



Centre International des Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes (CIHEAM)

Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza (IAMZ)

Eficacia de la aplicación de productos ricos en
galactomananos en dietas para pollos infectados o no con
Salmonella

T E S I S

Para obtener el título de:

Máster en nutrición animal 2013

PRESENTADA POR:

Mohamed lamine ZAABOUNE

BAJO DIRECCIÓN:

Borja VILA

Comité tribunal:

Dr.

Dr.

Dr.

AGRADECIMIENTOS

Me siento especialmente feliz al escribir estos agradecimientos, pues ello significa que ha llegado el momento de concluir mi tesis. Me gustaría en primer lugar agradecer sinceramente a mis directores de tesis, Joaquim Brufau y Borja Vilà por la oportunidad que me han dado para realizar este trabajo, sus consejos, enseñanzas, paciencia y confianza, todo ello para que esta tesis llegue a buen puerto. También deseo agradecer a los investigadores y personal de departamento de la nutrición animal de “Mas de Bover” y del laboratorio por su disponibilidad y ayuda para solucionar cualquier tipo de duda y/o problema, y especialmente a Anna Pérez y Candy Segarra que me abrieron el laboratorio de modo incondicional, a Alfonso Mejías y la aportación de su experiencia en cuanto al manejo a nivel de las granjas del IRTA, a Lluís Llauradó por su disponibilidad de acompañarnos para hacer visitas a unas empresas dedicadas en el sector de la nutrición animal (CESAC, matadero...etc)

Al Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), por haber hecho una parte de nuestros análisis sobre la presencia de *Salmonella* a nivel de ciegos y la cuantificación expresión génica de los genes implicados en la respuesta inmune de los pollos.

No quiero acabar sin nombrar a los compañeros de laboratorio, departamento, amigos y todas aquellas personas que me han echado una mano cuando lo he necesitado y que han contribuido a esta etapa maravillosa de mi vida.

Por último, deseo de corazón dar las gracias a mis padres y mis amigos por su apoyo incondicional.

Índice

Índice	II
Índice de las tablas.....	IV
Índice de figuras	V
ABREVIACIONES	VI
Resumen	VII
Résumé	VIII
Abstract.....	IX
I- INTRODUCCION	1
II- REVISION BIBLIOGRAFICA:	3
1-la Salmonella:.....	3
1-1. Definicion de la bacteria Salmonella:	3
1-2. El reservorio de la bacteria:	3
1-3. Infección de pollos por Salmonella:	4
1-4. Colonización y adhesión de la salmonella al epitelio intestinal:.....	5
1-5. Regulación de la respuesta innata:	6
1-5-1. Quimioquinas:	6
1-5-2.Citoquinas:	7
2-Brotes de intoxicaciones alimentarias causados por salmonella:	8
3- Prevalencia Salmonella en seres humanos en la UE.....	9
4-La salmonella en gallinas ponedoras:	11
5-La salmonella en la carne de broilers:.....	12
6-Estrategias nutricionales para combatir la salmonella:	13
6.1- Antibióticos:.....	13
6.2- Probióticos:	15
6.3- Prebióticos como alternativos a los antibióticos promotores de crecimiento: 16	
a- Definición:	16
b- Clases de prebióticos:	16
c- Mecanismo de acción de los prebióticos:	17
6.4-Los galactomananos de algarroba:	18
III-Objetivos del trabajo:	21
IV- MATERIALES:	22
1-Animales:	22
2-La bacteria Salmonella Enteritidis:.....	22
3-Los prebióticos:	22
3.1-Salmosan:	22
3.2-La goma de Duraió:	23
4- β -mannanasa:	23
V- METODOS:.....	24
1-Condiciones experimentales:	24
1.1-Alojamiento:.....	24
1.2-Duración del ensayo:.....	24
1.3-Alojamiento y manejo:	24
1.4-Programa de alimentación:	24
2-Tratamientos y diseño experimental:	26
3-Desafío con Salmonella	27
4-Determinación de la presencia de Salmonella a nivel de ciegos:	27
5-Estudio inmunológico:	27

6-Estudio del perfil de los ácidos grasos volátiles.	29
7-Determinación de la viscosidad intestinal:	29
8-Controles productivos:	30
9-Análisis estadístico.....	30
VI- RESULTADOS:	32
1-Los rendimientos productivos:.....	32
2-La viscosidad ileal.....	37
3-Efecto de los prebióticos y la inoculación con Salmonella sobre el perfil de los ácidos grasos volátiles	38
4-Estudio bacteriológico (presencia y ausencia de Salmonella):	40
5-Estudio de la expresión génica a nivel intestinal:	43
VI- DISCUSION:	46
VII-CONCLUSIONES	50
Referencias bibliograficas	51
Anexo 1	58
Anexo 2	59

Índice de las tablas

Tabla 1: Ejemplos de serotipos <i>Salmonella enterica</i> ; sus hospederos y enfermedades.	9
Tabla 2: Serotipos más aislados de <i>Salmonella</i> reportados en los casos de salmonelosis en humanos confirmados en la UE	10
Tabla 3: ingredientes y composición nutricional calculada de la dieta base.	25
Tabla 4: Distribución de los tratamientos según desafío con <i>Salmonella</i> , contenido en prebióticos (Salmosan o Duraio) y/o enzima (β -mannanasa), número de parques dedicado a cada tratamiento.	26
Tabla 5: los promedios y la desviación estándar de los variables de los rendimientos productivos (peso vivo a los 7 días de edad, ganancia media diaria, consumo medio diario, índice de conversión) durante el periodo entre 0 y 7 días de edad.	32
Tabla 6: Los promedios y la desviación estándar de los parámetros productivos (peso vivo a los 29 días, ganancia media diaria, consumo medio diario, índice de conversión) durante la periodo entre 7 y 29 días de edad.	33
Tabla 7: los promedios y la desviación estándar de las variables de los rendimientos de producción (peso vivo a los 29 días, ganancia media diaria, consumo medio diario, índice de conversión, EPEF y las mortalidades) para todo el periodo de la prueba.	34
Tabla 8: Los promedios y la desviación estándar de las variables de los rendimientos productivos (PV a 7 días de edad, PV a 29 días de edad, GMD entre 7 a 29 días de edad) pesando los animales por separado, inoculados y los no inoculados.	35
Tabla 9: los promedios y la desviación estándar de los variables de los rendimientos productivos (peso vivo a los 7 días de edad, peso vivo a los 29 días de edad , la ganancia media diaria durante el periodo de 07 a 29 días de edad) pesando los animales por separado, los animales inoculados y los no inoculados.	36
Tabla 10: los promedios y la desviación estándar de la viscosidad ileal de los diferentes tratamientos.	38
Tabla 11: Perfil de los ácidos grasos volátiles en $\mu\text{mols/g}$ en pollos de 23 días de vida, 15 días post infección	39
Tabla 12: Análisis microbiológicos para la determinación de la Presencia/ausencia <i>S. Enteritidis</i> por periodos separados (4, 7 y 14 días post inoculación).	41
Tabla 13: Análisis microbiológicos para la determinación de la Presencia/ausencia <i>S. Enteritidis</i> por todo el period del experimento.	42
Tabla 14: La expresión génica de las citoquinas a nivel intestinal 4 días post inoculación expresada con referencia a GAPDH.	45

Índice de figuras

Figura 1: las células intestinales y las uniones intercelulares del epitelio intestinal.	5
Figura 2: Distribución relativa de <i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>S. Infantis</i> , <i>S.</i> Newport, y <i>S. Virchow</i> , realizada con encuestas para manadas de broiler (F) y encuestas para canales de broiler (C) en 18 países europeos.	12
Figura 3: estructura general de los galactomananos.	19
Figura 4: distribución de los tratamientos.	26

ABREVIACIONES

APC	Antibióticos Promotores de Crecimiento	
βGM	β-galactomamana	<i>"β-galactomannan"</i>
CBG	Carob Bean Gum.	
CMD	Consumo Medio Diario	
DCs	Células dendríticas	<i>"Dendritic Cells"</i>
EFSA	European Food Safety Authority	
FOS	Fructo-oligosacáridos	
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	
GIFN o IFN-γ	Interferon-gamma	
GMD	Ganancia Media Diaria	
IC	Índice de Conversión	
IL	Interleuquinas	<i>"Interleukins"</i>
LBG	Locust Bean Gum	
LPS	Lipopolisacáridos	
MHC-I	complejo mayor de histocompatibilidad I	<i>Major Histocompatibility Complex I</i>
MLN	Ganglio mesentérico	<i>"Mesenteric Lymph Node"</i>
MOS	Manano-oligosacáridos	
NK	Célula asesina natural	<i>"Natural Killer"</i>
PBS	Phosphate Buffered Saline	
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	<i>"Polymerase Chain Reaction"</i>
PT4	Phage Type 4	
RVS	Rappaport-Vassiliadis	
TLR	Receptor de tipo Toll	Toll Like Receptor
TM	Tonelada	
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-α	<i>"Tumor Necrosis Factor-α"</i>
UE	Unión Europea	
UFC	Units Forming Colony	

Resumen

El presente trabajo estudió el efecto de galactomananos sobre la presencia de la *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis y la reacción inmunitaria tras una inoculación experimental, y por el otro lado el efecto de estos productos sobre los rendimientos productivos de los pollos, viscosidad intestinal y contenido en ácidos grasos volátiles.

Se utilizaron 540 pollitos Ross 308 machos de un día de vida, alojados en parques en el suelo a razón de 30 animales por parque. Había un total de 5 tratamientos: UU_t (no inoculados no tratados); IU_t (inoculados no tratados); ITS (inoculados y tratados con Salmosan a 1000 mg/kg de pienso); ITD (inoculados y tratados con Duraió gum a 1000 mg/kg de pienso); y ITD β (ITD + β -mannanase). Cada tratamiento se replicó 4 veces excepto el UU_t que sólo tenía 2 parques.

La inoculación con *Salmonella enterica* var. Enteritidis se realizó a los siete días de vida con la mitad de los animales en cada parque de los tratamientos a inocular. Las variables productivas se determinaron a 7 y 29 días del estudio. La presencia de *Salmonella* se determinó a 4, 7 y 21 días post inoculación. La expresión génica de citoquinas se determinó a 4 días post inoculación, mientras que el contenido en ácidos grasos volátiles y la viscosidad intestinal se determinaron al final del estudio.

Independientemente del tipo de tratamiento o inoculación, las variables del peso vivo, ganancia media diaria e índice de conversión no fueron diferentes significativamente (p-valor > 0.1), por lo que ni la inoculación con *Salmonella* ni el tipo del tratamiento perjudicaron estos rendimientos productivos. Tampoco hubo diferencias en el peso vivo de los animales inoculados y no inoculados dentro del mismo parque al final del estudio. Los valores de la viscosidad ileal no han mostrado diferencias significativas entre los tratamientos (p-valor = 0.49). La inoculación provocó una disminución de la concentración de fórmico (p-valor < 0.001), y aún más con la inclusión de Duraió sin enzima (en comparación con animales inoculados no tratados). Las concentraciones de los demás ácidos grasos volátiles no fueron distintas entre los tratamientos.

Sólo el tratamiento T3 (Salmosan) disminuyó significativamente ($P \chi^2 = 0.02$) la colonización de *Salmonella* (un pollo positivo sobre un total de 28 pollos muestreados con Salmosan, y 8 pollos positivos sobre un total de 32 pollos en el grupo de los pollos inoculados no tratados). La inoculación provocó una disminución de la expresión génica del TNF- α (p-valor = 0.007). La expresión génica de los demás citoquinas no fue distinta entre los tratamientos.

Résumé

Ce travail a étudié d'une part l'effet des galactommananes sur la présence de *Salmonella enterica* de sérotype Enteritidis et la réponse immunitaire après une inoculation expérimentale, et d'autre part l'effet de ces produits sur les performances de croissance des poulets, la viscosité intestinale et le contenu intestinal des acides gras volatiles.

Nous avons utilisé 540 poulets mâles Ross 308 d'un jour de vie, logés dans des lots dans le sol à raison de 30 animaux par lot. Il y avait un total de 5 traitements: UU_t (non traité non inoculé) IU_t (non traité inoculé), ITS (inoculé et traité avec Salmosan à raison de 1000 mg / kg d'aliment), ITD (inoculé et traité avec Duraió gum à 1000 mg / kg d'aliment) et ITD β (ITD + β -mannanase). Nous avons désigné 4 lots pour traitement à l'exception du traitement UU_t qui avait seulement 2 lots.

L'inoculation avec *Salmonella enterica* var. Enteritidis a été effectuée sept jours de vie, avec la moitié des animaux dans chaque lot appartenant à un traitement destiné à l'inoculation. Les variables des performances zootechniques ont été déterminées à 7 et 29 jours de l'étude. La présence de *Salmonella* dans le cecum a été déterminée à 4, 7 et 21 jours après l'inoculation. L'expression des gènes des cytokines a été évaluée à 4 jours après l'inoculation, alors que la teneur en acides gras volatils et la viscosité intestinale ont été déterminées à la fin de l'étude.

Quel que soit le type de traitement ou d'inoculation, les variables de poids vif, le gain moyen quotidien et l'indice de consommation ne différaient pas significativement ($p > 0,1$), ce qui permet de dire que ni l'inoculation avec *Salmonella* ni le type de traitement n'avaient perturbé ces performances zootechniques. Il n'y avait aucune différence dans le poids vif des animaux inoculés et non inoculés du même lot à la fin de l'étude. Les valeurs de la viscosité iléale n'étaient pas statistiquement différentes entre les différents traitements ($p = 0,49$). L'inoculation a entraîné une diminution de la concentration de l'acide formique (valeur $p < 0,001$), ainsi que l'inclusion de Duraió sans enzyme (par rapport aux animaux inoculés non traités). La concentration des autres acides gras volatils n'étaient pas différents entre les traitements.

Seul le traitement T3 (Salmosan) a diminué de façon significative ($P\chi^2 = 0,02$) la colonisation de *Salmonella* (un poulet positif sur un total de 28 poulets prélevés pour le Salmosan et 8 poulets positifs sur un total de 32 poulets dans le groupe des poulets inoculés non traités «T2»). L'inoculation a entraîné une diminution de l'expression du gène TNF- α ($p = 0,007$), tandis que l'expression génique des autres cytokines n'était pas différente entre les traitements.

Abstract

This work studied the effect of galactomannans on the presence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and the immune response of chickens after experimental inoculation, and also studied the effect of these products on growth performance, intestinal viscosity and intestinal volatile fatty acid concentration.

Five hundred forty one-day old Ross 308 male broiler chickens were used in this study, allocated in floor pens at 30 animals per replicate. There was a total of 5 treatments: UU_t (uninoculated untreated); IU_t (inoculated untreated); ITS (inoculated and treated with Salmosan at 1000 mg / kg of feed); ITD (inoculated and treated with Duraió gum at 1000 mg / kg of feed) and ITD β (ITD + β -mannanase). Each treatment was replicated 4 times except the UU_t only had 2 replicates.

Inoculation with *Salmonella enterica* var. Enteritidis was carried out the seventh day, on half of the animals in each group belonging to an inoculated treatment. Animal performance variables were determined at 7 and 29 days of the study. The presence of *Salmonella* in the cecum was determined at 4, 7 and 21 days after inoculation. Gene expression of cytokines was estimated at 4 days after inoculation, while volatile fatty acids concentration and intestinal viscosity were determined at the end of the study.

Regardless of the type of treatment or inoculation, weight variables, average daily gain and feed conversion were not significantly different (p value > 0.1), so that neither inoculation with *Salmonella* nor the type of treatment impaired these variables. There was no differences in the live weight of inoculated and non-inoculated animals within each park at the end of the study. The values of the ileal viscosity were not statistically different among treatments (p -value = 0.49). The inoculation resulted in a decrease of the concentration of formic acid (p -value < 0.001) and even more with inclusion of Duraió without enzyme (versus inoculated untreated animals). The concentration of other volatile fatty acids was not different between treatments.

Only the treatment with Salmosan significantly decreased ($P\chi^2 = 0.02$) *Salmonella* colonization (one chicken positive on a total of 28 chickens sampled in Salmosan treatment, and 8 positive chickens on a total of 32 chickens in group of chickens inoculated untreated). The inoculation resulted in a decrease in gene expression of TNF- α (p -value = 0.007). The gene expression of other cytokines was not different between treatments.

I- INTRODUCCION

Las bacterias patógenas entéricas, tales como *Salmonella* son un problema de salud mundial muy importante. Las infecciones por este patógeno son la causa más frecuente de brotes de origen alimentario de gastroenteritis en adultos y niños (**EFSA 2011a**). La *Salmonella* es un gran problema para la industria avícola porque los pollos son considerados como la fuente principal de las infecciones humanas. Ellos son considerados como portadores asintomáticos, desprendiéndose de las bacterias en las heces sin signos clínicos (**Zhang-Barber et al., 1999; Awad et al., 2012**).

Entre 1960 y 2000 la producción de la carne de cerdo se ha duplicado y la de las aves casi se ha cuadruplicado. Durante este período, la mayoría de estos animales se ha alimentado con antibióticos promotores del crecimiento (APC) como herramienta de prevención de la contaminación para las bacterias patogénicas con unas mejores condiciones de salud animal y una producción de carne eficiente (**Millet y Maertens, 2011**).

Sin embargo, el uso de los antibióticos promotores del crecimiento (APC) incrementa la prevalencia de bacterias resistentes a los antibióticos en los animales y constituye un riesgo potencial de transferencia de esta resistencia a los antibióticos hacia las bacterias patógenas humanas, a través del consumo de productos derivados de animales (**World Health Organisation, 1997**). La prohibición europea de los APC en la producción animal (CE 1831/2003) aumentó la necesidad de desarrollar nuevas alternativas para controlar y prevenir la colonización de las bacterias patógenas en los animales y de alguna manera garantizar el bienestar animal y la seguridad alimentaria.

Los probióticos y prebióticos son alternativas interesantes a los APC para la alimentación animal, controlando la colonización de las bacterias patogénicas y mejorando el sistema inmune de la mucosa intestinal, lo que resulta en una disminución de la carga patogénica y mejora del bienestar animal (**Gaggìa et al., 2010 y Vilà et al., 2010**).

Los medios más comunes de adhesiones expresadas por numerosas bacterias, son las lectinas superficiales que son generalmente bajo forma de múltiples subunidades de proteínas submicroscópicas designadas como fimbrias o pili y que se combinan con carbohidratos complementarios presentes en las superficies de las células del huésped

como por ejemplo la manosa que se une a las fimbrias de casi todas las cepas de *E. coli*, así como otros miembros de la familia Enterobacteriaceae, tales como *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Shigella* y también la *Salmonella* (Fimbria tipo 1, sensible a la aglutinación en presencia de manosa). Estas fimbrias sirven como factores de virulencia de los microorganismos y el bloqueo o la inhibición de estas fimbrias por los hidratos de carbono adecuados o sus análogos para la prevención y tratamiento de enfermedades microbianas es el objetivo de la terapia anti-adherencia de estas enfermedades (**Sharon, 2006; Becker y Galletti, 2008; Badia, 2012**).

Los galactomananos de goma de algarroba (CBG) son prebióticos formados de unidades de azúcar de manosa y galactosa en una proporción de 4:1, por lo tanto la manosa podría adherirse a las fimbrias de *Salmonella*, interfiriendo así con los mecanismos de adhesión en el intestino y disminuyendo la contaminación del pollo por *Salmonella* (**Badia, 2012 y Vilà et al., 2012**). Sin embargo, una característica de los galactomananos CBG es su alta viscosidad en soluciones acuosas (**Battle y Tous, 1989**). Esta viscosidad puede afectar tanto la digestibilidad de nutrientes como los rendimientos productivos de los pollos debido a la disminución de la actividad enzimática de las enzimas digestivos, reducción de la capacidad del intestino para mezclar el contenido intestinal, y disminución de la velocidad del tránsito intestinal de la digesta (**Lee et al., 2003**).

Por lo tanto en este trabajo se estudia por un lado el efecto de los CBG de la variedad “Duraió” sobre la presencia de la *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis y la reacción inmunitaria del animal tras una inoculación experimental de los pollos con dicha bacteria, comparando este efecto con otro de un producto comercial “SALMOSAN” y por el otro lado el efecto de estos productos sobre los rendimientos productivos de los pollos, viscosidad intestinal y contenido en ácidos grasos volátiles.

II- REVISION BIBLIOGRAFICA:

1-la Salmonella:

1-1. Definicion de la bacteria Salmonella:

La *Salmonella* pertenece a la familia de Enterobacteriaceae, es un anaerobio, Gram negativo, intracelular facultativo de importancia mundial reconocido como un importante patógeno zoonótico de significación económica tanto en los animales como en los seres humanos causando 1300 millones de casos de enfermedad por año. El género *Salmonella* se divide en dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*. *Salmonella enterica* se divide en seis sub-especies de *Salmonella* y la mayoría pertenecen a la subespecie *S. enterica* subespecie *entérica* y que representa la única subespecie que causa enfermedades en animales de sangre caliente. Los microorganismos se identifican por género seguido por serotipo, como por ejemplo el *Salmonella* Enteritidis donde la *Salmonella* es genero y Enteritidis es el serotipo. Se han identificado más de 2.500 serotipos de *Salmonella* y la prevalencia de los distintos serotipos cambia en el tiempo. Los serotipos se diferencian por sus flagelos, hidratos de carbono y lipopolisacárido (LPS). Las especies de *S. entérica* suelen ser adquiridas por vía oral y causan una de los cuatro grandes síndromes: fiebre entérica (fiebre tifoidea), enterocolitis / diarrea, bacteriemia y portador crónico. En los humanos, los serotipos *Typhi*, *Paratyphi* y *Sendai* causan fiebre entérica, mientras que la mayoría de los serotipos causan enterocolitis y diarreas (EFSA 2011a; Haraga *et al.*, 2008; Coburn *et al.*, 2007).

1-2. El reservorio de la bacteria:

El reservorio principal de las bacterias del género *Salmonella* es el tracto intestinal de los vertebrados. Varias especies animales llevan este patógeno (aves, ganado vacuno, cerdos, peces, reptiles). La subespecie *enterica* está bien adaptada a los animales de sangre caliente y a los seres humanos. Entre los serotipos de esta subespecie, algunos son estrictamente adaptados a los seres humanos (*S. Typhi*, *S. Paratyphi*), mientras que otros serotipos son adaptados para animales (*S. Abortusovis* en ovino, *S. Pullorum* y *S. Gallinarum* en pollos). En el caso de *S. Pullorum* y *S. Gallinarum*, hoy en día estos serotipos no tienen incidencia en UE dado que se ha producido planes de erradicación. Otros son ubicuos como el caso de la *S. Typhimurium* que se puede encontrar en la mayoría de los animales (mamíferos, aves, reptiles...). Algunos serotipos tienen una

predilección; *S. Enteritidis*, *S. Hadar*, *S. Heidelberg*, *S. Saintpaul*, *S. Virchow* y *S. Infantis* que contaminan principalmente las aves (pollo, pavo, pato) y los serotipos *S. Dublín* *S. Bovismorbificans* infectan principalmente ganado vacuno, mientras que *S. Derby*, *S. Brandenburg* y *S. Panamá* son frecuentemente aislados en cerdos (EFSA 2011a ; François-Xavier, 2008).

La *Salmonella* es capaz de crecer a temperaturas dentro de un intervalo de 8°C a 45°C y dentro del alimento en un intervalo de pH entre 4 y 9. Requiere una actividad agua (aw) por encima de 0,94. La *Salmonella* es sensible al calor y generalmente muere a temperaturas de 70 ° C y más (Mani-López *et al.*, 2012; Silva y Gibbs, 2012).

1-3. Infección de pollos por Salmonella:

La salmonelosis en las aves es más un problema de salud pública que de sanidad animal, ya que produce toxiinfecciones en personas que consumen alimentos contaminados por *Salmonella*. Su principal manifestación en el hombre son los síntomas digestivos, como los vómitos y las diarreas (EFSA 2011b).

Un estudio indicó que el 20,4% de las granjas de ponedoras en los países europeos fueron positivas para *Salmonella enteritidis* o *Salmonella typhimurium*, con valores que van desde 0% a 79,5% de las manadas por países distintos (Gast, 2007).

La producción avícola representa la fuente principal de las infecciones humanas por la *Salmonella* y es considerada como portadora asintomática, excretando las bacterias en las heces sin manifestar signos clínicos (Awad *et al.*, 2012).

Un trabajo reciente (Awad *et al.*, 2012) demuestra que el epitelio intestinal de los pollos tiene una menor sensibilidad hacia los mediadores inflamatorios (histamina) en infecciones experimentales con la *S. Enteritidis*, lo que contribuye en mayor medida a la ausencia de las diarreas después de la infección por dicha bacteria.

En cambio se han observado lesiones epiteliales después de la infección por *Salmonella Enteritidis* en gallinas ponedoras pero esas lesiones son muy moderadas en comparación con las de los mamíferos (Porter y Holt, 1993). Varios posibles factores de virulencia de *Salmonella Enteritidis* podrían contribuir a la infección y al daño de la mucosa intestinal conduciendo a la invasión epitelial, y a la inducción de una respuesta inflamatoria (Mehta *et al*, 1998).

Se ha demostrado que algunos agentes patógenos entéricos alteran la permeabilidad de la barrera intestinal al interferir con las uniones estrechas intercelulares del epitelio

intestinal (**figura 1**) (Yu y Yang, 2009). La fuga a través las células intestinales puede ser evidente incluso en ausencia del daño histológico y contribuye a la alteración del transporte intestinal selectiva (Awad *et al.*, 2012).

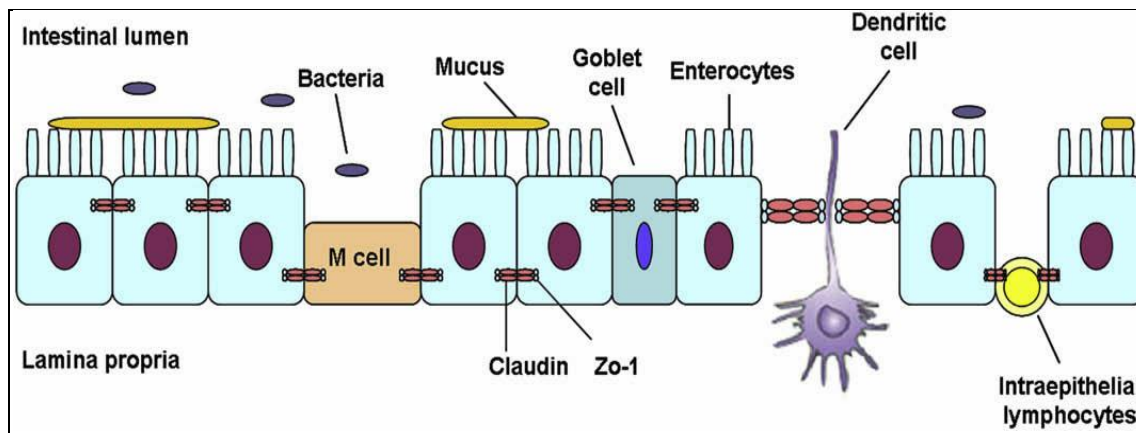


Figura 1: El epitelio gastrointestinal contiene enterocitos, linfocitos intraepiteliales, células caliciformes (goblet cells), células microfold (M cell), y células dendríticas, sirven como una barrera protectora que separa el contenido luminal de los compartimentos de tejido subyacente. Todas estas células epiteliales expresan proteínas de unión complejas y forman uniones estrechas con las células adyacentes (Yu y Yang, 2009).

En infecciones experimentales con *S. Typhimurium* se ha visto que los pollos han podido eliminar la bacteria naturalmente tanto del intestino como de los tejidos a partir de 9 semanas de edad (Zhang-Barber *et al.*, 1999).

1-4. Colonización y adhesión de la salmonella al epitelio intestinal:

En general la introducción de *Salmonella* se hace oralmente después de la ingestión del alimento o del agua contaminada. Dentro del tracto digestivo, el patógeno posee herramientas para escaparse de las enzimas digestivas, las sales biliares, los anticuerpos y los péptidos antimicrobianos, para llegar al epitelio (Haraga *et al.*, 2008).

La *Salmonella* entra preferentemente en las regiones distales del íleo por las zonas con organización linfoides para después ser internalizada por las células dendríticas (DCs) que se caracterizan por sus extensiones o dendritas que se extienden entre las células intestinales y que se dedican al conocimiento y a la captura del antígeno. Otra vía posible de entrada del patógeno es a través de los enterocitos. Después la *Salmonella* se

replica dentro de los macrófagos tras acceder a la lámina propia y acceder al ganglio mesentérico (MLN) a través de las DCs o como bacteria libre. A partir de MLN, la *Salmonella* coloniza otros tejidos como el ganglio linfático, médula ósea, el hígado, el bazo, los ovarios (especialmente *S. Gallinarum* y *S. Enteritidis*). El grado y la gravedad de la colonización bacteriana, la invasión de órganos, y la persistencia es altamente relacionada con el serotipo de *Salmonella*, las dosis y de la edad de pollo en el momento de la infección (**Zhang-Barber et al., 1999; Badia, 2012; EFSA, 2010**).

El patógeno se une inicialmente a la superficie de la mucosa intestinal, y esta interacción implica la unión de las fimbrias mediante las adhesinas bacterianas a los receptores en las superficies de las células epiteliales intestinales. La *Salmonella enterica* serovar Enteritidis produce varios tipos de adhesinas fimbrias. La afinidad específica de estas bacterias por la manosa reside en la presencia de la adhesina FimH situada sobre la extremidad de la fimbria tipo 1 de *Salmonella* (**Badia, 2012**).

La resistencia contra la enfermedad clínica debida a *S. enteritidis* o a otros serotipos no tifoideas aumenta rápidamente con el desarrollo de la flora intestinal normal y el sistema inmunológico del pollo (**EFSA, 2010**).

1-5. Regulación de la respuesta innata:

1-5-1. Quimioquinas:

Las quimioquinas son proteínas básicas de 70-125 aminoácidos. Se diferencian basándose en la posición de los residuos de cisteína (C) en la región N-terminal de dicha proteína, diferenciándolas en quimioquinas C, CC, CXC, y CX3C. Las quimioquinas CXC a su vez se subdividen en ELR⁺ y ELR⁻ según la presencia o la ausencia del triplete de aminoácidos Glu-Leu-Arg que preceden la primera cisteína de la secuencia de los aminoácidos de la quimioquina. Existen varios tipos de células que producen estas quimioquinas. Las quimioquinas ejercen funciones sobre una o varias clases de células mononucleares (macrófagos, DCs), eosinófilos y basófilos; los ELR⁺CXC actúan sobre los neutrófilos; los ELR⁻CXC atraen linfocito. Las quimioquinas CCL2, CCL3, y CCL20 tienen funciones protectoras contra la *Salmonella* pero también conducen a la destrucción tisular mediante el flujo masivo de las células inflamatorias hacia los órganos infectados (**Coburn et al., 2007; Badia, 2012**).

1-5-2.Citoquinas:

En general la comunicación entre las células inmunitarias se hace mediante las citoquinas. Las citoquinas juegan un papel importante en la iniciación y la regulación tanto en la respuesta inmune innata como la adquirida frente a la *Salmonella*. Se producen por diferentes tipos de células y actúan sobre varias células. Los experimentos en cultivos celulares demuestran que la *Salmonella* puede provocar la síntesis de citoquinas y quimioquinas en las células epiteliales, macrófagos y las DCs (Coburn *et al.*, 2007). Existen varios tipos de citoquinas como las interleuquinas (regulación de la interacción entre linfocitos y otros leucocitos), interferones, factores de necrosis tumoral, factores de crecimiento (Badia, 2012). El interferón (IFN)- γ , IL-12, factor de necrosis tumoral (TNF)- α , IL-18, factor transformador del crecimiento - β y las quimioquinas CCL2 tienen funciones protectoras durante la infección por la *Salmonella*, mientras que IL-4 y IL-10 interfieren con las defensas del huésped. La neutralización del (IFN)- γ conduce a la disminución de la destrucción de la *Salmonella* mientras que la neutralización del (TNF)- α resulta en un incremento de la replicación bacteriana (Coburn *et al.*, 2007).

La producción de citoquinas y quimioquinas no solamente tiene efectos beneficiosos para el huésped sino también conduce a unas repercusiones patológicas para el huésped. Las quimioquinas MCP-1, CCL2, CCL20 y CCL3 tienen funciones protectoras contra la *Salmonella* pero también pueden conducir a la destrucción tisular a través la activación de un flujo masivo de células inflamatorias en los órganos afectados (Coburn *et al.*, 2007). Se diferencian tres grupos basándose a su función biológica (Badia, 2012):

- **mediadores y reguladores de la respuesta innata:**

Su secreción por los fagocitos mononucleares es la consecuencia en respuesta a los agentes infecciosos tras el reconocimiento de los patrones moleculares asociados a los patógenos o **PAMPs** “*Pathogen Associated Molecular Patterns*” (expresadas por varios agentes infecciosos) mediante los receptores de reconocimiento de patrones o **PRRs** “*Pattern Recognition Receptor*” (como los TLRs). Entre estas citoquinas están las interleuquinas (IL6 y IL1), el factor de necrosis tumoral- α (TNF α) o los interferones de tipo I (IFN, relacionados con la respuesta frente a los virus). Estas citoquinas tienen efectos sobre las células endoteliales, leucocitos, actividad proinflamatoria. Otros tipos de células pueden producir las citoquinas de este grupo.

- **mediadores y reguladores de la respuesta adquirida:**

El conocimiento específico del antígeno extraño por los linfocitos T conduce a la liberación de citoquinas por estas células como para ejemplo las citoquinas IL2, IL4, IL12 y IFN_γ que regulan la proliferación y la diferenciación de diversas poblaciones linfocitarias estableciendo la respuesta adquirida celular o humoral.

- **factores estimuladores de la hematopoyesis:**

Las células estromales de la médula ósea producen estas citoquinas. Tienen funciones sobre el crecimiento y la diferenciación de leucocitos inmaduros como por ejemplo el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.

Una parte de nuestro trabajo de investigación se enfoca en la evaluación de la expresión génica de determinadas citoquinas relacionadas con la repuesta innata y adquirida.

2-Brotes de intoxicaciones alimentarias causados por Salmonella:

En la UE, *S. Enteritidis* y *S. typhimurium* son los serotipos más frecuentemente asociados con enfermedades humanas. Los casos de brotes en humanos causados por *S. Enteritidis* son comúnmente asociados con el consumo de huevos contaminados y carne de pollos, mientras que los casos de brotes causados por *S. Typhimurium* son en su mayoría asociados con el consumo de carne de cerdo contaminado, carne de pollo y también carne de bovino (EFSA 2011a).

Cualquier serotipo que no es adaptado para un huésped, como por ejemplo la *S. Enteritidis* (Tabla 1) es capaz de causar enfermedades gastrointestinales en los seres humanos, y por lo tanto debe ser considerado de potencial importancia para la salud pública (EFSA 2011b).

La *Salmonella* tiene una tolerancia adaptativa frente a la acidez gástrica que podría promover su supervivencia en el entorno de bajo pH del estómago. Las especificidades huésped y los síntomas de las enfermedades que se producen por algunos de los miles de serotipos de *Salmonella* se indican en la Tabla 1 (Haraga *et al.*, 2008).

Tabla 1: Ejemplos de serotipos *Salmonella enterica*; sus hospederos y enfermedades.

Serotipo de <i>Salmonella enterica</i>	La especificidad para el huésped	Enfermedades y síntomas
Tifoidea		
Typhi; Paratyphi	Restringida para seres humanos	Fiebre entérica: fiebre, dolor abdominal, diarrea o estreñimiento transitorio y una erupción de color salmón en el tronco
No tifoidea		
Typhimurium; Enteritidis	Amplio rango	Gastroenteritis: dolor abdominal, vómitos y diarrea inflamatoria

En general, estos brotes causados por *salmonella* en humanos se caracterizan por un cuadro clínico que puede incluir fiebre, diarreas, dolor abdominal, náuseas y vómitos (Lax *et al.*, 1995; EFSA 2011a). El período de incubación para la manifestación de los síntomas es de 6 a 72 horas después de la ingestión del alimento o el agua contaminado. En casos no complicados, la evolución aguda de la gastroenteritis se resuelve generalmente dentro de 48 horas. Sin embargo, en algunas ocasiones la enfermedad puede durar más tiempo, con diarreas persistentes y fiebre baja durante 10-14 días. Las versiones sistémicas más graves se producen en personas vulnerables, como individuos inmunodeprimidos, los niños pequeños, los ancianos que tienen menos capacidad para iniciar la resistencia a la infección (Lax *et al.*, 1995; Mani-López *et al.*, 2012).

3- Prevalencia Salmonella en seres humanos en la UE

En esta revisión, la salmonelosis se refiere a la salmonelosis no tifoidea que se asocia más frecuentemente con la intoxicación alimentaria.

Un total de 108.614 casos confirmados de salmonelosis humana se registraron en 27 estados miembros europeos a través del sistema de vigilancia europea en 2009. La tasa de notificación de la UE fue de 23,7 casos por cada 100.000 habitantes, que van desde 2,1 en Portugal a 100,1 casos confirmados por cada 100.000 habitantes en la República Checa. Como en años anteriores, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* fueron los serotipos más frecuentes (75,6% de todos los serotipos notificados). (EFSA 2011a).

S. Enteritidis fue el serotipo predominante asociado con los brotes de *Salmonella*. En Europa ésto fue causado por *S. enteritidis* fagotipo PT4 mientras en Estados Unidos los tipos más frecuentes son PT8 y PT13a (Desmidt *et al.*, 1997). En 2009 según datos del informe EFSA, *S. Enteritidis* representó el 59,6% de todos los brotes causados por *Salmonella*, el 73,1% de las hospitalizaciones y el 66,7% de los casos de defunciones. *S. Typhimurium* causó el 15,7% de los brotes verificados, el 10,9% de todas las hospitalizaciones y el 33,3% de todas las muertes en 2009. Un 17,9% de los brotes verificados causados por *Salmonella*, no fue serotipado. (EFSA 2011b).

La incidencia global de salmonelosis humana en los países europeos ha sido decreciente desde 2006 hasta 2009, que se explica principalmente por una tendencia a la baja en el número de infecciones causadas por *S. Enteritidis* (Tabla 2).

Tabla 2: Serotipos más aislados de *Salmonella* reportados en los casos de salmonelosis en humanos confirmados en la UE (EFSA 2011b).

Serovar	2009		2008		2007		2006	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>S. Enteritidis</i>	53.382	52,3	70.091	58	81.472	64,5	90.362	71
<i>S. Typhimurium</i>	23.759	23,3	26.423	21,9	20.781	16,5	18.685	14,7
<i>S. Infantis</i>	1.616	1,6	1.317	1,1	1.13	1	1.246	1
<i>S. Bovismorbificans</i>	433	0,4	501	0,4	np	np	np	np
<i>S. Hadar</i>	507	0,5	np	np	479	0,4	713	0,6
<i>S. Virchow</i>	736	0,7	860	0,7	1.068	0,8	1.056	0,8
<i>S. Derby</i>	671	0,7	624	0,5	469	0,4	477	0,4
<i>S. Newport</i>	760	0,7	787	0,7	733	0,6	730	0,6
<i>S. Stanley</i>	np	np	529	0,4	589	0,5	522	0,4
<i>S. Agona</i>	np	np	636	0,5	387	0,3	367	0,3
<i>S. Kentucky</i>	460	0,4	497	0,4	431	0,3	357	0,3
<i>S. Saintpaul</i>	452	0,5	np	np	np	np	np	np
Other	19.225	18,8	18.495	15,3	18.562	14,7	12.79	10
Total	102.001		120.76		126.281		127.305	
Unknow	6.613		6.636		9.814		17.359	

np: no presentada en los datos publicados.

Los datos de la **Tabla 2** muestran que en los países de la unión europea en el período de 2006 a 2009, sumando *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* fueron encontrados al menos en el 75% de todos los casos notificados de salmonelosis humana.

Hay que señalar que el número de infecciones humanas asociadas con *S. Enteritidis* tiene una tendencia a la baja desde el año 2006 a un ritmo creciente, con una disminución aproximada del 10% entre 2006 y 2007 a una reducción aproximada del 24% entre 2008 y 2009. Por el contrario. Los casos de infecciones causados por *S. Typhimurium* aumentaron alrededor del 40% entre 2006 y 2008.

4-La Salmonella en gallinas ponedoras:

Las ponedoras representan el reservorio más importante de la salmonelosis humana causada por *Salmonella* Enteritidis a través el consumo de huevos y ovoproductos contaminados. Una revisión de la literatura indica que en los brotes que se producen en la UE relacionados con el consumo de huevos u ovoproductos, el 97% de los casos fue causado por *S. Enteritidis* mientras que el 2% de los casos la *S. Typhimurium* ha sido la agente causal. Esto está relacionado con la mayor capacidad que tenga *S. Enteritidis* para colonizar el epitelio reproductivo de la gallina respecto a otros serotipos (EFSA, 2010). En Dinamarca, la proporción de las manadas de ponedoras infectadas se redujo de 13,4% en 1998 al 0,4% en 2006 y eso fue de forma paralela con el número de casos de salmonelosis humana asociada al consumo de huevos contaminados que a su vez se redujo de 3.000 casos en 1997 a 100 casos en 2006 (Korsgaard et al., 2009 citado por EFSA, 2010).

Los brotes causados por *Salmonella* Enteritidis pueden ocurrir tras el contacto con la cascara del huevo y/o el consumo del contenido interno del huevo, sin embargo el impacto de la contaminación humana con la cascara del huevo en la salud pública se considera menor en comparación con la transmisión por huevos contaminados internamente con *Salmonella* Enteritidis. Esto está relacionado con la persistencia en la colonización del tracto reproductivo de la gallina por este serotipo (*S. Enteritidis*), lo que resulta en la producción de huevos contaminados, por lo tanto las infecciones humanas se pueden reducir considerablemente mediante la prevención y el control de las infecciones por *S. Enteritidis* en gallinas ponedoras (EFSA, 2010).

5-La Salmonella en la carne de broilers:

La carne de los pollos es muy perecedera debido a su composición nutricional enriquecida, alto pH (5,5 a 6,5) y una alta actividad agua (0,98-0,99), que favorecen la supervivencia y el crecimiento de casi cualquier microorganismo contaminante (Mani-López *et al.*, 2012). Las industrias de la carne y el pollo de engorde se consideran como un reservorio de *Salmonella* muy importante en cuanto a la transmisión alimentaria. Durante muchos años, la *Salmonella* se ha asociado a la carne de los pollos de engorde, debido a su presencia en las heces, la suciedad de las plumas, las canales, así como la suciedad de los equipos del matadero y su papel en la contaminación de las canales durante el sacrificio de los pollos.

La mayoría de las cepas de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* que pueden infectar los pollos de engorde son de mayor importancia para la salud pública a través productos como los huevos, carne de cerdo, carne de bovino, productos lácteos o incluso animales de compañía que pueden presentar un riesgo mayor para la salud pública (EFSA 2011b).

En la **Figura 2**, se presentan los resultados de la distribución de la frecuencia de los 5 serotipos mas encontrados en la salmonelosis humana en el año 2009 realizados a partir de encuestas para los diferentes países europeos tanto en granjas de pollos de engorde como en canales de broiler.

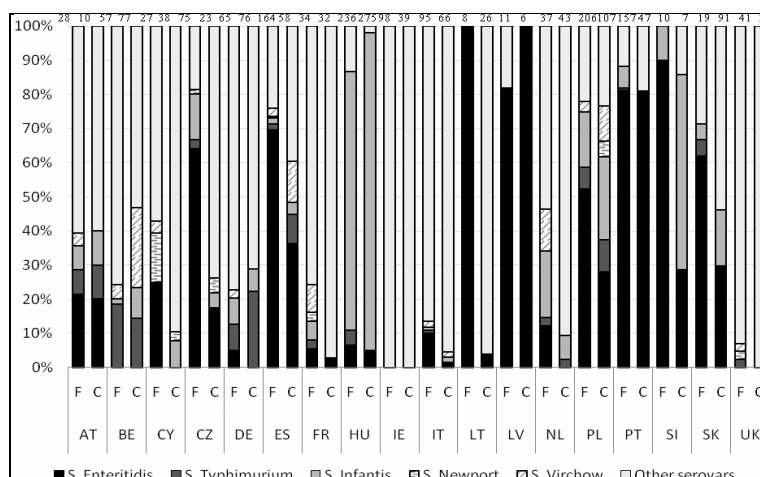


Figura 2: Distribución relativa de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Newport*, y *S. Virchow*, realizada con encuestas para manadas de broiler (F) y encuestas para canales de broiler (C) en 18 países europeos. El número en la parte superior de cada barra representa el número total de muestras positivas en cada uno de los estudios de referencia pertinentes. (EFSA 2011b).

En el caso de España (ES) en 2009 se ha detectado 164 manadas de pollo de engorde positiva a la *Salmonella* en las que *S. Enteritidis* representa casi el 70% de los serotipos identificados y casi el 40% de las 58 canales positivas a la *Salmonella*, también se observa que tanto en manadas de pollos como en canales de pollos, *S. Enteritidis* representa el serotipo más encontrado en año 2009 en el caso de España. Por lo tanto el control de la ocurrencia de *S. Enteritidis* debe realizarse no sólo en las gallinas reproductoras para disminuir su transmisión vertical a las líneas de producción (gallinas ponedoras y pollos de engorde), y en gallinas ponedoras para evitar su presencia en los huevos, sino también en la reducción continua de la prevalencia de *S. Enteritidis*, en la producción de pollos (EFSA 2011b).

6-Estrategias nutricionales para combatir la salmonella:

6.1- Antibióticos:

Además de sus efectos curativos, los antibióticos también se administraban en los piensos de pollos por sus efectos promotores del crecimiento. La mayoría de los antibióticos promotores de crecimiento actuaban mediante la modificación de la flora intestinal, especialmente dirigidos a las bacterias gram-negativas que no son patógenas y que están asociadas a un peor estado de salud y unos bajos rendimientos productivos (Bedford, 2000). Estas bacterias pueden perjudicar el índice de conversión y el crecimiento de los pollos debido a la competencia de estas bacterias con el huésped por los nutrientes en el tracto intestinal, la degradación de las enzimas del huésped y la reducción de la superficie de absorción. En algunos casos, estas bacterias pueden provocar una respuesta inmune que, como efecto secundario, provoca la reducción del apetito y el catabolismo de las proteínas musculares. Uno de los mecanismos subyacentes a estos fenómenos es la producción masiva del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).

Por estas razones, los antibióticos se han utilizado durante muchos años como promotores del crecimiento. Recientemente, sin embargo, surgieron preocupaciones sobre el uso de los antibióticos en el ganado por el hecho de que estaban vinculados a la aparición de múltiples bacterias resistentes a los medicamentos (Wray y Davies, 2000). En general, las mayores cantidades de los antibióticos se usaban para la profilaxis o sobretodo como promotores del crecimiento en la alimentación animal. Esto resultaba en una exposición de un gran número de animales, independientemente de su estado de

salud, a una concentración frecuentemente subterapéutica de estos antibióticos (**Dupont y Steele, 1987; Franco *et al.*, 1990**). Además, estos antibióticos que se administraban a los animales eran compuestos estrechamente relacionados con los que se utilizan en la terapia humana y que estaban ejerciendo una presión selectiva sobre sus bacterias dianas desde hace unas décadas (**Witte, 1998**), lo que puede generar un reservorio de bacterias resistentes a los antibióticos.

Las bacterias resistentes a los antibioticos en los animales amenazan el uso de los medicamentos utilizados en humanos cuando estas bacterias resistentes a los antibióticos o los genes resistentes sean incorporados en las poblaciones bacterianas del hombre (**Smith *et al.*, 2002**).

En un estudio realizado en Brasil (**Dias de Oliveira *et al.*, 2005**), sobre la resistencia de la *salmonella* a diferentes antibióticos (12 antibióticos) con 91 cepas de *Salmonella* Enteritidis aisladas de alimentos, humanos, aves y canales de broiler, han notado una tasa de resistencia del 98% de unas cepas de *S. Enteritidis* aisladas desde muestras de canales de broilers y aves, y una resistencia a las sulfonamidas del 88.2% desde muestras aisladas del ser humano. También en otro estudio de **Ling y Wang (2001)** en Singapur encontraron una tasa de resistencia a las sulfonamidas del 75.3% de cepas de *S. Enteritidis* aisladas desde muestras de humano y de piensos para pollos.

En otro trabajo de comparación realizado en España entre el año 1993 y el año 2006 sobre la prevalencia y la resistencia antimicrobiana de serotipos de *salmonella* aisladas de canales de pollos, se ha visto que la prevalencia de *salmonella* disminuyó del 55% de las muestras en el año 1993 al 12% de las muestras en el año 2006 con una diferencia significativa, y esto fue acompañado con que el número promedio de los antibióticos a los que las cepas de *salmonella* eran resistentes fue menor ($P < 0.05$) en el año 1993 (3,98) que en año 2006 (5,00), también se observó un aumento de la incidencia de la resistencia a la cefalotina, enrofloxacin y la tetraciclina en el año 2006 respecto el año 1993 (**Álvarez-Fernández *et al.*, 2012**). Entonces las disminuciones en la prevalencia de *Salmonella* entre 1993 y 2006 sugieren que las medidas obligatorias introducidas a lo largo de la última década en la Unión Europea para reducir la incidencia de *Salmonella* en pollos, aparentemente han tenido éxito. Sin embargo, el aumento en las tasas de resistencia a los antibióticos constituye una amenaza para la salud pública, debido a que los datos de este estudio demuestran que el pollo en España (el caso de noroeste de España en este estudio) es una fuente potencial de cepas de *Salmonella* resistentes a los antibióticos.

Por lo tanto la inhibición de la *Salmonella* mediante los antibióticos no parece ser práctica debido a la resistencia bacteriana desarrollada por esas bacterias frente a los antibióticos y también a la toxicidad producida por los residuos de los antibióticos en la carne de los animales.

6.2-Probióticos:

Los probióticos se definen como cultivos simples o mixtos de microorganismos vivos que, cuando se aplica a los animales o al hombre, afectan beneficiosamente al huésped mejorando las propiedades de la microflora indígena. Las bifidobacterias y lactobacilos son considerados como microorganismos beneficiosos, creando condiciones desfavorables para el crecimiento de patógenos, tales como *Salmonella* (**Fernandez et al., 2002**). Ellos pueden ser mezclas indefinidas de bacterias, generalmente denominados productos de exclusión competitiva (EC) (**Ducatelle et al., 2001**). Se refiere por “La exclusión competitiva” a la reducción de la colonización intestinal por las bacterias patógenas entéricas tales como *Salmonella* y *Campylobacter* por la microflora ya presente en el tracto gastrointestinal (**Vilà et al., 2010**), no necesariamente con una mejora en el rendimiento. Algunos de estos productos se pueden añadir directamente a los piensos, pero muy a menudo se administran a través del agua de bebida o por pulverización directa sobre las aves (**Ducatelle et al., 2001**). La mayoría de los productos usados como probióticos para piensos están compuestos de un número limitado de microorganismos: *Lactobacillus spp.* (principalmente *L. acidophilus*), *Streptococcus faecium*, *Bacillus spp.*, y levaduras, especialmente las especies de *Saccharomyces*. Las especies de *Lactobacillus* y *S. faecium* están normalmente presentes en el tracto gastrointestinal, mientras que las especies de *Bacillus* y las levaduras son esporádicamente presentes en la microflora intestinal (**Vilà et al., 2010**).

Otro enfoque reciente se basa en el uso de ciertos carbohidratos en la dieta de los pollos para reducir la colonización de *Salmonella* en el intestino. Como se indicó anteriormente, los receptores de los carbohidratos en las superficies de las células epiteliales intestinales aparentemente sirven como receptores para la unión de algunas bacterias patógenas. La interacción entre las lectinas de las bacterias gram-negativas y estos receptores puede ser bloqueada por ciertos carbohidratos en la alimentación animal. Se ha descrito que algunos tipos de hidratos de carbono, levaduras, y, especialmente, el residuo de manosa son efectivos en la prevención de la colonización de *Salmonella* (**Vilà et al, 2012**).

6.3-Prebióticos como alternativos a los antibióticos promotores de crecimiento:

a- Definición:

Los prebióticos se han definido por **Gibson y Roberfroid (1995)** como "ingredientes alimentarios no digeribles que afectan beneficiosamente al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y / o actividad de una o un número limitado de especies bacterianas ya residentes en el intestino, y así mejorando la salud del huésped". Sobre la base de esta definición, se ha definido los criterios según los cuales una sustancia puede ser un prebiótico. En primer lugar, los prebióticos son ingredientes alimenticios resistentes a la acidez gástrica, que no son digeridos por el huésped, o son poco digeridos y / o se metabolizan a medida que pasan a través de la parte superior del tracto intestinal, por lo que puede llegar a la flora del intestino grueso. En segundo lugar, tienen que ser capaces de servir como un sustrato para una o más especies bacterianas con un efecto potencialmente beneficioso sobre el huésped. Finalmente tienen que ser capaces de causar un cambio en la microflora que permite mejorar la salud del huésped (**Gibson *et al.*, 2004**).

La mayoría de estos prebióticos son hidratos de carbono. Estos hidratos de carbono se dividen en grupos basados según su longitud: mono-, di-, oligo-y polisacáridos. Otra posible clasificación se basa en su fuente de origen: sacáridos naturales o sintéticos (**Iji y Tivey, 1998**).

b- Clases de prebióticos:

Los prebióticos monosacáridos más importantes consisten en hexosas (glucosa, fructosa, galactosa, manosa) y pentosas (ribosa, xilosa, arabinosa). Algunos de ellos, como la glucosa y la fructosa son naturalmente disponibles. La galactosa es disponible principalmente bajo la forma de disacárido como el caso de lactosa. La manosa sin embargo es el monosacárido más comúnmente utilizado como aditivo para piensos (**Allen *et al.*, 1997**). Estos monosacáridos pueden formar la base para construir los oligo- o polisacáridos.

Los disacáridos más importantes que ocurren naturalmente son la sacarosa, lactosa y maltosa. Productos de isomerización de estos compuestos pueden ser utilizados como prebióticos, por ejemplo, lactulosa (**Iji y Tivey, 1998**) y lactosucrosa (**Terada *et al.*, 1994**) supuestamente tienen efectos prebióticos en los pollos. Los oligosacáridos se

definen generalmente como glucósidos que contienen un número limitado de unidades de hexosa o pentosa. A veces se usan en su forma natural, pero en su mayoría son obtenidos a través de la síntesis enzimática o hidrólisis. Los oligosacáridos sintéticos se pueden basar en diferentes monosacáridos de hexosa, por ejemplo glucosa, fructosa, galactosa y manosa o pueden ser el resultado de la fermentación de los polisacáridos (**Iji y Tivey, 1998**). Los fructo-oligosacáridos (FOS) son oligosacáridos ampliamente estudiados en los pollos con respecto a su efecto prebiótico y su actividad contra *Salmonella* (**Fukata et al., 1999**) y *Campylobacter* (**Schoeni y Wong, 1994**). Se han visto que los FOS tienen poco efecto sobre la colonización por *Salmonella* Typhimurium cuando se añade a 0,375% para la dieta de los pollos de engorde pero, cuando se administra a unos niveles de 0,75% menos aves fueron colonizadas en comparación con grupos de control sin añadir FOS (**Bailey et al., 1991**).

Los manano-oligosacáridos (MOS) son hidratos de carbono basados en manosa y se encuentran de forma natural en muchos productos tales como paredes celulares de levadura o las diferentes gomas. Las gallinas alimentadas con MOS son mejor protegidas de la colonización con *Salmonella* Enteritidis (**Fernández et al. 2000**).

c-Mecanismo de acción de los prebióticos:

Los prebióticos pueden tener un efecto directo, por unión directa con las bacterias patógenas o aumentando el valor de la presión osmótica en el lumen intestinal. También con efectos indirectos, mediante metabolitos que se generan por la flora intestinal y que los utiliza para su propio metabolismo. Estos metabolitos incluyen los ácidos grasos de cadena corta, lactato, poliaminas y bactericinas (**Ducatelle et al., 2001**).

Las fimbrias tipo 1 (F1) se describen en varias bacterias patógenas entéricas, incluyendo la *Salmonella*. Estas fimbrias tipo 1 se unen a los residuos de carbohidrato de las glicoproteínas presentes en la superficie de las células eucariotas. Son necesarias para la adhesión de las bacterias a la superficie de la mucosa, que es un requisito previo para la colonización de la mucosa intestinal por estas bacterias patógenas. Los carbohidratos indigeribles con residuos de manosa pueden unirse a las fimbrias (F1) y por lo tanto bloquear la adhesión de las bacterias patógenas a las células epiteliales. También se han visto que los MOS de las levaduras inducen la aglutinación en el 51% de las cepas de *E. coli* y del 53% de las cepas de *Salmonella*. Entre las cepas de *Salmonella*, el 80% de los serotipos Enteritidis y 67% de las cepas del serotipo Typhimurium poseían estas

aglutininas. Los prebióticos pueden constituir un sustrato para el crecimiento de la flora intestinal. Esta multiplicación de la flora normal puede inhibir la colonización de las bacterias patógenas. Este fenómeno de la inhibición se denomina "exclusión competitiva" (Ducatelle *et al.*, 2001). Se ha demostrado in vitro que los FOS promueven el crecimiento de *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus lactis* y *Pediococcus spp.* Además, *Lactobacillus plantarum* poseen receptores de manosa, un fenómeno poco común en bacterias gram-positivas y que es común en bacterias gram-negativas, lo que les permite competir por los mismos sitios de adhesión en el intestino con las bacterias patógenas gram-negativas (Bengmark, 1998).

6.4-Los galactomananos de algarroba:

Los galactomananos son polisacáridos que consisten en una cadena principal de manosa β -(1 \rightarrow 4) en donde están vinculados los residuos D-galacto-piranosilo a través de enlaces α -(1 \rightarrow 6) (Figura 3).

Los galactomananos de algarroba, también conocido como goma de algarroba, es un polisacárido que se obtiene de las semillas del árbol de algarrobo (*Ceratonia siliqua L*), que se cultiva por toda la región mediterránea y en ciertos lugares en América del Norte (Mulimani y Prashanth 2002).

La goma de algarroba se puede obtener con alto rendimiento y pureza. La composición típica de los galactomananos comerciales de algarroba, que se obtiene mediante molienda del endospermo después de la eliminación de la cáscara y el germen, es la siguiente: polisacárido 80-91% (en base de MS), proteína 5-6%, celulosa 1-4%, cenizas 1%. La goma de algarroba se utiliza como un agente espesante, estabilizante o como sustitución de la grasa en formulaciones de alimentos diversos, tales como productos lácteos (helado y otros postres congelados) (Lazaridou *et al.*, 2001).

Los galactomananos se difieren en su proporción de manosa/galactosa, en función del origen de la goma, la variedad y la edad de la planta (árbol), las condiciones de crecimiento y el método utilizado para la extracción del polisacárido. Los galactomananos de algarroba dan soluciones relativamente estables y altamente viscosas, que son muy poco afectadas por los cambios de pH. Entre los galactomananos importantes comercialmente disponibles (las gomas del guar y de algarroba), los galactomananos de algarrobo son los que tienen menor contenido de galactosa. La

interacción de galactomananos, que tienen menor sustitución galactosilo (tales como algarroba y guar) con agua, da lugar a unas viscosidades altas (**Lazaridou *et al.*, 2001; Mulimani y Prashanth 2002**).

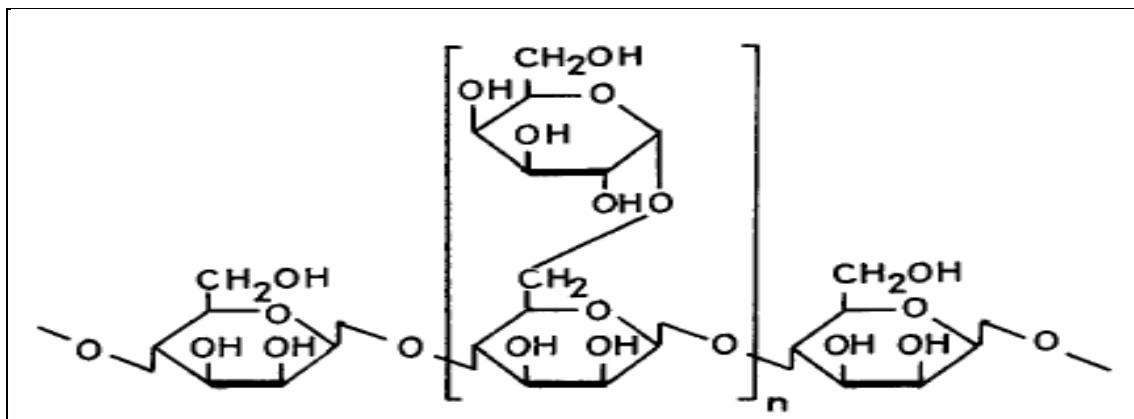


Figura 3: estructura general de los galactomananos (Mulimani y Prashanth 2002).

En el ámbito de la nutrición animal los galactomananos de algarroba se utilizan para aves y cerdos a fin de reducir la incidencia de *salmonella* en estos animales.

En un trabajo que se hizo acerca del uso de la goma de algarroba y su efecto sobre los rendimientos de producción, la digestibilidad de los nutrientes y la colonización de *Salmonella* Enteritidis en pollos (**Vilà *et al.*, 2012**), se observó una reducción más constante y marcada en el número de pollos positivos a *Salmonella* cuando la goma de algarrobo estaba presente en la dieta. La inclusión de goma de algarroba en la dieta de los pollos a altas concentraciones (100g/kg) en este experimento redujo la presencia de *Salmonella* en pollos desafiados con *salmonella*, pero también hubo problemas de rendimiento y digestibilidad de los nutrientes. Estas deficiencias fueron parcialmente contrarrestadas por la adición de la enzima β -mananasa a la dieta. La goma de algarrobo podría ser utilizada para reducir la incidencia de *Salmonella* en los pollos, mientras que sus efectos negativos sobre el rendimiento y la digestibilidad de nutrientes podrían ser contrarrestados por β -mananasa.

En un ensayo in vitro (**Mikcha *et al.*, 2006**) sobre cultivos de células HeLa, han demostrado que la adición de D-manosa (1%) a un cultivo de estas células redujo notablemente la adhesión de *S. enteritidis* (del 95% hasta 40%) lo que sugiere la participación de las adhesinas con afinidad hacia la manosa en la adherencia bacteriana.

En otro estudio in vitro realizado sobre células epiteliales intestinales de cerdos mediante un cultivo establecido a partir de íleon, han estudiado la capacidad de adhesión de *Salmonella entérica* ser.Typhimurium sobre estas células y el posible efecto de los β -galactomannanos de algarroba (β GM) en la inhibición de la adhesión de la *Salmonella* sobre dichas células. Han demostrado que la capacidad de adhesión de *Salmonella* sobre la superficie celular de estas células epiteliales intestinales disminuye progresivamente conforme aumenta las concentraciones del β GM y que las concentraciones de 1, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de β GM reducen el 50 % de la unión de *Salmonella* sobre estas células con una diferencia significativa respecto el tratamiento control sin β GM (**Badia, 2012**).

III-Objetivos del trabajo:

Dada la importancia de la *salmonella*, su repercusión sobre la salud pública y las preocupaciones de que las bacterias desarrollen la resistencia frente a los antibióticos que hoy en día está prohibido usarlos como promotores de crecimiento en los países de la UE, se han buscado alternativas a estos antibióticos y uno de estas alternativas son los prebióticos.

Sabiendo que la mayoría de las cepas patógenas intestinales de *Salmonella* expresan fimbrias que tienen afinidad hacia los residuos de la manosa presentes en las glicoproteínas de la superficie de las células epiteliales intestinales y teniendo en cuenta que los oligosacaridos de manosa tienen la capacidad de unirse a las fimbrias de *S. Enteritidis*, facilitando su eliminación (Allen *et al.*, 1997; Sharon, 2006; Baurhoo *et al.* 2009), nos hemos enfocado en la utilización de oligosacaridos ricos en manosa que son los galactomananos para prevenir la infección de los pollos por la *S. Enteritidis*.

Los β -galactomananos, son prebióticos ricos en polisacáridos de manosa que pueden imitar los receptores de unión de *Salmonella* sobre las células epiteliales intestinales, de hecho como objetivo general el presente trabajo se enfoca a determinar el potencial del prebiótico β -galactomanana en la prevención de la infección frente a los patógenos intestinales especialmente el serotipo *S. Enteritidis* en los pollos de engorde, usando dos productos (SALMOSAN y Duraió) y también otros objetivos como:

- 1- Evaluar la expresión génica a nivel intestinal de los genes implicados en la respuesta inmune de los pollos y el posible efecto de estos prebióticos sobre esta expresión.
- 2- El efecto de estos prebióticos sobre el perfil de los ácidos grasos volátiles.
- 3- Las repercusiones del uso de estos prebióticos sobre la viscosidad intestinal y por lo tanto los rendimientos productivos de los pollos.
- 4- El posible efecto de la enzima β -mannanasa para mitigar la viscosidad inducida por la Duraió y/o mejorar el efecto de la Duraió en la inhibición de la colonización de la *Salmonella* por liberar mas unidades de manosa de los galactomananos del Duraió.

IV- MATERIALES:

1-Animales:

Quinientos cuarenta (540) pollitos broiler machos de un día de vida de la estirpe comercial Ross 308.

2-La bacteria *Salmonella* Enteritidis:

La bacteria utilizada fue proporcionada por el Dr. Badiola, del Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA).

El microorganismo *Salmonella enterica* var. Enteritidis se ha cultivado durante 18h a 37°C en caldo de cultivo tryptic soy agar (Difco, Barcelona, Spain), suplementado con 200 µg/mL de nalidixic acid (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). El inóculo se ha obtenido preparando una suspensión en Phosphate Buffered Saline pH 7.2 (PBS) para una densidad óptica de 0.824 a 450 nm y una dilución posterior en PBS para ajustar la concentración del inóculo.

3-Los prebióticos:

3.1-Salmosan:

El *Salmosan*® es una mezcla de varias gomas y otros compuestos (goma de guar, goma de xantano, pectina, goma de tragacanto, goma Arábica, algina, carragenina, goma de algarrobo, semilla de algarroba, goma de casia y harina de palmiste). Tiene 77,7% de polisacáridos no digestibles, y de estos polisacáridos el 98% son β -galactomananas (β GM). El β GM está basado en una cadena principal de manosa con enlaces β -(1→4) y de residuos de moléculas de galactosa unidas en una proporción de 1:4 galactosa: manosa. El producto comercial *Salmosan*® contiene menos del 1% de otros polisacáridos como la arabinosa, xilosa, fructosa, glucosa, galactosamina y fucosa. El producto fue desarrollado por el *Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries* (IRTA) y regulado en base a la patente **WO 2009/144070 A2**, producido y comercializado por la empresa *Industrial Tecnica Pecuaria* (ITPSA, Barcelona, España), y se ha procesado industrialmente para ser soluble en el intestino por llevar la enzima β -mananasa que implica una buena difusión dentro del intestino permitiendo una eficacia mayor del producto hasta con inclusiones bajas (en orden del 0.5%) en el

pienso para llegar al efecto deseado en la inhibición de la colonización de *Salmonella* en el tracto digestivo (**Badia, 2012**).

3.2-La goma de Duraíó:

Es una variedad de Algarrobo. Se llama también “De Durayo”, “Duraiona” “Oraiona” el árbol se cultiva en toda la cordillera del norte (Sta. Maria, Consell y alaro) de Mallorca. La “Galactomanana” o goma de garrofin, que tiene el nombre comercial de “Locust Bean Gum” (LBG) es un polisacárido formado por la combinación de unidades de galactosa y manosa en una proporción 1:4. Se obtiene mediante la molienda del endospermo (42-46% peso semilla) de las semillas de la algarroba tras su separación de la cutícula y del germen con un rendimiento industrial de extracción alrededor del 36-38% del peso de las semillas. El 88% del endospermo es bajo forma de Galactomanana, mientras que el resto está formado de proteína, celulosa y cenizas. Se disuelve bien en agua y es insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos con propiedades como agente espesante, estabilizante, emulsionante, y gelificante y se caracteriza por su alta viscosidad en soluciones acuosas; es capaz de absorber hasta 40 veces de su peso seco (**Batlle y Tous, 1989**).

La Duraíó se ha introducido en el pienso con una preparación que lleva 90% de goma de Duraíó y 10% de un excipiente (Sipernet®) para facilitar la dispersión del Duraíó dentro del pienso.

4- β -mannanasa:

La β -mananasa es una enzima con un peso molecular comprendido entre 50 y 53 kDa, estable a pH alcalino y con una actividad degradativa óptima a pH 7-8. Esta enzima da lugar a mono y oligosacáridos como productos de degradación. Se ha visto que el uso de la β -mananasa a concentraciones bajas induce la ruptura de la cadena principal de glucomanano de konjac proporcionando Di-, Tri-, y oligosacaridos de unidades de manosa y/o galactosa (**Álvarez Manceñido, 2007**).

La enzima β -mananasa que hemos usado fue aportada por parte de la empresa *Industrial Tecnica Pecuaria* (ITPSA, Barcelona, España). En este experimento se ha usado la β -mananasa con nivel de incorporación de 0.4% en una premezcla que contiene la Duraíó (90%) y sipernet (10%) (**Tabla 5**).

V- METODOS:

1-Condicionales experimentales:

1.1-Alojamiento:

El ensayo se ha realizado en la estación experimental del IRTA “Mas de Bover”, Constantí, España.

1.2-Duración del ensayo:

El ensayo ha tenido una duración de 31 días en granja.

1.3-Alojamiento y manejo:

La sala ha estado iluminada por luz artificial programable, calefacción automática por pantallas de gas infrarónico y ventilación forzada por depresión. El programa de temperatura se ha ajustado de acuerdo al programa habitual utilizada en la granja: 0-2 días 32-34°C; 3-7 días 27-30°C; disminuyendo 3°C por semana hasta los 21°C. El programa de luz ha sido de 24 horas durante los dos primeros días, 18 horas hasta los 7 días, y 14 horas después. La sala había sido limpiada, desinfectada y realizado un vacío sanitario antes del inicio del experimento. Se ha utilizado la yacija habitual consistente en virutas de madera.

1.4-Programa de alimentación:

Todos los animales del ensayo han tenido el mismo programa de alimentación en una fase de 0 a 31 días. El pienso se ha suministrado en forma de harina. Tanto el agua como el pienso se han suministrado *ad libitum*.

Los cinco tratamientos tienen el mismo nivel energético y proteico (isonitrogenadas e isoenergéticas). Las dietas se han formulado a base de trigo y harina de soja como componentes principales según las necesidades de los pollos recomendados por “National Research Council, 1994” mediante el programa Brill. Los productos prebióticos (Salmosan, Duraió gum) y enzimas (β -mananasa) como nuevos ingredientes con una tasa de inclusión del 0.1%, se añadieron “on top” en los tratamientos correspondientes (**Tabla 5**). Los piensos no han incluido coccidiostatos ni antibióticos. La composición y la composición nutricional calculada de la dieta base se detallan en la **Tabla 3**.

Tabla 3: ingredientes y composición nutricional calculada de la dieta base.

Ingredientes	Cantidad (%)
Trigo	31.5
Harina de soja 48%	22.8
Maiz	15.0
Cebada	15.0
Soja entera extrusionada	10.0
Manteca	1.84
Fosfato dicàlcico	1.56
Carbonato càlcico	0.90
Cloruro sódico	0.46
Corrector vitamínico-mineral ¹	0.30
L-Lisina	0.25
DL-methionina	0.23
L-treonina	0.08
Cloruro de colina	0.04
Etoxiquin (antioxidante)	0.02
Nutrientes calculados	
Materia seca *	88,9
EMAn kcal/kg	2895
Proteína bruta *	21,9
Extracto etero *	4,7
Cenizas *	5,5
Fibra bruta	3,2
Sodium	0.2
Colina	0.2
Calcium	0.9
Fósforo total	0.7
Cloruro * (%NaCl)	0,7
Fósforo no fitico	0.4
Lisina	1.3
Treonina	0.9
Methionina	0.5
Met-Cys	0.9
Triptofano	0.3
Isoleucina	0.9
Valina	1.0
Arginina	1.4

¹ Corrector vitamínico-mineral proporcionado por kg de pienso: vitamina A (E-672) 13500 UI; vitamina D₃ (E-671) 4800 UI; vitamina E 45 mg; vitamina B₁ 3 mg; vitamina B₂ 9 mg; vitamina B₆ 4.5 mg; vitamina B₁₂ 16.5 µg; vitamina K₃ 3 mg; Ácido Pantoténico 16.5 mg; ácido nicotínico 51 mg; ácido fólico 1.8 mg; biotina 30 µg; Fe 54 mg; I 1.2 mg; Co 0.6 mg; Cu 12 mg; Mn 90 mg; Zn 66 mg; Se 0.18 mg; Mo 1.2 mg.

* Valores analizados en laboratorio.

2-Tratamientos y diseño experimental:

El ensayo se ha realizado en una sala con parques en suelo del IRTA. Los pollos se han distribuido totalmente al azar en 18 parques de $1.5 \times 1.5 = 2.25 \text{ m}^2$, alojando 30 animales en cada parque. El diseño experimental del ensayo ha sido un diseño aleatorio. Había un total de 5 tratamientos, con 4 parques de 30 animales cada uno, excepto el tratamiento no inoculado no tratado (UU_t) que sólo tenía 2 parques según como se muestra en la **tabla 4** y la **figura 4**.

Tabla 4: Distribución de los tratamientos según desafío con *Salmonella*, contenido en prebióticos (Salmosan o Duraió) y/o enzima (β -mannanasa), número de parques dedicado a cada tratamiento.

Código del tratamiento	Desafío con <i>Salmonella</i>	Tratamiento	Numero de parques
T1	U	U_t	2
T2	I	U_t	4
T3	I	T_S : Salmosan 1000 mg/kg de pienso	4
T4	I	T_D : Duraió gum (90% Duraió gum + 10% sipernet) 1000 mg/kg de pienso	4
T5	I	T_{Dβ} : Duraió gum (90% Duraió gum + 10% sipernet) + β -mannanase (0.4%) 1000 mg/kg de pienso	4

U: No inoculados. **U_t**: No tratados. **I**: Inoculados.

T_D: tratamiento con Duraió. **T_S**: tratamiento con Salmosan. **T_{D β}** : tratamiento con Duraió + β -mannanase.

Figura 4: distribución de los tratamientos.

T1	T3	T5	T2	T4	T5	T3	T4	T2
T1	T2	T4	T5	T3	T2	T5	T3	T4

3-Desafío con Salmonella

Los animales correspondientes a los tratamientos con desafío han sido inoculados oralmente a 7 días de edad con 1 mL de inóculo conteniendo 10^8 UFC (Units Forming Colony) de *S. Enteritidis* (phage-type 4, nalidixic acid resistant strain, field isolate, CReSAS3146). Se han inoculado solamente la mitad de los animales de cada parque, que han sido marcados para identificarlos como “seeders”. Para facilitar la transmisión horizontal de *Salmonella* el pienso se ha suministrado en los comederos en platos en el suelo mientras que los pollos que no fueron inoculados con *Salmonella* (T1), el pienso se ha suministrado en comederos colgados.

4-Determinación de la presencia de Salmonella a nivel de ciegos:

A 11d, 14d y 21 día se han sacrificado 2 o 3 animales “seeders” por réplica (10 animales por tratamiento) para determinar la presencia o ausencia de *Salmonella* en ciegos.

Los pollos fueron sacrificados por dislocación cervical. Uno de los dos ciegos de cada pollo se ha obtenido de forma aséptica, se han colocado en recipientes estériles. La recuperación de la *Salmonella* Enteritidis se ha realizado de acuerdo con el método estándar ISO modificado en el CReSA. Brevemente, la muestra se ha colocado en un contenedor de plástico estéril con Buffered Peptone Water (1.07228, Merck, Darmstadt, Germany) en una proporción 1:10 y ha sido homogeneizada; después de una incubación durante 18 h a 37°C, tres alícuotas del caldo de preenriquecimiento, con un volumen total de 0.1 mL, se han inoculado en medio semisólido selectivo para la *Salmonella*; Rappaport-Vassiliadis (RVS) las placas RVS inoculadas se han incubado a 42°C durante 48 h. El sistema GNI Vitek (bioMérieux, Madrid, Spain) y PCR con primers específicos se han utilizado para confirmar la presencia de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis.

5-Estudio inmunológico:

Hemos estudiado el efecto in vivo de los β -galactomananos y la inoculación con *Salmonella* sobre el sistema inmune de la mucosa intestinal de los pollos (de los animales sacrificados a día 11 de edad que corresponde a 4 días post inoculación donde la expresión génica es máxima).

Determinación de la expresión de ARNm de los genes relacionados con la respuesta inmune innata: Los genes evaluados fueron GIFN, IL-10, TNF- α , IL-2, TLR 2, MHC-I,

MHC-II y como control GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) (realizado en el CReSA). Las muestras se han procesado de la forma siguiente:

- a. Recolección de las muestras: Los animales han sido sacrificados con dislocación cervical. Se han tomado muestras de raspado de mucosa de íleon (aproximadamente 0.5 g en la zona del divertículo de Meckel) de 2 o 3 animales “seeders” por réplica (entre 8 y 12 animales por tratamiento), que han sido inmersas en 1 mL de solución conservante RNAlater (Ambion) (eppendorf+RNAlater pesados).
- b. Extracción de ARN: Se ha realizado una homogenización mecánica de las muestras mediante Tissue Ruptor System (Qiagen, SG Servicios Hospitalarios). La purificación de ARN Se ha realizado mediante un protocolo de extracción con fenol: cloroformo (Trizol®, Invitrogen).
- c. Retrotranscripción: La retrotranscripción es el método por lo cual se sintetiza el ADN complementario (ADNc) a partir del ARN previamente aislado. Para la síntesis del ADNc se ha utilizado el kit *Transcriptor high fidelity cDNA synthesis kit* (Roche) donde se incubaba 1µg de ARN, 2 µl de dNTP , 1µl de oligodT (2.5 µM), 1.1µl de la enzima *Transcriptor high fidelity reverse transcriptase* (10U/µl), 4 µl de tampón per *Transcriptor high fidelity reverse transcriptase 5X*, 1 µl de DTT (5mM) y se completa el volumen con agua ultra-pura hasta un volumen final de 20 µl. la reacción se realiza a 45°C durante 30 minutos y se inactiva a 85°C durante 10 minutos.

La reacción de retrotranscripción se hizo usando un termociclador MiniCycler™ (MJ Research). Las muestras de ADNc se almacenan a -80°C hasta el análisis.

- d. Cuantificación de ARNm: Para la reacción de amplificación y cuantificación se ha usado un termociclador LightCycler® 2.0 Real-Time PCR System (Roche) así como el kit Light Cycler faststart DNA master Syber green (ref. 2239264, Roche). Los “primers” para la cuantificación del mRNA de cada uno de los genes analizados, han sido diseñados mediante Oligo6 software, a partir de las secuencias disponibles en las bases de datos.

6-Estudio del perfil de los ácidos grasos volátiles.

A 22 días de edad, de 3 animales “seeders” por parque (12 animales por tratamiento), se ha recogido 0.5 g de contenido cecal de cada uno de los tres pollos, se han mezclado y se han diluido en la misma cantidad (1.5 ml) de agua destilada con 0.15 ml de solución conservante del 5% ácido ortofosfórico con 1% cloruro de mercurio, agitando vigorosamente. Las muestras se han conservado a -18 °C.

La preparación de la muestra, a la que posteriormente se le realizaría su análisis cromatográfico, consistió en poner en un tubo de cristal 1 ml de esta preparación previamente descongelada y homogenizada en vortex, a las que se añadieron 100 µl de solución del patrón interno (ver su preparación en anexo 1), sometiéndolas a agitación hasta conseguir una suspensión lo más homogénea posible. Posteriormente, se adicionaron 2 ml del éter etílico y 0.5 ml de HCl 37% agitando durante 1 minuto. Los tubos se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos.

Para comenzar la etapa analítica se trasvasó el sobrenadante (65 µL) a un vial donde previamente se han puesto 10 µl de la solución derivatizante “MTBSTFA” (N-metil-N(tert-butildimetilsilil)-trifluoracetamida), para su inyección en un cromatógrafo de gases “GC 6890” después de homogenizar y dejar reaccionar a 80°C durante 30 minutos.

La cuantificación se hizo por patrón externo utilizando los estándares descritos en el **anexo 1** con sus tiempos de retención.

Las condiciones del cromatógrafo están mostradas en el **anexo 2**.

7-Determinación de la viscosidad intestinal:

A 31 días, 4 animales por parque, 16 animales por tratamiento y de cada animal se ha recogido el contenido del íleo, y se han mezclado los cuatro contenidos de cada parque en el mismo tubo, inmediatamente después de la recogida de las muestras los tubos se pusieron para el análisis tras su centrifugación con el método siguiente:

- Coger el contenido intestinal desde el divertículo de Merckel hasta 15 cm antes de la conjunción de los ciegos, estando el animal con intestino lleno.
- Poner el contenido intestinal dentro de un tubo de centrifugación de plástico.
- Centrifugar durante 10 min a 7000 rpm a 10°C.

- Con el sobrenadante de cada tubo de centrifugación, se hacen dos lecturas tras llenar 2 tubos Eppendorf, que se mantienen en hielo hasta que se haga la lectura de la viscosidad.
- Hacer la lectura de cada Eppendorf en el viscosímetro Brookfield. La viscosidad se mide manteniendo las muestras en un baño termostático a 30°C.
- Los valores están expresadas en cps (centipoise).

8-Controles productivos:

Tanto los animales como el pienso consumido se han pesado por replica el día 7 y el día 29 del experimento para calcular los rendimientos productivos tales como la ganancia media diaria (GMD), consumo medio diario (CMD) y el índice de conversión (IC). Los animales inoculados y no inoculados de un mismo parque se pesaron por separado para determinar el efecto de la inoculación dentro del mismo tratamiento sobre estos parámetros productivos.

9-Análisis estadístico

Los datos se analizaron según el diseño del experimento. Un parque se consideró como unidad experimental para las variables de rendimientos productivos, la viscosidad intestinal y los ácidos grasos volátiles, mientras que un pollo se consideró como unidad experimental para la presencia de *Salmonella* y expresión génica. Tanto el factor de la inoculación como el factor del tratamiento son los factores fijos del experimento. Los datos de los rendimientos productivos, viscosidad intestinal, ácidos grasos volátiles y la expresión génica se sometieron al análisis de la varianza apropiado para un diseño completamente al azar, mientras que los datos de la presencia de la *Salmonella* en ciegos se analizaron con la prueba no paramétrica Chi-Cuadrado (χ^2) utilizando el programa SAS, versión 9.2 (SAS institute, Carey, NC, USA). Se utilizó un nivel de significación de $\alpha = 10\%$ y se ha usado el test LSD de Fisher para las pruebas de significancia. Los valores promedios con las mismas superíndices indican que no hay diferencia significativa estadísticamente ($p\text{-valor} > 0.1$). En cambio los valores con superíndices diferentes presentan una diferencia significativa estadísticamente ($p\text{-valor} \leq 0.1$). Los datos se han estudiado con anterioridad para ver la existencia de posibles valores atípicos mediante el gráfico de cajas (Box-Plot).

El modelo estadístico sería: $y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$

Donde y_{ij} es la variable respuesta (ganancia de peso, consumo del alimento, viscosidad intestinal...).

μ es la media general o media de la población dentro del mismo tratamiento.

α_i es el efecto del tratamiento “i” que puede ser o el efecto de la inoculación o el efecto del prebiótico y que es común a todos los individuos que recibieron ese tratamiento (efecto fijo).

ε_{ij} es el residuo o error aleatorio.

VI- RESULTADOS:

1-Los rendimientos productivos:

Dado que la inoculación fue en el día 7 del experimento, los parámetros de los rendimientos de producción (peso de animales, ganancia media diaria, consumo medio diario y el índice de conversión) se han calculado antes y después de la inoculación de la *Salmonella* para estudiar por separado el efecto del factor de la inoculación con *Salmonella* y el efecto del factor de tratamiento con prebióticos sobre estos rendimientos productivos de los pollos, por lo tanto en la **tabla 5** se presentan los parámetros de los rendimientos de producción entre el día 0 y el día 7 del experimento, mientras en la **tabla 6** se presentan estos parámetros entre el día 7 y el día 29 del experimento. La **tabla 7** muestra el conjunto de los dos periodos, es decir durante todo el periodo del experimento.

Tabla 5: los promedios y la desviación estándar de los variables de los rendimientos productivos (peso vivo a los 7 días de edad, ganancia media diaria, consumo medio diario, índice de conversión) durante el periodo entre 0 y 7 días de edad.

Tratamientos	n	PV ¹		GMD		CMD		IC	
		Mean	D.Est ³	Mean	D.Est	Mean	D.Est	Mean	D.Est
U-U _t	2	143.8	11.33	15.0	1.62	19.8	2.16	1.338	0.2885
I ² -U _t	4	141.8	6.17	14.7	0.88	19.3	1.28	1.315	0.0539
Salmosan	4	138.8	2.03	14.3	0.29	18.5	0.36	1.298	0.0327
Duraió	4	137.6	4.37	14.1	0.63	19.0	1.46	1.347	0.0558
Duraió+Enz	4	140.3	3.25	14.5	0.46	19.6	1.70	1.351	0.0904
Total	18	140.1	4.94	14.5	0.71	19.2	1.29	1.329	0.0897
P-valor		0.63		0.63		0.60		0.93	

¹ PV: Peso vivo de los pollos a 7 días de edad (g); GMD: Ganancia Media Diaria (g/d); CMD: Consumo Medio Diario (g/d); IC: Índice de Conversión (kg/kg).

² I: Pollos que van a ser inoculados. U: Pollos no van a ser inoculados. U_t: Pollos no tratados; Enz: β-mananasa.

³ D.Est: Desviación estándar; Mean: Promedio del variable; n: numero de observaciones.

El hecho de no inocular los pollos con *Salmonella* durante la primera semana nos permite evaluar el efecto de los prebióticos y/o enzimas (Duraió, Duraió+ β-mananasa y Salmosan) sobre los rendimientos productivos de los pollos durante este periodo, por lo tanto los tratamientos “I-U_t” y “U-U_t” durante la primera semana (antes la inoculación) se consideran como el mismo tratamiento ya que los pollos del tratamiento “I-U_t” aun

no hubieran estado inoculados durante este periodo y habían consumido el mismo pienso (pienso base) como el tratamiento “U-U_t”. Los tratamientos con Salmosan (Salmosan), Duraió (Duraió) y Duraió mas la enzima β -mananasa (Duraió+Enz) no tuvieron ningún efecto sobre los rendimientos productivos durante la primera semana (antes inoculación), por lo tanto los valores de PV, GMD, CMD y IC no fueron distintos (p-valor > 0.6) tanto para los pollos tratados como para los no tratados con prebióticos. Cabe destacar que las observaciones obtenidas con de todos los parámetros productivos de los pollos que tuvieron la Salmosan en la dieta han sido más agrupadas al tener desviaciones estándar menores respecto los otro tratamientos (**tabla 5**).

En la **tabla 6** se detallan los mismos variables de los rendimientos productivos entre el día 7 y el día 29 del experimento en donde los pollos fueron inoculados con *Salmonella* en el día 7 de edad, por lo tanto durante este periodo se estudia tanto el efecto de la inoculación con *Salmonella* como el efecto de los diferentes tratamientos sobre los rendimientos productivos de los pollos.

Tabla 6: Los promedios y la desviación estándar de los parámetros productivos (peso vivo a los 29 días, ganancia media diaria, consumo medio diario, índice de conversión) durante la periodo entre 7 y 29 días de edad.

Tratamientos	n	PV ¹		GMD		CMD		IC	
		Mean	D.Est ³	Mean	D.Est	Mean	D.Est	Mean	D.Est
U-U _t	2	1569.5	162.84	64.8	6.89	104.8 ^A	6.68	1.621	0.0692
I-U _t	4	1526.9	34.40	63.0	1.30	98.6 ^B	2.15	1.566	0.0355
I-Salmosan	4	1443.7	96.87	59.3	4.33	94.3 ^B	4.69	1.592	0.0505
I2+Duraió	4	1505.2	47.28	62.2	1.99	95.9 ^B	2.61	1.543	0.0190
I+Duraió+Enz	4	1492.8	74.21	61.5	3.50	97.1 ^B	4.14	1.581	0.0570
Total	18	1500.8	79.33	61.8	3.49	97.4	4.60	1.576	0.0467
P-valor		0.43		0.44		0.08		0.36	

¹ **PV:** Peso vivo de los pollos a 29 días de edad (g); **GMD:** Ganancia Media Diaria (g/d); **CMD:** Consumo Medio Diario (g/d); **IC:** Índice de Conversión (kg/kg).

² **I:** Pollos inoculados; **U:** Pollos no inoculados; **U_t:** Pollos no tratados; **Enz:** β -mananasa.

³ **D.Est:** Desviación estándar; **Mean:** Promedio del variable; **n:** numero de observaciones.

^{A, B} Superíndices con letras diferentes indican una diferencia significativa entre los promedios (p-valor < 0.1).

Independientemente del tipo de tratamiento y la inoculación y no inoculación de los pollos con *Salmonella*, las variables del peso vivo (PV) a 29 días de edad, la ganancia

media diaria (GMD) y el índice de conversión (IC) no tuvieron diferencias significativas (p -valor > 0.1), entonces ni el hecho de inocular o no a los pollos con *Salmonella* ni el tipo del tratamiento (Salmosan, Duraió y Duraió mas la enzima β -mananasa) perjudicaron estos rendimientos productivos de los pollos. En cambio el consumo medio diario (CMD) de los pollos fue mayor (p -valor = 0.08) en los pollos no inoculados con *Salmonella* (104.8 g/d vs 98.6, 94.3 y 97.1 y 95.9 g/d), y que se puede explicarlo por el posible efecto de la forma de distribución del pienso, ya que los pollos no inoculados “U-U_t” habían recibido el pienso en tolvas que ofrecen mejor disponibilidad y acceso del alimento a los animales que los platos en el suelo que se utilizaron para los pollos inoculados. También resultó que los pollos que tuvieron Duraió o Salmosan en el pienso han tenido una tendencia a consumir menos aunque la diferencia no fue significativa respecto al grupo inoculado no tratado “I-U_t” (98.6 vs 94.3 y 95.9 g/d) (**tabla 6**).

En la **tabla 7** se resumen los datos de los rendimientos productivos para todo el periodo de la prueba.

Tabla 7: los promedios y la desviación estándar de las variables de los rendimientos de producción (peso vivo a los 29 días, ganancia media diaria, consumo medio diario, índice de conversión, EPEF y las mortalidades) para todo el periodo de la prueba.

Tratamientos	n	GMD ¹		CMD		IC		EPEF		Mortalidad (%)	
		Mean	D.Est	Mean	D.Est	Mean	D.Est	Mean	D.Est	Mean	D.Est ³
U-U _t	2	52.8	5.61	83.7 ^A	4.04	1.591	0.0928	333	54.7	0.0	0.00
I-U _t	4	51.3	1.19	79.3 ^B	1.54	1.545	0.0317	329	12.1	0.8	1.67
I-Salmosan	4	48.4	3.34	75.8 ^B	3.58	1.567	0.0480	310	30.1	0.0	0.00
I ² -Duraió	4	50.6	1.63	77.2 ^B	2.16	1.527	0.0178	320	6.3	3.3	2.72
I-Duraió-Enz	4	50.1	2.56	78.2 ^B	2.80	1.562	0.0515	316	19.1	1.6	1.89
Total	18	50.4	2.73	78.3	3.36	1.555	0.0450	320	22.4	1.3	2.01
P-valor		0.43		0.06		0.53		0.72		0.13	

¹ **GMD:** Ganancia Media Diaria (g/d); **CMD:** Consumo Medio Diario (g/d); **IC:** Índice de Conversión (kg/kg); **EPEF:** Factor Europeo de la Eficiencia Productiva= $GMD * ((100 - \% \text{bajas}) / (10 * IC))$.

² **I:** Pollos inoculados; **U:** Pollos no inoculados; **U_t:** Pollos no tratados; **Enz:** β -mananasa.

³ **D.Est:** Desviación estándar; **Mean:** Promedio del variable; **n:** numero de observaciones.

^{A, B} Superíndices con letras diferentes indican una diferencia significativa entre los promedios (p -valor ≤ 0.1).

Al ver los resultados para todo el periodo de la prueba, igual que antes las variables de los rendimientos productivos no tuvieron diferencias significativas excepto el consumo medio diario, en donde los pollos que tuvieron el mayor consumo (83.7g/d) son aquellos que no hayan sido inoculado (tratamiento “U-U_t”), mientras que los pollos inoculados tuvieron bajo consumo respecto a los no inoculados independientemente del tipo del tratamiento (83.7g/d vs 79.3, 75.8, 78.2 y 77.2g/d) con una diferencia significativa (p-valor = 0.06) (**tabla 7**).

Dado que al principio del experimento donde se ha inoculado la mitad de los pollos en cada parque, los animales se han pesado por separado, los inoculados de los no inoculados lo que nos permite estudiar el efecto de la inoculación entre periodo de 7 y 29 días de edad independientemente del tipo del tratamiento con los prebióticos (16 observaciones tanto para los inoculados como para los no inoculados), por lo tanto los datos de la **tabla 8** presentan el peso vivo de los animales a 7 y a 29 días de edad y la ganancia media diaria de los animales entre el mismo periodo, pesando los pollos por separado inoculados y no inoculados (dos observaciones por parque, 8 por tratamiento). También en la **tabla 9** se mencionan los detalles de los mismos parámetros (PV07, PV29, GMD 07-29) estudiando el efecto de la inoculación (inoculados o no inoculados) dentro del mismo tratamiento sobre estos variables de rendimientos productivos.

Tabla 8: Los promedios y la desviación estándar de las variables de los rendimientos productivos (PV a 7 días de edad, PV a 29 días de edad, GMD entre 7 a 29 días de edad) pesando los animales por separado, inoculados y los no inoculados.

Tratamiento	n	PV ¹ 07		PV 29		GMD 07-29	
		Mean ²	D.Est	Mean	D.Est	Mean	D.Est
Control	8	142	7,2	1517	63,6	62,5	2,63
Salmosan	8	139	4,0	1433	98,1	58,8	4,42
Duraió	8	138	6,4	1520	72,8	62,8	3,11
Duraió+Enz	8	140	3,7	1496	71,9	61,6	3,38
p-valor		0,35		0,11		0,11	
<u>Inoculación</u>							
Inoculados	16	140	4,7	1489	89,8	61,3	4,04
No inoculados	16	139	6,3	1494	76,3	61,6	3,35
p-valor		0,78		0,87		0,85	

¹ **PV 07:** Peso vivo a los 7 días de edad (g); **PV 29:** Peso vivo a 29 días de edad; **GMD 07-29:** la Ganancia Media Diaria durante el periodo de 07 a 29 días de edad (g/d).

² **Mean:** Promedio del variable; **D.Est:** Desviación estándar; **n:** numero de observaciones.

Tabla 9: los promedios y la desviación estándar de los variables de los rendimientos productivos (peso vivo a los 7 días de edad, peso vivo a los 29 días de edad, la ganancia media diaria durante el periodo de 07 a 29 días de edad) pesando los animales por separado, los animales inoculados y los no inoculados.

Tratamiento	Inoculacion	n	PV07 ¹		PV29		GMD 07-29	
			Mean ²	D.Est	Mean	D.Est	Mean	D.Est
Control	I ³	4	139 ^{ab}	8,2	1491	71,5	61,4	2,98
	U	4	144 ^a	5,8	1543	50,2	63,6	2,06
Salmosan	I	4	139 ^{ab}	3,0	1398	102,1	57,2	4,74
	U	4	138 ^{ab}	5,3	1467	94,0	60,4	4,05
Duraió	I	4	141 ^a	4,6	1562	71,5	64,6	3,19
	U	4	134 ^b	6,5	1478	50,2	61,1	2,04
Duraió+Enz	I	4	140 ^a	3,2	1506	34,0	62,1	1,60
	U	4	141 ^a	4,7	1487	103,3	61,2	4,86
p-valor			0,0999		0,19		0,22	

¹ **PV 07:** Peso vivo a los 7 días de edad (g); **PV 29:** Peso vivo a 29 días de edad (g); **GMD 07-29:** La Ganancia Media Diaria durante el periodo de 07 a 29 días de edad (g/d).

² **Mean:** Promedio del variable; **D.Est:** desviación estándar.

³ **I:** Animales inoculados con *Salmonella* (1 ml de 10⁸ UFC de *S. Enteritidis*); **U:** Pollos no inoculados.

^{a,b} Superíndices con letras diferentes indican una diferencia significativa entre los promedios (p-valor ≤ 0.1).

El peso vivo de los pollos a 7 días de edad se ha calculado al mismo día de la inoculación de los pollos con *Salmonella* por lo tanto el hecho de inocular los pollos con *Salmonella* no tenía influencia sobre la diferencia de los datos a 7 días de edad (**tabla 8**). No ha habido diferencia significativa (p-valor = 0,35) entre los tratamientos en cuanto al peso vivo de los pollos a 7 días de edad pesando los pollos de cada tratamiento por separado, los pollos inoculados de los no inoculados en cada parque (**tabla 8**). También no ha habido diferencia (p-valor = 0.78) del peso vivo de los pollos a 7 días de edad de los animales inoculados y los no inoculados independientemente del tipo del tratamiento (**tabla 8**). Cuando se presentan los datos del peso vivo a 7 días de edad separando los animales de cada tratamientos por animales que serán inoculados de los que no van a ser inoculados (**tabla 9**), se nota que los pollos que no van a ser inoculados del tratamiento “Duraió” fueron aquellos pollos que por azar tenían el peso más bajo (134 g) con diferencia significativa respecto a los pollos que sí serán inoculados del mismo tratamiento (p-valor < 0.10), también hubo diferencia con los

demás pollos excepto los pollos del tratamiento “ Salmosan” y los pollos que serán inoculados del tratamiento control que no tuvo prebióticos en el pienso.

Pesando los pollos de cada tratamiento por separado, los que habían sido inoculados de los que no inoculados, los valores del peso vivo de los pollos a 29 días de edad no fueron diferentes (p-valor = 0.11) entre los diferentes tratamientos (**tabla 8**). También el hecho de inocular los pollos con la *Salmonella* no perjudicó el peso de los pollos a 29 días de edad (p-valor = 0.87) independientemente del tipo del tratamiento (**tabla 8**). Resultó que los pollos no inoculados del tratamiento con “Duraió” han recuperado su crecimiento normal después de haber sido aquellos pollos que tuvieron el peso más bajo a 07 días de edad ya que a 29 días de edad, no hubo diferencias (p-valor = 0.19) en el peso de los pollos inoculados y no inoculados de todos los tratamientos (**tabla 9**).

Los valores de la ganancia media diaria (GMD) en el periodo entre 07 y 29 días de edad no han sido diferentes entre los tratamientos pesando los pollos por separado, los inoculados de los no inoculados (p-valor = 0.11), ni entre los pollos inoculados y los no inoculados independientemente del tratamiento (p-valor = 0.85), ni tampoco dentro del mismo tratamiento, separando los animales de cada tratamientos por animales inoculados y no inoculados (p-valor = 0.22) (**tabla 9**).

2-La viscosidad ileal

En la **tabla 10** se presentan los resultados de la viscosidad ileal y el posible efecto del tipo del tratamiento (Salmosan, Duraió y Duraió mas la enzima β -mananasa) sobre la viscosidad ileal. Aquí no hemos determinado la viscosidad ileal de los pollos que no hayan sido inoculados ni alimentados con prebióticos (U-U_t) porque hemos considerado que los tratamientos “U-U_t” y “I-U_t” son iguales en este caso ya que los dos tratamientos no ha tenido ni prebióticos ni enzimas, por lo tanto hemos aprovechado de un lado los cuatro parques que tenía el tratamiento “I-U_t” y que se considera en este caso como tratamiento control, y de otro lado el hecho de que este tratamiento (I-U_t) corresponde a pollos inoculados con *Salmonella* para que podamos hacer una comparación con los otros tratamientos que también corresponden a pollos inoculados con *Salmonella*.

Tabla 10: los promedios y la desviación estándar de la viscosidad ileal de los diferentes tratamientos a 31 días de vida.

Tratamientos	n	Viscosidad ileal (cps ²)	
		Mean	D.Est ³
I-U_t	4	2.9	0.74
I-Salmosan	4	4.0	1.50
I¹-Duraió	4	3.6	0.75
I-Duraió-Enz	4	3.8	1.02
Total	16	3.6	1.03
P-valor		0.49	

¹ **I:** Pollos inoculados; **U_t:** Pollos no tratados; **Enz:** β -mananasa.

² **cps:** Centipoise.

³ **D.Est:** Desviación estándar; **Mean:** Promedio del variable; **n:** numero de observaciones.

Independientemente del tipo del tratamiento los valores de la viscosidad ileal no tuvieron diferencias significativas (p -valor = 0.49) aunque el tratamiento control (**I-U_t**) que no haya tenido ni prebióticos ni enzimas fue el tratamiento que menor viscosidad tenia (2.9 cps) respecto los tratamientos donde había galactomananos en el pienso (3.6, 3.8 y 4.0 cps). Los pollos que fueron alimentados con Salmosan son aquellos que hayan tenido numéricamente un mayor valor de viscosidad ileal (4.0 cps) respecto a los demás aunque este producto comercial lleva enzimas para aliviar el efecto de los β -galactomananos del Salmosan que dan viscosidades altas a nivel del intestino. Los pollos que recibieron el Duraió más la enzima β -mananasa, tuvieron viscosidades más altas (2.8 cps) que aquellos que fueron alimentado sólo con el Duraió (3.6 cps) aunque la diferencia no fue significativa (**tabla 10**).

3-Efecto de los prebióticos y la inoculación con *Salmonella* sobre el perfil de los ácidos grasos volátiles

También en este experimento hemos estudiado el posible efecto de los prebióticos sobre la microflora intestinal y por lo tanto la producción de los ácidos grasos volátiles. Los resultados los tenemos presentados en la **tabla 11**.

Tabla 11: Perfil de los ácidos grasos volátiles en $\mu\text{mols/g}$ en pollos de 23 días de vida, 15 días post infección

Tratamiento	n	Fórmico		Acético		Propiónico		Isobutírico		Butírico		Isovalérico		Valérico		Láctico		Succínico		AGV ¹	
		Mean	D.Est ²	Mean	D.Est	Mean	D.Est	Mean	D.Est	Mean	D.Est	Mean	D.Est	Mean	D.Est	Mean	D.Est	Mean	D.Est	Mean	D.Est
U-U_t	2	9.1 ^a	0.83	38.1	9.30	4.7	0.24	0.3	0.01	14.4	5.44	0.0	0.00	0.8	0.16	1.4	1.33	5.5	2.86	74.3	9.66
I-U_t	4	5.4 ^b	1.10	48.6	4.79	6.6	1.83	0.6	0.09	19.1	3.78	0.1	0.09	1.2	0.19	0.8	0.34	3.0	1.95	85.3	11.09
I³-Salmosan	4	4.2 ^{bc}	0.69	44.7	2.91	5.2	2.06	0.4	0.28	16.9	2.68	0.0	0.02	1.0	0.16	0.4	0.20	3.2	1.38	76.1	6.94
I-Duraió	4	3.2 ^c	1.47	53.7	9.94	5.2	1.18	0.2	0.17	23.4	6.92	0.0	0.00	1.1	0.38	1.4	1.57	2.4	1.27	90.7	11.70
I-Dur-Enz	4	3.9 ^{bc}	0.61	47.4	7.88	5.9	3.08	0.3	0.29	18.8	5.55	0.1	0.11	0.9	0.51	9.8	13.55	3.7	1.95	90.7	8.20
p-valor		*** <0.001		0.19		0.79		0.30		0.30		0.65		0.47		0.28		0.40		0.13	

¹ **AGV:** Ácidos grasos volátiles (total).

² **D.Est:** Desviación estándar; **Mean:** Promedio del variable; **n:** numero de observaciones.

³ **I:** Pollos inoculados (1 ml de 10^8 UFC de *S. Enteritidis*); **U:** Pollos no inoculados; **U_t:** Pollos no tratados; **Dur:** Duraió; **Enz:** β -mananasa.

^{a, b} Superíndices con letras diferentes indican una diferencia significativa entre los promedios (p-valor ≤ 0.1).

La inoculación de la *Salmonella* a los pollos hace que las concentraciones en fórmico bajen, ya que todos los tratamientos que corresponden a los pollos inoculados tuvieron concentraciones menores respecto a aquellos que no han sido inoculados con una diferencia significativa (p -valor < 0.001). Los pollos no inoculados con *Salmonella* (U-U_t) tuvieron un promedio de 9.1 $\mu\text{mol/g}$ frente a 5.4, 4.2, 3.9 y 3.2 $\mu\text{mol/g}$ de los tratamientos “I-U_t”, “I-Salmosan”, “I-Dur-Enz” y “I-Duraió” respectivamente. También el hecho de añadir el Duraió solo a la dieta sin la enzima β -mananasa en pollos inoculados con *Salmonella* (I-Duraió) causa una bajada de las concentraciones del fórmico (3.2 $\mu\text{mol/g}$) respecto a la dieta que no lleva Duraió en pollos inoculados con *Salmonella* (5.4 $\mu\text{mol/g}$) con una diferencia significativa (p -valor < 0.1). Independientemente del factor de la inoculación con *Salmonella* y el factor del tratamiento con prebióticos, los cinco tratamientos tuvieron valores similares en cuanto a las concentraciones de los demás ácidos grasos volátiles (p -valor > 0.1). Cabe destacar que los pollos inoculados con *Salmonella* y que recibieron el Duraió mas la enzima β -mananasa (I-Dur-Enz), tuvieron concentraciones altas en ácido láctico (9.8 $\mu\text{mol/g}$) respecto a los otros tratamientos pero sin diferencia significativa (p -valor = 0.28) ya que eso fue con una desviación estándar de 13.55 que fue muy alta comparándola con las desviaciones de los otros tratamientos. En cuanto a los ácidos grasos volátiles en total (AGV), los pollos que no han sido ni inoculados ni alimentados con prebióticos (U-U_t), tuvieron el valor más bajo de los AGV en total (74.3 $\mu\text{mol/g}$) respecto a los otros tratamientos pero sin diferencias significativas con los otros tratamientos: “I-U_t” (85.3 $\mu\text{mol/g}$), “I-Salmosan” (76.1 $\mu\text{mol/g}$), “I-Duraió”(90.7 $\mu\text{mol/g}$) y “I-Dur-Enz” (90.7 $\mu\text{mol/g}$) (**tabla 11**).

4-Estudio bacteriológico (presencia y ausencia de *Salmonella*):

Tal y como se ha comentado antes en material y métodos, el muestreo para la análisis de la presencia y ausencia de *Salmonella* se ha hecho en tres periodos, a 4, 7 y 14 días post inoculación. En la **tabla 12** se presenta el número de pollos positivos a la *Salmonella* sobre el total de los pollos analizados en cada tratamiento y el porcentaje de la infección por periodos separados. En la **tabla 13** se detallan, son los mismos datos pero durante todo el periodo independientemente del día de muestreo post inoculación.

Tabla 12: Análisis microbiológicos para la determinación de la Presencia/ausencia *S. Enteritidis* por periodos separados (4, 7 y 14 días post inoculación).

día post inoculación	Tratamientos	Presencia/ausencia <i>Salmonella</i>		
		N	Pollos positivos	Infección (%)
4	Control negativo (T1)	10	0	0
	Control positivo (T2)	12	4	33.3
	Salmosan (T3)	8	1	12.5
	Duraió (T4)	11	2	18.2
	Duraió+Enz (T5)	9	0	0.0
		$P \chi^2$ (T2 vs T3)	0.30	
7		$P \chi^2$ (T2 vs T4)	0.42	
		$P \chi^2$ (T2 vs T5)	0.06	
	Control negativo (T1)	10	0	0.0
	Control positivo (T2)	8	1	12.5
	Salmosan (T3)	12	0	0.0
	Duraió (T4)	9	1	11.1
14	Duraió+Enz (T5)	11	2	18.2
		$P \chi^2$ (T2 vs T3)	0.22	
		$P \chi^2$ (T2 vs T4)	0.93	
		$P \chi^2$ (T2 vs T5)	0.74	
	Control negativo (T1)	10	0	0.0
	Control positivo (T2)	12	3	25.0
	Salmosan (T3)	8	0	0.0
	Duraió (T4)	11	2	18.2
	Duraió+Enz (T5)	9	2	22.2
		$P \chi^2$ (T2 vs T3)	0.13	
		$P \chi^2$ (T2 vs T4)	0.70	
		$P \chi^2$ (T2 vs T5)	0.89	

N: el número total de pollos analizados en cada tratamiento.

Tabla 13: Análisis microbiológicos para la determinación de la Presencia/ausencia *S. Enteritidis* por todo el period del experimento.

Tratamiento	Presencia/ausencia <i>Salmonella</i>		
	N	positivos	Infección (%)
Control negativo (T1)	30	0	0.0
Control positivo (T2)	32	8	25.0
Salmosan (T3)	28	1	3.6
Duraió (T4)	31	5	16.1
Duraió+Enz (T5)	29	4	13.8
	P χ^2 (T2 vs T3)		
	* 0.02		
	P χ^2 (T2 vs T4)		
	0.39		
	P χ^2 (T2 vs T5)		
	0.28		

N: el número total de pollos analizados en cada tratamiento.

Las comparaciones entre tratamientos en nuestro estudio se hicieron entre el tratamiento control positivo (pollos inoculados no tratados “T2”) y los tratamientos que llevan prebióticos (Salmosan, Duraió y Duraió+Enz “T3, T4 y T5 respectivamente”) para ver el efecto de cada tratamiento sobre la inhibición de la colonización intestinal de la *Salmonella*. Cuando se presentan los datos por periodo separado, no se ha detectado diferencias significativas excepto el caso entre el tratamiento T5 (Duraió+Enz) y el tratamiento T2 (control positivo) en donde no tuvimos ningún pollo positivo sobre un total de 9 pollos muestrados con una diferencia significativa ($P \chi^2 = 0.06$) en 4 días post inoculación (**Tabla 12**), pero cuando se presentan los datos de la presencia /ausencia de *Salmonella* sin tener en cuenta el día de muestreo post inoculación, sólo el tratamiento T3 (Salmosan) disminuyó significativamente ($P \chi^2 = 0.02$) la colonización (solamente con un pollo positivo sobre un total de 28 pollos muestrados en el caso del tratamiento con Salmosan, y 8 pollos positivos sobre un total de 32 pollos analizados que habían sido inoculados con la *Salmonella*, sin recibir ningún tratamiento -control positivo “T2”) (**Tabla 13**). El mismo tratamiento “T3” (Salmosan) en 14 días post inoculación tenía un 0 % de infección (0 pollos positivos en total de 8 pollos muestrados) frente al control positivo que tuvo una tasa de infección del 30 % (3 pollos positivos en total de 12 pollos muestrados) ($P \chi^2 = 0.13$) (**Tabla 12**). En los pollos que no han sido ni inoculados ni tratados (control negativo), no se ha observado ninguno positivo a la *Salmonella* en los pollos analizados en todos los periodos (**Tabla 12**) porque estaban

bien aislados de los pollos que fueron inoculados con la *Salmonella*, lo que quiere decir que no se ha transmitido la *Salmonella* a estos pollos a partir de los pollos inoculados que estaban a su lado (T3) (ver figura 4). Todos los tratamientos que llevan prebióticos (T3, T4 y T5) previnieron la colonización intestinal por parte de la *S. Enteritidis* mostrando una numéricamente menor tasa de infección (% infección) respecto al control positivo (T2) (**Tabla 12 y 13**) excepto el caso del tratamiento 5 (Duraió+Enz) en 7 días post inoculación que tuvo un 20 % de infección mientras que el control negativo tuvo un 10 % de infección, teniendo en cuenta que el número total de los pollos muestrados en estos dos tratamientos no ha sido el mismo por un error de muestreo (un total de 11 pollos muestrados del T5 mientras que el control positivo tenía solamente un total de 8 pollos muestrados) (**Tabla 12**).

5-Estudio de la expresión génica a nivel intestinal:

La expresión génica de las citoquinas relacionadas con la respuesta inmune a nivel intestinal está presentada respecto a la expresión génica de GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) como referencia, que no cambia su expresión génica en cualquier infección. Los datos de la expresión génica de GIFN, IL-10, TNF- α , IL-2, TLR 2, MHC-I y MHC-II por cada tratamiento se presentan en la **tabla 14**.

La expresión génica de todas las citoquinas a nivel del intestino no marcó diferencias significativas entre los tratamientos excepto para la expresión del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) que disminuyó en los pollos inoculados con *Salmonella* (un 64% de disminución T2 vs. T1) y en los inoculados del tratamiento con la Duraió (un 66% de disminución T4 vs. T1) (p-valor = 0.007) y sin diferencias significativas en relación al tratamiento con Salmosan “T3” y el tratamiento de Duraió+enz “T5” (39% reducción vs. T1) en ambos casos. Cabe destacar que las observaciones de la expresión génica del TNF- α con el tratamiento Duraió fueron más agrupadas al tener una desviación estándar más pequeña que los demás tratamientos. Se notó que el hecho de infectar los pollos con la *Salmonella* hace bajar numérica pero no significativamente la expresión génica del interferon gamma (GIFN; 38% disminución), el interleukin 2 (IL-2; 48% disminución), el complejo mayor de histocompatibilidad I y II (MHC-I y MHC-II; 14% y 20% de disminución respectivamente) y en menor medida el receptor de tipo Toll 2 (TLR 2; 12% disminución). Cabe notar que en el caso del TLR2, GIFN y IL-2, las observaciones de los animales infectados tanto tratados como no tratados, y en especial

el tratamiento con Duraió, tuvieron valores más agrupados que los no infectados. Esta respuesta más agrupada también se observó con TNF- α pero sólo en los tratamientos T2 (Control Positivo) y sobretodo con tratamiento T4 (Duraió). La expresión génica del interleukin 10 (IL-10) aumentó con la infección (T2, T3, T4 y T5) (145%, 201%, 271% y 136% de incremento respectivamente) aunque sin alcanzar la significancia (p-valor = 0.17).

Como se ha comentado anteriormente, no hubo diferencias significativas en cuanto a la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC-II) pero se puede decir que la aportación de la β -mananasa al Duraió “T5” aumenta la expresión génica del MHC-II (1.479) respecto los demás tratamientos, también la Salmosan “T3” que lleva la β -mananasa en su composición tuvo una expresión alta del MHC-II (1.410) pero eso fue con una desviación estándar superior frente a los demás tratamientos (1.5309 vs. 0.4568, 0.6057, 0.8805 y 0.7702) (**tabla 14**).

Tabla 14: La expresión génica de las citoquinas a nivel intestinal 4 días post inoculación expresada con referencia a GAPDH.

Tratamiento	n	GIFN		IL2		IL10		TNF α		TLR2		MHCI		MHCII	
		Mean	D.Est	Mean	D.Est	Mean	D.Est	Mean	D.Est	Mean	D.Est	Mean	D.Est	Mean	D.Est
Control negativo (T1)	5	1.239	0.8395	1.120	0.6019	1.091	0.5053	1.050 ^a	0.3266	1.361	1.2153	1.102	0.4432	1.061	0.4568
Control positivo (T2)	7	0.771	0.3748	0.575	0.2466	1.583	1.0554	0.376 ^b	0.1543	1.203	0.8419	0.953	0.6384	0.850	0.6057
Salmosan (T3)	4	0.854	0.4625	0.849	0.5007	2.198	1.4784	0.645 ^{ab}	0.4246	0.934	0.4914	0.565	0.1274	1.410	1.5309
Duraió (T4)	4	0.616	0.3337	0.590	0.1752	2.955	1.6295	0.360 ^b	0.0361	0.607	0.0715	0.713	0.2635	1.043	0.8805
Duraió+Enz (T5)	4	0.688	0.5061	0.644	0.3438	1.485	0.8033	0.638 ^{ab}	0.3961	0.801	0.3431	0.705	0.4747	1.479	0.7702
P-valor		0.44		0.19		0.17		** 0.007		0.58		0.43		0.76	

VI- DISCUSION:

Los rendimientos productivos de los pollos no fueron afectados por la presencia de los galactomananos (Duraió y Salmosan) en el pienso con concentraciones del 0.1%, igual de lo que se demostró en otro experimento (**Vilà et al., 2012**), en donde los galactomananos de algarrobo no perjudicaron ni la ganancia media diaria ni la índice de conversión con concentraciones del 2.5% de los galactomananos de algarrobo en el pienso en pollos de 19 días de vida, pero sí que afectó estos rendimientos productivos al 10% de inclusión en el pienso y esto fue asociado a una disminución significativa de la digestibilidad de los nutrientes. También de acuerdo con los resultados obtenidos por **Biggs et al (2007)**, que no vieron efectos negativos de manano-oligosacaridos sobre los rendimientos productivos a concentraciones del 0.4% en pollos a 7 y 21 días de edad. Resultados en desacuerdo con los que obtuvieron **Lee et al. (2003)** donde los galactomananos de guar perjudicaron significativamente el crecimiento de los pollos a concentraciones del 2.5% y del 5% que fue acompañado con un incremento significativo en la viscosidad intestinal respecto los pollos que no tuvieron galactomananos del guar en el pienso. Esto se puede explicar de un lado por las inclusiones bajas del Duraió y Salmosan que hemos utilizado en nuestro experimento (0.1%) que quizás no hayan llegado a niveles críticos para causar viscosidades altas que puedan perjudicar la digestibilidad a nivel del intestino ya que las viscosidades intestinales de que hemos tenido en nuestro experimento con los pollos alimentados con galactomananos (Salmosan o Duraió) sí que fueron altas numéricamente respecto a la dieta control (sin prebióticos) pero sin diferencia significativa (p-valor = 0.49), por otro lado, la determinación de la viscosidad del contenido ileal en nuestro experimento se hizo con pollos de 31 días de edad mientras que en el experimento de **Lee et al. (2003)** se hacía con pollos a 21 días de edad teniendo en cuenta que los pollos de mayor edad tienen más capacidad de contrarrestar la viscosidad intestinal producida por los galactomananos por disponer un aparato digestivo más desarrollado con mayor actividad enzimática (**Almirall et al., 1995**).

La inoculación con *S. Enteritidis* no tenía ningún efecto significativo sobre los rendimientos productivos de los pollos en cuanto al peso final de los pollos y la ganancia media diaria donde los valores fueron similares tanto para los pollos inoculados como los no inoculados, resultados similares a los que tuvieron **Vilà et al. (2012)** con broiler en un periodo entre 1 y 19 días de edad.

Las concentraciones de ácidos grasos volátiles que se encuentran en pollos sanos de 15 días de vida provocaron la desaparición de *Salmonella* en incubaciones in vitro, mientras que los niveles de ácidos grasos volátiles de pollos más jóvenes disminuyeron su presencia pero no eliminaron totalmente la *Salmonella* (van der Wielen et al, 2001). Con la inclusión de prebióticos en el pienso se esperaba un incremento en los niveles de ácidos grasos volátiles (Faber et al, 2012) que disminuyera consecuentemente la presencia de *Salmonella*. Sin embargo, este incremento no se observó, por lo que el efecto prebiótico de los productos no fue suficiente para modificar la microbiota intestinal 15 días post infección en comparación con los animales infectados no tratados. Por otro lado, la infección con *Salmonella* incrementó numéricamente la concentración de acético, butírico y ácidos grasos volátiles totales, en contraste con los resultados obtenidos por Faber et al (2012) donde se disminuyó la concentración de estos ácidos por la infección con *Salmonella*. Además, las concentraciones de estos ácidos fueron muy inferiores en nuestro estudio.

Tal y como se ha comentado previamente en la revisión bibliográfica, en el caso de la *Salmonella* está ampliamente aceptado que el mecanismo de la inhibición de la adhesión reside en la presencia de los residuos de manosa en los prebióticos, a las cuales se une la fimbria tipo 1 que se expresa por la mayoría de las cepas patógenas intestinales de la *Salmonella* como por ejemplo la *S. Enteritidis*. De hecho en nuestro trabajo los tratamientos que llevaron prebióticos (galactomananos) en el pienso tuvieron numéricamente una menor tasa de infección respecto al control positivo (excepto el T5 a 7 días post inoculación) aunque solamente se alcanzó la significancia en el caso del T3 (Salmosan, p-valor = 0.02). Hay que destacar un factor muy importante acerca de la tasa de infección, es que los pollos inoculados del control positivo no han tenido tasas de infección altas como se esperaba (alrededor del 70%) sino que la tasa de infección no ha sobrepasado el 34% en todos los periodos (4, 7 y 14 días post inoculación); este hecho dificulta que las tasas de infección observadas con los tratamientos de prebióticos lleguen a ser significativamente menores respecto al control positivo. Las buenas condiciones higiénicas que han tenido estos animales durante la prueba quizás ayudaron a estabilizar su microflora y a eliminar la *Salmonella* inoculada experimentalmente. Sin embargo, en varios estudios anteriores se detectaron tasas de infección con pollos inoculados no tratados del orden del 67% a 19 días post inoculación con *S. Enteritidis* (Vilà et al., 2012), del 100% a 7 días post inoculación con *S. Typhimurium* (Buhari et

al., 1989) y también del 100% a 7 días post inoculación con la *S. Enteritidis* (Fernandez *et al.*, 2000).

La respuesta esperada de la expresión de citoquinas tras la infección incluiría un incremento del TNFa a partir de las primeras horas, y que se mantendría mientras persistiera la inflamación, así como una mayor expresión de TLR2, MHCII, IL2 y GIFN, éstos dos últimos liberados después del reconocimiento del antígeno (máxima expresión 4 días post infección (Badia, 2012; Badiola, 2012, comunicación personal).

En nuestro estudio, la expresión del TLR2 en la mucosa intestinal de los animales infectados no tratados disminuyó numéricamente un 12%, 4 días post infección, en contradicción con los resultados obtenidos por Abasht *et al.* (2008) determinando la expresión en 7 días post inoculación (más del 200% incremento de expresión). Quizás la determinación de la expresión del TLR2 a cuatro días fue demasiado temprana para detectar su incremento. Otro factor a considerar es que de los cuatro animales positivos a *Salmonella* del grupo Inoculado no Tratado, solamente se analizó la expresión génica de dos de ellos, por lo que en realidad el valor obtenido de expresión (1.203 para el T2) corresponde al promedio de 5 animales negativos (valor 1.124) y dos positivos a *Salmonella* (valores 2.165 y 0.639). Sin embargo, Abasht *et al* (2008) no encontraron una correlación significativa entre la expresión génica de los TLR2, TLR4 y TLR5 con la carga bacteriana. Los animales tratados con prebiótico disminuyeron numéricamente la expresión del TLR2 respecto los infectados no tratados, pero la interpretación de esta variación se hace difícil al no haberse incrementado la expresión en los animales infectados no tratados.

El incremento en la expresión de la IL10 con la infección (aún sin alcanzar significancia) está de acuerdo con lo esperado y con los resultados obtenidos *in vitro* por Redmond *et al* (2009), puesto que es una citoquina antiinflamatoria como mecanismo de control de la respuesta innata para evitar daños en los tejidos (Badia, 2012). Sin embargo la expresión génica del GIFN disminuyó numéricamente con la infección, en contradicción con los resultados de Shaughnessy *et al* (2009), aunque los tiempos en los que se valoró también fueron distintos (4 días en nuestro caso, 2 días en el suyo). Ambas citoquinas no fueron afectadas por los prebióticos, en concordancia con los resultados obtenidos por Janardhana *et al* (2009), que no vieron efecto de los

manao-oligosacaridos sobre la expresión génica de IL10 y GIFN en pollos de 25 días de vida.

El incremento esperado en la expresión del TNFa tras una infección (**Erf, 2004**) no fue observado en nuestro estudio; de los siete animales inoculados no tratados de los que se determinó la expresión génica, los dos positivos a *Salmonella* tuvieron valores (0.425 y 0.255) similares a los cinco negativos a *Salmonella* (de 0.201 a 0.642) y siempre inferiores a los animales no inoculados (de 0.544 a 1.362).

Tal y como se ha comentado en la revisión bibliográfica, según **Awad et al (2012)**, el epitelio intestinal de los pollos infectados experimentalmente con la *S. Enteritidis*, tiene menor sensibilidad hacia los mediadores inflamatorios que en otras especies, de hecho, esta baja sensibilidad del epitelio intestinal de los pollos hacia la *Salmonella* puede dar explicaciones de la disminución observada en nuestro trabajo de la expresión génica de las citoquinas proinflamatorias IL2, TNF-a y GIFN (**Badia, 2012**) con la infección experimental (pollos inoculados no tratados).

VII-CONCLUSIONES

- La inclusión de los galactomananos, tanto Salmosan como Duraió a inclusiones bajas no afectó negativamente los rendimientos productivos de los pollos.
- La infección experimental de los pollos con la *Salmonella* no tuvo efecto negativo sobre los rendimientos productivos de los pollos independientemente del tipo del tratamiento y también dentro del mismo tratamiento (periodo entre 7 y 29 días de edad).
- Los prebióticos que hemos estudiado en nuestro trabajo aumentaron numérica pero no significativamente la viscosidad a nivel intestinal, por el hecho de haber incluido dosis bajas de estos prebióticos (0.1%).
- No se ha notado un efecto de la enzima β -mananasa sobre la viscosidad intestinal, por haber trabajado con dosis bajas de estos prebióticos.
- La inoculación de los pollos con la *Salmonella* hace bajar las concentraciones en fórmico y aún más con Duraió, también una reducción numérica con Salmosan (T3) y Duraió más la enzima (T5), dos tratamientos que llevan la β -mananasa.
- Los dos tratamientos con la Duraió (T4 y T5) aumentaron numéricamente las concentraciones del total de los ácidos grasos volátiles.
- Por lo general, los prebióticos estudiados tuvieron numéricamente una menor tasa de infección respecto los pollos infectados no tratados (excepto el T5 a 7 días post inoculación) aunque solamente se alcanzó la significancia en el caso del Salmosan (T3) considerando todos los días de análisis en conjunto. Sin embargo la baja tasa de infección en los pollos inoculados no tratados dificulta que los resultados alcancen el nivel de significancia.
- No se obtuvo la respuesta esperada en la expresión génica de marcadores inmunológicos tras la inoculación de *Salmonella*. Tampoco se observó ningún cambio en la expresión génica de estas citoquinas por la inclusión de prebióticos en el pienso.

Referencias bibliograficas

- Abasht, B., M. G. Kaiser, and S. J. Lamont.** (2008). Toll-like receptor gene expression in cecum and spleen of advanced intercross line chicks infected with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 123: 314-323.
- Abasht, B., M. G. Kaiser, J. van der Poel, and S. J. Lamont.** (2009). Genetic lines differ in Toll-like receptor gene expression in spleens of chicks inoculated with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Poultry Science*, 88: 744-749.
- Allen, V., Fernandez, F., Hinton, M.H.** (1997). Evaluation of the influence of supplementing the diet with mannose or palm kernel meal on *salmonella* colonisation in poultry. *British Poultry Science.*, 38: 485– 488.
- Almirall, M., Francesch, M., Perez-Vendrell, A.M., Brufau, J., Esteve-Garcia, E.** (1995). The difference in intestinal viscosity produced by barley and β -glucanase alter digesta enzyme activities and ileal nutrient digestibilities more in broiler chicks than in cocks. *J. Nutr.* 125:947–955.
- Álvarez-Fernández, E., Alonso-Calleja, C., García-Fernández, C., Capita, R.** (2012). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: Comparison between 1993 and 2006. *International Journal of Food Microbiology.*, 153: 281-287.
- Álvarez Manceñido, F.J.** (2007). Evaluacion del glucomanano de Konjac como excipiente base en forma de dosificacion solidas de liberación modificada. PhD Thesis, Universidad de Santiago de Compostela, Facultad de farmacia, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.
- Awad, W. A., Aschenbach, J. R., Khayal, B., Hess, C., Hess, M.** (2012). Intestinal epithelial responses to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis: Effects on intestinal permeability and ion transport. *Poultry Sci.*, 73: 2949–2957.
- Badia, R. (2012).** Efecte modulador de probiòtics i prebiòtics sobre les funcions immunitàries de cèl·lules epitelials de l' intestí i dendrítiques en un model porcí d'infecció bacteriana *in vitro*. PhD Thesis, Universitat Autònoma de Barcelona, Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'immunologia.
- Badiola, I.** (2012). Comunicació personal.

- Bailey, J.S., Blankenship, L.C., Cox, N.A.** (1991). Effect of fructooligosaccharide on *Salmonella* colonisation of the chicken intestine. *Poultry Science.*, 70: 2433–2438.
- Battle, C.I. and Tous, M. J.** (1989). El algarroba. Ediciones Mundi-Prensa. ISBN: 84-7114-268-6.
- Baurhoo, B., Ferket, P.R. and Zhao, X.** (2009) Effects of diets containing different concentrations of mannan oligosaccharide or antibiotics on growth performance, intestinal development, cecal and litter microbial populations, and carcass parameters of broilers. *Poultry Science.*, 88: 2262–2272.
- Becker, P.M. and Galletti, S.** (2008). Food and feed components for gut health-promoting adhesion of *E. coli* and *Salmonella enteric*. *J Sci Food Agric.*, 88:2026–2035.
- Bedford M.** (2000). Removal of antibiotic growth promoters from poultry diets: implications and strategies to minimize subsequent problems. *World's Poultry Sci. J.*, 56: 347-354.
- Bengmark S.** (1998). Immunonutrition: role of biosurfactants, fiber and probiotic bacteria. *Nutrition.*, 14: 585-594.
- Biggs, P., Parsons, CM., Fahey, GC.** (2007). The effects of several oligosaccharides on growth performance, nutrient digestibilities, and cecal microbial populations in young chicks. *Poult Sci.*;86:2327–36.
- Buhari, A., Oyofe, J. R., DeLoach, D. E., Corrier, J. O., Norman, R. L., Ziprin., Hilton, H. Mollenhauer.** (1989). Effect of carbohydrates on *Salmonella* typhimurium colonization in Broiler chickens. *Avian diseases.*, 33: 531-534.
- Coburn, B., Grassl, G. A., Finlay, BB.** (2007). *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunology and Cell Biology.*, 85: 112-118.
- Cummings J.H.**, Short-chain fatty acids in the human colon. *Gut.*, 22: 763-779.
- Desmidt, M., Ducatelle, R., Haesebrouck, F.** (1997). Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* phage type four after experimental infection of young chickens. *Veterinary Microbiology.*, 56: 99-109.

- Dias de Oliveira, S., Siqueira Flores, F., Ruschel dos Santo, L., Brandelli, A.** (2005). Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry related samples. International Journal of Food Microbiology., 97: 297-305
- Ducatelle, R.V.A., Van Immerseel, F., Cauwerts, K., Janssens, G., De Smet, I., De Buck, J., Haesebrouck, F.** (2001) Proceedings 13 th Eur. Symp. Poult. Nutr. 90-97.
- Dupont, H.L. and Steele, J.H.** (1987). Use of antimicrobial agents in animal feeds: implications for human health. Reviews of Infectious Diseases .9: 447 – 460.
- EFSA** (2010). Scientific Opinion on a quantitative estimation of the public health impact of setting a new target for the reduction of *Salmonella* in laying hens. The EFSA Journal. 8:1546.
- EFSA** (2011a). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. The EFSA Journal. 9: 2090.
- EFSA** (2011b). Scientific opinion on a quantitative estimation of the public health impact of setting a new target for the reduction of *Salmonella* in broilers. The EFSA Journal. 9: 2106.
- Erf, G.** (2004). Cell-mediated immunity in poultry. Poultry Science 83:580-590.
- Fernandez, F., Hinton, M.H., Van Gils, B.** (2000). Evaluation of the effect of mannan- oligosaccharides on the competitive exclusion of *Salmonella* Enteritidis colonisation in broiler chicks. Avian Pathology., 29: 575–581.
- Fernandez, F., Hinton, M.H., Van Gils, B.** (2002). Dietary mannan-oligosaccharides and their effect on chicken caecal microflora in relation to *Salmonella* Enteritidis colonization. Avian Pathology, 31, 49–58.
- Franco, D.A., Webb, J., Taylor, C.E.** (1990). Antibiotic and sulfonamide residues in meat: Implications for human health. Journal of Food Protection., 53: 178 – 185.
- François-Xavier, W.** (2008). *Salmonella*: épidémiologie, typage et résistance aux antibiotiques. Revue Francophone des Laboratoires . Issue 400, Pages 37–47.

- Fukata, T.K., Sasai, K., Miyamoto, T., Baba, E.** (1999). Inhibitory effect of competitive exclusion and fructo-oligosaccharide, single and in combination, on *Salmonella* colonisation of chicks. *Journal of Food Protection.*, 62: 229– 233.
- Gaggìa, F., Mattarelli, P., Biavati, B.** (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int J Food Microbiol* , 141: S15-S28.
- Gast, R.K.** (2007). Serotype-Specific and Serotype-Independent Strategies for Preharvest Control of Food-Borne *Salmonella* in Poultry. *Avian Dis.*, 51:817– 828.
- Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B.** (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nut.*, 125: 1401.
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Loo, J. V., Rastall, R. A., Roberfroid, M. B.** (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Review.*, 17: 259–275.
- Haraga, A., Ohlson, M.B., Miller, S.I.** (2008). *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol.*, 6: 53-66.
- Iji, P.A. and Tivey, D.R.** (1998). Natural and synthetic oligosaccharides in broiler chicken diet. *World's Poultry sci.J.* 54: 129-143.
- Janardhana, V., M. M. Broadway, M. P. Bruce, J. W. Lowenthal, M. S. Geier, R. J. Hughes, and A. G. D. Bean.** (2009). Prebiotics Modulate Immune Responses in the Gut-Associated Lymphoid Tissue of Chickens. *The Journal of Nutrition*, 139: 1404-1409.
- Korsgaard, H., Madsen, M., Feld, N.C., Mygind, J., Hald, T.** (2009). The effects, costs and benefits of *Salmonella* control in the Danish table-egg sector. *Epidemiol Infect.*, 137, 828-836.
- Lax, A. J., Barrow, P. A., Jones, P. W., Wallis, T. S.** (1995) Current perspectives in salmonellosis. *Britis Vet J.*, 151:351-377.
- Lazaridou, A., Biliaderis, C.G., Izydorczyk, M.S.** (2001). Structural characteristics and rheological properties of locust bean galactomannans: a comparison of samples from different carob tree populations. *J Sci Food Agric.*, 81:68–75.

- Lee, J. T., Bailey, C.A., Cartwright, A.L.** (2003). beta-Mannanase ameliorates viscosity-associated depression of growth in broiler chickens fed guar germ and hull fractions. *Poultry Science*, 82(12), 1925–1931.
- Ling, M.L. and Wang, G.C.Y.**, (2001). Epidemiological analysis of *Salmonella* enteritidis isolates in Singapore. *Journal of Infection.*, 43: 169– 172.
- Mani-López, E., García, H.S., López-Malo, A.** (2012). Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Research International*. 45: 713–721.
- Mehta, A., Singh, S., Dhawan, V., Ganguly, N. K.** (1998). Intestinal mucosal lipid peroxidation and absorptive function in *Salmonella typhimurium* mediated intestinal infection. *Mol Cell Biochem.*, 178:345–352.
- Mikcha, J.M.G., Freire, M.G., Macedo, M.L.R., Yano, T., Piantino Ferreira, A.G.** (2006). Characterization of a nonfimbrial mannose-sensitive hemagglutinin (MSH) produced by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.*, 29: 301–314.
- Millet, S. and Maertens, L.** (2011). The European ban on antibiotic growth promoters in animal feed: From challenges to opportunities. *The Veterinary Journal.*, 187: 143–144.
- Mulimani, V.H. and Prashanth, S.J.** (2002). Investigating plant galactomannans. *Biochem Mol Biol Educ.*, 30:101–103.
- Porter, R.E., Jr., and Holt, P.S.** (1993). Effect of induced molting on the severity of intestinal lesions caused by *Salmonella* Enteritidis infection in chickens. *Avian Dis.* 37:1009–1016.
- Redmond, S. B., P. Chuammitri, C. B., Andreasen, D. Palic, and S. J. Lamont.** (2009). Chicken heterophils from commercially selected and non-selected genetic lines express cytokines differently after in vitro exposure to *Salmonella* enteritidis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 132:129-134.
- Schoeni, J.C.L., and Wong, A.C.L.** (1994). Inhibition of *Campylobacter jejuni* colonization in chicks by defined competitive exclusion cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1191–1197.
- Sharon, N.** (2006). Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1760: 527-537.

- Shaughnessy, R. G., K. G. Meade, S. Cahalane, B. Allan, C. Reiman, J. J. Callanan, and C. O'Farrelly.** (2009). Innate immune gene expression differentiates the early avian intestinal response between *Salmonella* and *Campylobacter*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 132:191-198.
- Silva, F.V.M. and Gibbs, P.A.** (2012). Thermal pasteurization requirements for the inactivation of *Salmonella* in foods. *Food Research International*. 45:695–699.
- Smith, D.L., Harris, A.D., Johnson, J.A., Silbergeld, E.K., Morris Jr., J.G.,** (2002). Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*., 99: 6434 – 6439.
- Terada, A., Hara, H., Sakamoto, J., Sato, N., Takagi, S., Mitsuoka, T., Mino, R., Hara, K., Fujimori, I., Yamada, T.** (1994). Effects of dietary supplementation with lactosucrose (4G-beta-D-galactosylsucrose) on cecal flora, cecal metabolites and performance in broiler chickens. *Poultry Sci.*, 91: 1663-1672.
- van der Wielen, P. W. J. J., S. Biesterveld, L. J. A. Lipman, and F. van Knapen.** (2001). Inhibition of a Glucose-Limited Sequencing Fed-Batch Culture of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis by Volatile Fatty Acids Representative of the Ceca of Broiler Chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 1979-1982. doi 10.1128/aem.67.4.1979-1982.2001
- Vilà, B., Esteve-Garcia, E., Brufau, J.** (2010). Probiotic micro-organisms: 100 years of innovation and efficacy; modes of action. *World's Poultry Science Journal*., 66 (3):369-380.
- Vilà, B., De Queiroz, D., Badiola, I., Pérez-Vendrell, A., Brufau, J.** (2012). Effects of carob bean gum on performance, nutrient digestibility and *Salmonella enterica* var. Enteritidis colonisation in chickens. *Food Research International*. 45: 1133-1138.
- Witte, W.** (1998). Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science*., 279: 996 – 997.
- World Health Organisation:** The Medical Impact of the use of antimicrobials in food animals. 13-17 October; Berlin, Germany 1997, disponible en: http://whqlibdoc.who.int/hq/1997/WHO_EMC_ZOO_97.4.pdf

- Wray, C. and Davies, R.H.** (2000). Competitive exclusion - an alternative to antibiotics. *Vet. J.*, 159: 107-108.
- Yu, Q.H. and Yang, Q.** (2009). Diversity of tight junctions (TJs) between gastrointestinal epithelial cells and their function in maintaining the mucosal barrier. *Cell Biol Int.*, 33:78–82.
- Zhang-Barber, L., Turner, A.K., Barrow, P.A.** (1999). Vaccination for control of *Salmonella* in poultry. *Vaccine.*, 17:2538-2545.

Anexo 1

1. Preparación de la solución del patrón interno (4-metil-valerico).

- Pesar aproximadamente 0.293g (0.318 ml) de 4-metil-valerico dentro de un matraz
- Anadir 1.5 ml de NaOH 5 M y portar al volumen del matraz con agua H₂O (Milli-Q).

2. Preparación de la Solución de los patrones de referencia (A, B, C y D):

- a- Se pesan una cantidad de 0.5-1.6 g aproximadamente (depende del estándar) en un matraz de 50 ml y luego se porta el volumen a 50 ml con agua.
- b- Se hace mezclas entre los diferentes estándares para preparar las diferentes soluciones de referencia como se está demostrado en la tabla siguiente:

	peso patron (g)	NaOH 5M (ml)	H ₂ O ml	PM g/mol	Tiempo retención	A (ml)	B (ml)	C (ml)	D (ml)
Fòrmico	1,5814		50	46,03	2,693	4	8	16	20
Acètico	1,5355		50	60,05	2,831	4	8	16	20
Propionico	0,7465		50	74,08	3,446	10	15	5	2,5
Isobutírico	0,8298		50	88,11	3,562	2,5	15	10	5
Butírico	0,85	1,5	50	88,11	4,201	2,5	5	10	15
Isovalèrico	0,5087	1,5	50	102,14	4,599	10	15	5	2,5
Valèrico	0,5112	1,5	50	102,13	5,311	10	15	5	2,5
4-metil-valerico					6,026				
Làctico	0,5014		50	90,08	9,02	15	2,5	5	10
Succínico	0,5999		50	118,09	15,547	10	5	2,5	15
volumen (ml)						100	100	100	100

- c - Se preparan cuatro tubos cada uno lleva 1 ml de un patrón de referencia.
- d- Los tubos de la solución del patrón de referencia se proceden como si fueran muestras.

Anexo 2

Parametros	Condiciones
Tipo de cromatografo	Cromatógrafo de gases GC 6890.
Horno	<u>Temperatura inicial:</u> 60 °C De 60 °C a 148 °C acumulando 6 °C /min, de 148 °C hasta 220 °C incremento de temperatura de 35 °C /min, se mantiene fija a 220 °C durante 4 minutos. <u>Tiempo:</u> 20.72 minutos
Inyector	Modo : Split La relación Split: 25:1 Flujo Split: 30 ml/min Temperatura inicial: 250 °C Presión: 14.40 psi Flujo total: 33.9 ml/min Tipo de gas portador: Helium
Detector (FID)	Temperatura : 250 °C Flujo del hidrogeno : 43 ml/min Flujo del aire : 400 ml/min Flujo de nitrógeno: 23 mL/min
Columna (DB23 AGILENT)	Dimensiones : 30.0 m x 251.0 µm x 0.25 µm Temperatura máxima: 260 °C