salmonella enterica*.

* Correspondencia:

E-mail: rodriguezoliva75@gmail.com

Introducción

El género *Salmonella* se sitúa dentro de la familia Enterobacteriaceae, Phylum Proteobacteria. Es un bacilo gramnegativo, acapsular, anaerobio facultativo que agrupa alrededor de 2.500 serotipos. Se consideran

patógenos importantes de humanos y animales. La incidencia de estos agentes en los animales provoca enfermedades gastrointestinales, por lo que aumenta la mortalidad y trae consigo grandes pérdidas económicas. Este grupo microbiano causa trastornos entéricos y rápida contaminación de los alimentos derivados de la producción,

por lo que su control se considera uno de los grandes desafíos para la avicultura moderna [1].

En la actualidad, se exploran alternativas potenciales para contrarrestar estos problemas de la producción pecuaria. Mundialmente, los probióticos y prebióticos se postulan para reemplazar a los antibióticos utilizados a dosis subterapéuticas, a modo de promotores de crecimiento. Estos aditivos pueden elaborarse a partir de microorganismos o sustancias que contribuyan a estabilizar, mantener, reproducir y potenciar el equilibrio favorable de la ecología microbiana intestinal, con el buen funcionamiento del sistema inmunológico.

En Cuba, Pérez *et al.* [2], describieron y patentaron la metodología para la obtención de PROBIOLEV®, un aditivo simbiótico elaborado a partir de la hidrólisis enzimática de la crema de *Saccharomyces cerevisiae* con un cultivo de *Bacillus subtilis*. El potencial antibacteriano de este biopreparado fue comprobado *in vitro* por Rodríguez *et al.* [3], cuando observaron la inhibición de diferentes bacterias patógenas. Sin embargo, no se conoce el efecto de este aditivo en la prevención o control de estos microorganismos *in vivo*. Es por ello, que el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana de PROBIOLEV® en pollos de ceba, desafiados con *Salmonella enterica*.

Materiales y métodos

El experimento se desarrolló en el área de aislamiento de la Facultad de Veterinaria de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí (ESPAM), Ecuador, bajo la aprobación del Comité de Ética para la Experimentación Animal de esta institución (CEESPAM 022, del 15 febrero del 2018) y en correspondencia con la Norma Oficial Ecuatoriana NOE N° 0017/2013 sobre el bienestar animal [4].

Se emplearon 60 pollos machos de la raza Ross 300 (un día de edad, peso vivo promedio de 36 g), con dieta libre de antibióticos. Las aves se alojaron en cajas plásticas con capacidad para 25 pollitos y se distribuyeron aleatoriamente a razón de 20 aves por grupo con un diseño experimental completamente al azar y cada animal constituyó una repetición.

El consumo de agua y alimentos fue *ad libitum* y se utilizaron comederos de cilindro y bebederos tipo niple de 3,78 L. El alimento se elaboró en la fábrica de concentrados de la misma institución y sus componentes se muestran en la tabla 1.

Biopreparado y microorganismos patógenos: Se empleó PROBIOLEV®, como aditivo protector, elaborado a partir de la metodología descrita y patentada por Pérez *et al.* [2]. La cepa indicadora que se utilizó fue *S. enterica* FVE1284 (SE-1284), procedente del cepario perteneciente al Laboratorio de Microbiología de la ESPAM. La misma se cultivó en caldo nutritivo enriquecido a 37 °C por 18 h, en baño térmico con agitación (UNITRONIC 320 OR) a 110 rpm. El conteo de SE-1284 se realizó por el método

Tabla 1. Composición de la dieta suministrada a las aves durante el experimento.

Ingredientes	%
Maíz amarillo nacional	59,90
Pasta de soja (46%)	30,94
Harina de pescado (58%)	5,00
Aceite de Palma	0,76
Carbonato de Calcio	1,15
Fosfato monocálcico (21% granulado)	0,62
Sal común	0,21
Premezcla de vitaminas y minerales*	0,25
DL-Metionina	0,28
L-Lisina HCl	0,15
L-Treonina	0,03
Robavio MAX-AP	0,05
Milbond TX (Atrapador Micotoxinas)	0,25
Abiquim/Oxistop (Antioxidante)	0,02
Cycostat (Robenidina 6,6%)	0,05
Cloruro de colina	0,08
Bicarbonato de sodio	0,26

*Un kg de alimento contiene: Suplemento vitamínico: vitamina A (10000 UI), vitamina D3 (2000 UI), vitamina E (10 mg), vitamina K3 (2 mg), Tiamina (1 mg) - B1, Riboflavina (5 mg) - B2, Piridoxina (2 mg) - B6, Vitamina B12 (15,4 mg), Ácido nicotínico (125 mg), Pantotenato de calcio (10 mg), Ácido fólico (0,25 mg) y Biotina (0,02 mg) y Suplemento mineral: Selenio (0,1 mg), Hierro (40 mg), Cobre (12 mg), Zinc (120 mg), Magnesio (100 mg), Yodo (2,5 mg) y Cobalto (0,75 mg).

de las diluciones seriadas en agua peptonada (10^{-1} a 10^{-7}) y la siembra en placas con medio agar Rappaport Vassiliadis (BIOCEN).

Tratamiento experimental: El experimento tuvo una duración de 21 días. Los grupos experimentales fueron:

- Grupo I control: con dieta basal sin PROBIOLEV® y sin inóculo (SE-1284).
- Grupo II tratamiento: inoculado con SE-1284, sin la adición de PROBIOLEV® en la dieta basal.
- Grupo III tratamiento: inoculado con SE-1284, con la adición de PROBIOLEV® en la dieta basal.

PROBIOLEV® fue suministrado en dosis de 75 mL.kg⁻¹ de alimento desde el primero hasta los 21 días de nacidos. La dosis inoculada por ave (grupo II y III) fue de 2,5 x10⁶ UFC.mL⁻¹, la cual se aplicó individualmente por vía oral, a través de jeringas desechables. El desafío se realizó a los siete días de edad en dosis única.

Al primer día de edad se realizó una prueba bacteriológica de inocuidad para descartar la presencia de *S. enterica* en las aves empleadas en el estudio; para ello se tomaron muestras de hígado, bazo y tonsilas cecales de 6 aves adicionales,

además 200 g del alimento que se proporcionó durante todo el experimento.

Para el análisis de las muestras, con el fin de determinar *in vivo* el grado de colonización por *S. entérica*, se sacrificaron (dislocación cervical) todos los animales del experimento a los 21 días. El procedimiento para evaluar la respuesta biológica de las aves se describe a continuación:

Indicadores microbiológicos: A los 21 días se tomaron muestras combinadas de hígado, bazo y tonsilas cecales (1 g) de las aves participantes en el experimento. Los conteos de *Lactobacillus* spp. y *S. enterica* a nivel de ciego se realizaron en cinco animales por cada tratamiento experimental.

Para el conteo de *Lactobacillus* spp. se realizaron diluciones seriadas de las muestras en una relación de inoculación de 1:10 (v/v) en agua peptonada (OXOID), desde 10^{-1} hasta 10^{-12} . Las tres últimas diluciones se inocularon individualmente (1 mL) a profundidad en placas con agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS, CONDO, España). Esta operación se replicó tres veces y las placas se incubaron a 37 °C en condiciones de anaerobiosis por 48 h. Posteriormente, el número de UFC se determinó bajo lupa por conteo visual.

Para el conteo de *S. enterica* se realizaron diluciones seriadas de 1 g del contenido cecal (1:10, p/v) en agua peptonada hasta 10^{-7} . De las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} se sembraron por triplicado en placas con agar Rappaport Vassiliadis (BIOCEN). Después de incubar a 37 °C durante 24 h se realizó el conteo de colonias.

Para la comprobación de la presencia de *S. enterica* a nivel de hígado y bazo las muestras se inocularon directamente en tubos que contenían caldo Rappaport Vassiliadis, los cuales se incubaron por 24 h a 37 °C. Posteriormente de cada tubo se sembró con asa en superficie, placas de agar Rappaport Vassiliadis y se incubaron a 37 °C por 48 h. Las colonias de *Salmonella* se observan de color rosa a rojo con halo rojo.

Indicadores fermentativos: Para la determinación del pH, muestras de 1 g de contenido cecal se diluyeron en 10 mL de agua destilada y se agitaron. Posteriormente se procedió a su lectura en medidor de pH digital (Sartorius Meter PP-25).

Indicadores inmunológicos: Se determinó en los 60 animales el peso relativo de los órganos inmunes, el peso del bazo (PB), y la bolsa de Fabricio (PBF), a los 21 días de edad de las aves (balanza técnica Sartorius). El peso relativo (PR) de estos órganos inmunes (PRB y PRBF) se calculó con la siguiente fórmula: $PR = [\text{peso del órgano (g)} / \text{peso del cuerpo (g)}] \times 100$, según la metodología propuesta por Cazaban *et al.* [5].

Para cuantificar las inmunoglobulinas M (Ig M) se tomaron muestras de sangre de los pollos a los 3 y 21 días de edad. La sangre se extrajo y se recolectó en tubos de ensayo estériles rotulados sin anticoagulante y conservados a -4 °C hasta remitirlas al Laboratorio Clínico de Diagnóstico, Portoviejo, Manabí, Ecuador, donde a través de la técnica de ELISA (Enzyme-Linked-Immunesorbent Assay, SIGMA) se determinaron los niveles de inmunoglobulinas.

Análisis estadístico: Para analizar los indicadores fermentativos e inmunológicos se realizó un análisis de varianza según modelo de clasificación simple y se aplicó la prueba de Duncan [6] para $p < 0,05$ en los casos necesarios. Para analizar la presencia de *S. enterica* en los órganos, se realizó un análisis de varianza por comparación de proporciones o Chi cuadrado [7]. Los supuestos teóricos del análisis de varianza se verificaron para la variable conteo de microorganismos, por contar con un pequeño número de animales, a partir de la prueba de Shapiro Wilk [8], la normalidad de los errores y la prueba de Levene [9] para la homogeneidad de varianza. La misma no cumplió con los supuestos teóricos del ANOVA, por lo que se empleó la transformación $\sqrt{\%}$; sin embargo, esta no mejoró el cumplimiento de dichos supuestos y se realizó análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis y la prueba de Conover [10] para la comparación de los rangos medios.

Resultados y discusión

Las muestras que se analizaron para la prueba bacteriológica de inocuidad resultaron negativas para el aislamiento de *S. enterica*. Estos resultados demostraron que existían las condiciones sanitarias para realizar el desafío de patógenos en las aves.

La tabla 2 muestra los resultados de la detección de *S. enterica* en las aves experimentales. No hubo presencia del patógeno en los órganos de los animales del grupo I, lo que confirma la ausencia de contaminación accidental entre los diferentes grupos. A pesar de que ninguna de las aves mostró signos clínicos relacionados con la infección experimental, los grupos II y III desafiados con la bacteria, resultaron positivos a la presencia de esta en los diferentes órganos. El grupo II presentó 100% de infección en el contenido cecal, mientras que el tratamiento oral con PROBIOLEV® generó una reducción significativa ($p < 0,05$) en el número de aves positivas para la presencia de *S. enterica* en tonsilas cecales (65%).

En la tabla 2 se observa que la enterobacteria invadió hasta 70% de hígado y bazo en el grupo II, mientras que en el grupo III no hubo translocación bacteriana ni aislamiento positivo en estos órganos internos.

Según Herrera *et al.* [1] *Salmonella* inicia su ciclo de

Tabla 2. Detección de *Salmonella enterica* en hígado, bazo y tonsilas cecales de pollos de ceba a los 21 días de edad.

Grupos	Hígado-Bazo				Tonsilas cecales			
	Positivo		Negativo		Positivo		Negativo	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Grupo I	0	0	20	100	0	0	20	100
Grupo II	14	70	6	30	20	100	0	0
Grupo III	0	0	20	100	13	65	7	35
EE ± sign.	± 11,18 p<0,05							

N: número de animales. EE ± sign.: error estándar ± significancia.

infección al invadir el hospedero a través del tejido linfoide, incluyendo las placas de Peyer y tonsilas cecales en las aves. Se adhiere apicalmente a las células epiteliales del íleon y a las células M que debido a la ausencia del borde de cepillo así como de glicocalix, representan una puerta de entrada ideal para las enterobacterias. *Salmonella* invade las células del hospedero por un mecanismo conocido como disparo (trigger). Produce efectos citotóxicos que resultan en la destrucción de las células M y la invasión de enterocitos adyacentes, tanto por la cara apical como por la basolateral, induce apoptosis de macrófagos activados mediante la proteína efectora SipB (*Salmonella* invasion protein) y fagocitosis inducida en macrófagos no activados, para poder ser transportada a hígado y bazo.

De acuerdo con Díaz *et al.* [11], los probióticos presentan múltiples mecanismos de acción a través de los cuales coadyuvan a generar estabilidad en la flora intestinal, lo que evita la proliferación de enteropatógenos. La “exclusión competitiva” es uno de estos mecanismos que permite a los microorganismos probióticos colonizar ampliamente el intestino, lo que obliga a los patógenos a competir por un lugar de adhesión en la pared intestinal, hace que disminuya la obtención de nutrientes y dificulta la proliferación de bacterias perjudiciales.

Este resultado pudiera estar relacionado con la propiedad que poseen los oligosacáridos de mananos, presentes en el biopreparado, de captar y unirse a las bacterias patógenas, lo cual previene la colonización. Esta propiedad mananoaglutinadora la presentan varios patógenos entéricos, como *Salmonella* spp. y *E. coli* [12].

Ricke *et al.* [13], aplicaron el prebiótico comercial Biolex® MB40 (compuesto por oligosacáridos de manano) en pollos criados convencionalmente y en correspondencia con los resultados del presente trabajo, encontraron efectos beneficiosos en la reducción de *Salmonella* en los animales que se trataron. En contraste, otros investigadores no obtuvieron diferencias entre los tratamientos al incluir cepas vivas de *S. cerevisiae*, *Pediococcus acidilactici* y extracto de pared celular de levadura, de forma individual o en combinación [14]. Regularmente, en la literatura se informa que cuando se utilizan levaduras (*S. cerevisiae*) y derivados de su pared en la dieta de las aves, disminuyen los

ataques bacterianos, modifican las poblaciones bacterianas intestinales, mejoran el rendimiento productivo y la digestibilidad de los nutrientes [15,16].

El suministro estable de PROBIOLEV® posibilitó la presencia de los mananos en el tracto gastrointestinal (TGI) de las aves. Como anteriormente se expresó, estos azúcares (oligosacáridos de mananos) ocupan los sitios receptores de las bacterias a las células epiteliales del TGI, por lo que, las células patógenas no se adhieren a la mucosa intestinal y no la colonizan. La efectividad de PROBIOLEV® en la exclusión de *S. enterica* FVE1284 pudiera relacionarse además con las características propias de este aditivo. La presencia en el biopreparado de células de *B. subtilis*, las cuales adhieren a su pared celular a numerosos patógenos y sintetizan antibióticos, bacteriocinas y otras sustancias antibacterianas, podría ser la causa de la reducción de esta bacteria en los animales tratados [17].

Diversas experiencias demuestran que el empleo de cepas de *Bacillus* spp. juega un rol importante para reducir e incluso prevenir la colonización intestinal por *Salmonella* spp. [18,19]. Juárez-Estrada *et al.* [20], determinaron el potencial de exclusión de un probiótico definido y otro no definido, ante la inoculación de *S. enterica* en aves de la raza Leghorn. Estos autores concluyeron que el tratamiento con el probiótico definido (*Bacillus* spp., *Enterococcus* spp. y *Lactobacillus* spp.) mostró una reducción de 75% de *S. enterica* en tonsilas cecales al día 13, mientras que el grupo testigo resultó 100% colonizado.

Además del cultivo de *B. subtilis*, PROBIOLEV® aporta aminoácidos esenciales, proteínas, vitaminas, minerales y una proporción aproximada de 1,30 y 0,86 mg/mL de oligosacáridos de glucano y manano respectivamente. La integración de dichos componentes posibilita que se mantenga una amplia actividad biológica en el organismo animal.

Corrigan *et al.* [21], estudiaron los efectos de estos compuestos prebióticos en la comunidad microbiana y en la fisiología del ciego de aves y determinaron que pueden modificar la microbiota, con el incremento de bacteroides, o sea, proliferan las bacterias nativas o beneficiosas.

En la tabla 3 se muestran los conteos de *Lactobacillus* spp. y *S. enterica* a partir del contenido cecal de pollos de

Tabla 3. Comportamiento de los indicadores microbiológicos e inmunológicos en los pollos de ceba.

Indicadores	G I	G II	G III	EE		
Microbiológicos	<i>Lactobacillus</i> spp. (Log UFC.g ⁻¹)	10,95 ^b (8,94x10 ¹⁰)	9,88 ^{ab} (7,73x10 ⁹)	11,42 ^a (2,71x10 ¹¹)	0,32	
	<i>Salmonella enterica</i> (Log UFC.g ⁻¹)	NP	5,51 (3,34x10 ⁵)	3,34 (2,74x10 ³)	0,12	
Inmunológicos	Edad de los pollos	G I	G II	G III	EE	
	Ig M (g.L ⁻¹)	3 días	0,86	0,86	0,85	0,004
	21 días	0,83 ^c	0,91 ^b	1,12 ^a	0,014	

a,b,c: Medias con letras distintas difieren para p<0,05 [6]. NP: no presente. EE: error estándar. () Datos originales.

ceba durante la evaluación del desafío; se observa como en las aves tratadas con PROBIOLEV® disminuyó la población patógena y aumentó el conteo de bacterias beneficiosas en comparación con el testigo inoculado (grupo II) y el grupo control (I).

La inclusión de este bioproducto en la dieta provocó la modificación de la ecología intestinal de las aves, lo que se relaciona con los resultados del indicador fermentativo evaluado a los 21 días. Se aprecia en la figura 1 que el pH de los ciegos fue menor ($p < 0,05$) en el grupo III donde se aplicó el aditivo con respecto al grupo control (I) y grupo II desafiado con *S. enterica*. Este resultado podría relacionarse con el incremento de lactobacilos (Grupo III), los que producen ácidos orgánicos que disminuyen el pH del lumen intestinal. La respuesta del pH en las aves tratadas con el aditivo resultó favorable, ya que su disminución indicó que se produjo la fermentación de los constituyentes de la dieta que no fueron digeridos en las partes altas del TGI de estos animales, proceso que da lugar a la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC). La acidificación del lumen intestinal aceleró las reacciones bioquímicas de la digestión. Las aves realizan el proceso de fermentación en los ciegos y mantener el pH idóneo a este nivel conduce a un mejor proceso fermentativo con repercusión positiva en la salud y productividad animal.

Mantener el pH ácido en el TGI aumenta el metabolismo y la multiplicación de los lactobacilos, estos liberan enzimas que mejoran la capacidad digestiva del hospedero, inactivan eficazmente a los metabolitos tóxicos de la microbiota perjudicial e incrementan el proceso de absorción debido al mejoramiento de las vellosidades, mayor síntesis de vitaminas y el control eficaz de los enteropatógenos, al aumentar la secreción de sustancias bacteriostáticas (bacteriocinas) [22].

Los resultados del comportamiento de los indicadores inmunológicos que se evaluaron en las aves a los 21 días se muestran en la figura 2. Para los grupos I y II no hubo diferencias en cuanto al peso relativo de la bolsa de Fabricio y el bazo. En cambio, el grupo III mostró un peso relativo superior en ambos órganos. Estos resultados demuestran que la inclusión del aditivo en la dieta de las aves estimuló

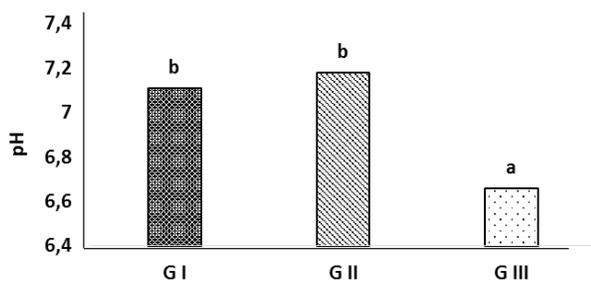


Figura 1. Efecto de la adición de PROBIOLEV® en el pH del contenido cecal de pollos de ceba desafiados con *Salmonella enterica* ($EE \pm 0,0154$). Grupo I: control. Grupo II: tratamiento inoculado con *Salmonella enterica*, sin la adición de PROBIOLEV®. Grupo III: tratamiento inoculado con *Salmonella enterica* con la adición de PROBIOLEV®. a,b: Medias con letras distintas difieren para $p < 0,05$ [6].

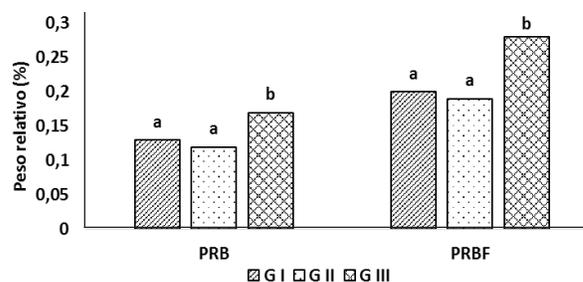


Figura 2. Efecto de la inclusión de PROBIOLEV® en los indicadores inmunológicos, evaluados a los 21 días, en pollos de ceba, desafiados con *Salmonella enterica*. Grupo I: control. Grupo II: tratamiento inoculado con *Salmonella enterica*, sin la adición de PROBIOLEV®. Grupo III: tratamiento inoculado con *Salmonella enterica* con la adición de PROBIOLEV®. a,b: Medias con letras distintas difieren para $p < 0,05$ [6]. Para ambos casos $p < 0,0001$. PRB= peso relativo de la bolsa de Fabricio ($EE \pm 0,0003$) PRBF= peso relativo de la bolsa de Fabricio ($EE \pm 0,0009$).

la respuesta inmune en estos animales. El sistema inmune del ave sufre cambios significativos, los cuales aparecen en las diferentes etapas del desarrollo [23].

El comportamiento de la bolsa de Fabricio en las aves es un punto de partida esencial para conocer su inmunocompetencia. La mejor respuesta inmune se observó en los animales tratados con el aditivo simbiótico (grupo III). Esta podría ser una de las causas por la cual los animales de este grupo presentaron menor grado de contaminación. El aumento del PR de la bolsa y el bazo demuestra que se produjo un incremento de la actividad morfofisiológica de estos órganos.

Los niveles de inmunoglobulinas de tipo M cuantificadas en las aves en estudio (Tabla 3), mostraron que a los tres días de edad no se observaron diferencias entre los tratamientos; sin embargo, a los 21 días se encontraron diferencias ($p < 0,05$) con un incremento de estos anticuerpos en los animales del grupo donde se aplicó el bioproducto.

En el presente estudio, los valores más altos se presentaron a los 21 días en el grupo III ($p < 0,05$); estos resultados pueden relacionarse con la inmunidad adquirida por el ave debido a la inoculación de *S. enterica*, unido a la estimulación del sistema por parte de los componentes de PROBIOLEV® (endosporas de *Bacillus* spp., glucanos y mananos). El valor más bajo se presentó en el grupo I o control, lo que reflejó el descenso que sufren los anticuerpos maternos, a medida que el ave madura su sistema inmune [24]. La estimulación del sistema inmune tanto innato como celular es otro mecanismo por el cual los probióticos contribuyen en la protección del hospedero. Estos microorganismos benéficos, aumentan la actividad de las células NK, o natural killer, que se destacan por su efecto citotóxico y por producir citoquinas que actúan como inmunomoduladoras y agentes proinflamatorios [11].

Lourenço *et al.* [25], evaluaron el efecto de un prebiótico constituido por oligosacáridos de manano (PREB) en la respuesta inmune de pollos de engorde desafiados contra *S. enteritidis*. La aplicación del bioproducto provocó la reducción de *Salmonella* y la expresión génica del ARNm de la IL-12 en los hígados de las aves desafiadas con estas bacterias.

Autores como Varmuzova *et al.* [26], refieren que las bacterias intestinales indígenas desarrollan diferentes mecanismos para la inhibición de los microorganismos patógenos, entre los cuales se encuentran la competencia por los sitios de colonización y nutrientes, la producción de compuestos tóxicos y la estimulación del sistema inmune. Estos procesos no son mutuamente exclusivos y la inhibición puede comprender uno, varios, o todos estos mecanismos a la vez.

Pérez *et al.* [27], también evaluaron en una dinámica de tiempo, el efecto de endosporas de *B. subtilis* E-44 sobre indicadores inmunológicos de pollos de engorde. En correspondencia con este trabajo, los autores encontraron la mejor respuesta inmune en los animales tratados con el aditivo. Estos resultados inducen procesos de inmunomodulación que derivan en un mejor desarrollo de linfocitos B, lo cual favorece el estado fisiológico de las aves.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio indican que PROBIOLEV® fue capaz de expresar una actividad multifactorial en el ecosistema gastrointestinal de las aves. Este biopreparado simbiótico promueve la microbiota benéfica y ejerce efecto defensivo al mejorar los patrones fermentativos en los ciegos y la estimulación del estado inmune, a través de un mayor peso relativo de los órganos linfoides y el aumento de las Ig M. Este aditivo natural constituye una opción biotecnológica cubana de interés para la producción animal.

Referencias

- Herrera B, Yonairo J, Leonel R. Salmonelosis, zoonosis de las aves y una patogenia muy particular. REDVET Revista Electrónica de Veterinaria. 2015; 16:1-19. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63638739002.pdf>. Acceso 5 de febrero 2019.
- Pérez M, Milián G, Piad R, González R, Boucourt R, Savón L. Hidrolizado de fondaje de cubetas de destilerías de alcohol con un crudo enzimático de la cepa de *Bacillus licheniformis* E-44 y su procedimiento de obtención. Patente concebida. No. 23179. (Int.cl.8) A 23 J 1/00,3/30, C 12N 9/56; 2006. Volumen 001, Folio 01.
- Rodríguez M, Milián G, Rondón AJ, Boucourt R, Portilla Y, Laurencio M, Beruvides A. Enzymatic hydrolyzed preparation of *Saccharomyces cerevisiae*: an additive with antibacterial potential for animal feeding. Cuban J Agric Sci. 2015; 49:389-97. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2079-34802015000300014. Acceso 5 de febrero 2019.
- Vizcaíno Cabezas DA, Betancourt R. Guía de Buenas Prácticas Avícolas. Resolución Técnica N° 0017. 19 de marzo de 2013. Inocuidad de los Alimentos. 1era. Edición. Ecuador: Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. Imprenta IdeaZ; 2013. Disponible en: <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2016/08/guia-avicola.pdf>. Acceso 8 de febrero 2019.
- Cazaban C, Masferrer N, Pascual R, Espadamala N, Costa T, Gardin Y. Proposed bursa of fabricius weight to body weight ratio standard in commercial broilers. Poult Sci. 2015; 94:2088-93. Doi: <https://doi.org/10.3382/ps/pev230>.
- Duncan B. Multiple ranges and multiple F tests. Biometrics. 1955; 11:1-42. Doi: <https://doi.org/10.2307/3001478>.
- Font H, Noda AC, Torres V, Herrera M, Lizazo D, Sarduy L, Rodríguez L. Programa ComparPro versión 1.0. La Habana, Cuba: Instituto de Ciencia Animal; 2007.
- Shapiro SS, Wilk MB. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). Biometrika. 1965; 52:591-611. Doi: <https://doi.org/10.2307/2333709>.
- Levene H. Robust tests for the equality of variance. In: Olkin I, Ghurye SG, Hoeffding W, Madow WG, Mann HB, editors. Contributions to probability and statistics. Palo Alto: Univesity Stanford Press. 1960; pp 278-92.
- Conover W. Practical Nonparametric Statistics. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1999.
- Díaz López EA, Ángel-Isaza J, Ángel D. Probióticos en la avicultura: una revisión. Rev Med Vet. 2017; 35:175-89. Doi: <https://doi.org/10.19052/mv.4400>.
- Jahanian R, Ashnagar M. Effect of dietary supplementation of mannan-oligosaccharides on performance, blood metabolites, ileal nutrient digestibility, and gut microflora in *Escherichia coli*-challenged laying hens. Poult Sci. 2015; 94:2165-72. Doi: <https://doi.org/10.3382/ps/pev180>.
- Ricke C, Park H, Lee S. Assessment of cecal microbiota, integron occurrence, fermentation responses, and *Salmonella* frequency in conventionally raised broilers fed a commercial yeast-based prebiotic compound. Poul Sci. 2016; 95:144-53. Doi: <https://doi.org/10.3382/ps/pev322>.
- Hahn-Didde D, Purdum SE. Prebiotics and probiotics used alone or in combination and effects on pullet growth and intestinal microbiology. J Appl Poult Rev. 2016; 25:1-11. Doi: <https://doi.org/10.3382/japr/pfv051>.
- Santin A, Lourenço M, de Souza A, Hayashi R, da Silva E. Immune response of broiler chickens supplemented with prebiotic from *Sacharomyces cerevisiae* challenged with *Salmonella enteritidis* or Minnesota. Poult Sci. 2016; 25:165-72. Doi: <https://doi.org/10.3382/japr/pfv094>.
- Mountzouris K, Dalaka E, Palamidi I, Paraskeuas V, Demey V, Theodoropoulos G, Fegeros K. Evaluation of yeast dietary supplementation in broilers challenged or not with *Salmonella* on growth performance, cecal microbiota composition and *Salmonella* in ceca,

- cloacae and carcass skin. Poult Sci. 2015; 94:2445-55. Doi: <https://doi.org/10.3382/ps/pev243>.
17. Adhikari B, Hernandez-Patlan D, Solis-Cruz B, Kwon YM, Arreguin MA, Latorre JD, Hernandez-Velasco X, Hargis BM, Tellez-Isaias G. Evaluation of the antimicrobial and anti-inflammatory properties of *Bacillus*-DFM (Norum™) in broiler chickens infected with *Salmonella enteritidis*. Front Vet Sci. 2019; 6. Article 282. Doi: <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00282>.
 18. Lee S H, Park S, Ricke SC. Assessment of cecal microbiota, integron occurrence, fermentation responses, and *Salmonella* frequency in conventionally raised broilers fed a commercial yeast-based prebiotic compound. Poult Sci. 2016; 95:144-53. Doi: <https://doi.org/10.3382/ps/pev322>.
 19. Kim H, Jeong S. Effect of *Bacillus subtilis* C-3102 spores as a probiotic feed supplement on growth performance, noxious gas emission, and intestinal microflora in broilers. Poult Sci. 2014; 93:3097-103. Doi: <https://doi.org/10.3382/ps.04086>.
 20. Juárez-Estrada MA, Molina Hernández JA, González Soto L. Un probiótico definido aumenta la exclusión de *Salmonella enterica* serovariedad enteritidis durante la crianza de aves ligeras. Vet Méx. 2010; 41:25-40. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0301-50922010000100003&script=sci_arttext. Acceso 12 de febrero 2019.
 21. Corrigan A, Leeuw M, Penaud-Frézet S, Dimova D, Murphy R. Phylogenetic and functional alterations in bacterial community compositions in broiler ceca as a result of mannan oligosaccharide supplementation. Appl Environ Microbiol. 2015; 81:3460-70. Doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.04194-14>.
 22. Rondón AJ, Milián G, Arteaga F, Samaniego LM, Boucourt R, Laurencio M, Rodríguez M. Efecto probiótico de *Lactobacillus salivarius* en indicadores microbiológicos e inmunológicos en pollos. Rev Soc Ven Microbiol. 2018; 38:21-6.
 23. Gómez G, López C, Maldonado C, Ávila E. El sistema inmune digestivo en las aves. Investigación y Ciencia. 48:9-16. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67413203003>. Acceso 8 de febrero 2019.
 24. Regueiro J. Inmunología: Biología y patología del sistema inmunitario, 4ta. edición. Madrid: Editorial Panamericana; 2011.
 25. Lourenço M, de Souza C, Hayashi M, da Silva A, Santin E. Immune response of broiler chickens supplemented with prebiotic from *Sacharomyces cerevisiae* challenged with *Salmonella enteritidis* or Minnesota. Poult Sci. 2015; 25:65-172. Doi: <https://doi.org/10.3382/japr/pfv094>.
 26. Varmuzova K, Kubasova T, Davidova-Gerzova L, Sisak F, Havlickova H, Sebkova A, Faldynova M, Rychlik I. Composition of gut microbiota influences resistance of newly hatched chickens to *Salmonella enteritidis* infection. Front Microbiol. 2016; 7. Article 957. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00957>.
 27. Pérez M, Milián G, Rondón AJ, Boucourt R, Torres V. Efecto de endosporas de *Bacillus subtilis* E-44 con actividad probiótica sobre indicadores fermentativos en órganos digestivos e inmunológicos de pollos de engorde. Rev Soc Ven Microbiol. 2015. 35:89-94. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1994/199444210006.pdf>. Acceso 15 de febrero 2019.