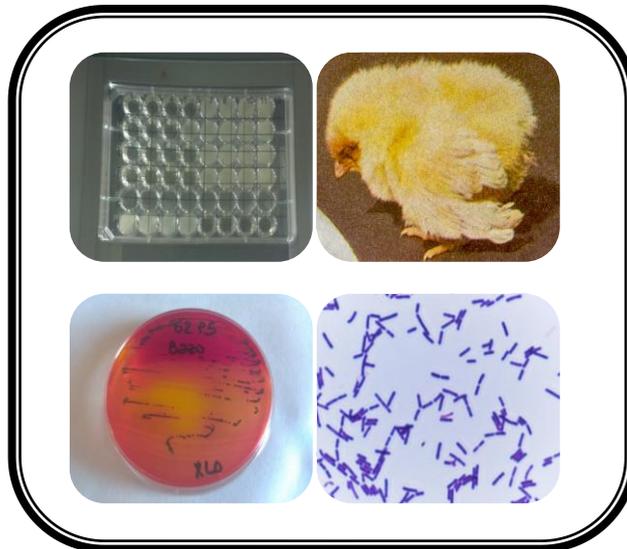




universidad
de león

TESIS DOCTORAL

**Salmonelosis aviar en el oriente de Cuba.
Eficacia de la acetamida furánica monobromada
y de una mezcla probiótica para su control.**



Osmaida Estrada Cutiño

León, España, 2015



UNIVERSIDAD DE LEÓN

Departamento de Sanidad Animal

Facultad de Veterinaria

Directores de tesis: Dr. D. Pedro Miguel Rubio Nistal

Dr. Dña. Ana María Carvajal Uruña

Programa de doctorado: MEDICINA, SANIDAD Y PRODUCCION ANIMAL Y
CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS



UNIVERSIDAD DE LEÓN

Departamento de Sanidad Animal

**Salmonelosis aviar en el
oriente de Cuba. Eficacia de la
acetamida furánica
monobromada y de una mezcla
probiótica para su control.**

Osmaida Estrada Cutiño

León, España, 2015

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas e instituciones que de una u otra forma han contribuido en la realización de este trabajo.

Un especial agradecimiento, en primer lugar a mis directores de Tesis: DrC. Ana Carvajal Urueñas y DrC. Pedro Rubio Nistal, por la oportunidad brindada para concluir la investigación, la colaboración en la elaboración de la tesis, asesoría oportuna, el cariño que me han brindado y la enorme paciencia....

A mis abuelos y padres, por enseñarme siempre a elegir el camino correcto.

A mi querida hija: Martica por ser mi incentivo, mi aliento...y comprender que la separación, valió la pena.

A mi entrañable amigo Francisco Javier por brindarme su amistad, hospitalidad y apoyo absoluto, sin el cual no hubiera podido alcanzar el objetivo propuesto.

A mis amigas: Isora, Charo, Naty, Lucía, Milagros, y mis amigos Vladimir y Pedro José, por su compañía y apoyo incondicional.

A mis colegas del Laboratorio de Enfermedades infecciosas por brindarme su apoyo y colaboración en todo momento: Gloria, Rubén, Héctor, Sara, Conchi, Lorena, Marta, Juan, María de Gracia, Luismi, Javier, Chiruca y Tere.

Al DrC. Francisco Marín, por su colaboración en la realización de la técnica de histopatología de los ensayos in vivo.

Al productor Tomás Gil y su esposa, por su colaboración al facilitar los animales (gallos pluma de León), así como valiosa información al respecto.

A la Universidad de León por abrirme sus puertas, permitirme utilizar todas sus instalaciones.

A la dirección política y administrativa de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Granma y el Ministerio de Educación Superior Cubano, por confiar en mí.

Al claustro de profesores de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Granma por contribuir a mi formación general integral.

Al proyecto de investigación y colaboración (B7019611/08) en el seno del Programa "Cooperación Interuniversitaria e Investigación Científica" de la AECID, en colaboración con la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León (2009-2011), el cual me permitió realizar la primera etapa de las investigaciones.

A la Agencia Española para la Colaboración Internacional y el Desarrollo (AECID), por concederme la beca durante un año (2011-2012) la cual me permitió realizar la segunda etapa de las investigaciones.

A todas las personas que aunque no he nombrado, también contribuyeron al desarrollo de esta tesis.

A todos..... MUCHAS GRACIAS....

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1: Valoración <i>in vitro</i> de la actividad antibacteriana de la acetamida furánica monobromada frente a aislados de <i>Salmonella enterica</i> de origen aviar y a cepas de referencia	7
1.1.- Introducción	9
1.2.- Objetivos	17
1.3.- Materiales y Métodos	18
1.3.1.- Obtención de aislados de <i>Salmonella enterica</i> de origen aviar	18
1.3.1.1.- <i>Recogida de muestras</i>	18
1.3.1.2.- <i>Aislamiento bacteriológico y caracterización bioquímica</i>	18
1.3.1.3.- <i>Confirmación serológica</i>	19
1.3.2.- Determinación de la sensibilidad antimicrobiana frente a la acetamida furánica monobromada	22
1.3.2.1.- <i>Método de macrodilución en tubo</i>	22
1.3.2.2.- <i>Método de microdilución en placa</i>	23
1.3.3.- Análisis estadístico	24
1.4.- Resultados y Discusión	25
1.4.1.- Obtención de aislados de <i>Salmonella enterica</i> de origen aviar	26
1.4.2.- Determinación de la sensibilidad antimicrobiana frente a la acetamida furánica monobromada	32
CAPÍTULO 2: Selección y caracterización <i>in vitro</i> de cepas de bacterias del ácido láctico con potencial probiótico procedentes de aves	37
2.1.- Introducción	39
2.1.1.- Principales características de las BAL	46
2.1.2.- Mecanismos de acción de las BAL	47
2.2.- Objetivos	52
2.3.- Materiales y Métodos	53
2.3.1.- Recogida de muestras	53
2.3.2.- Aislamiento de las BAL	56
2.3.3.- Selección preliminar y conservación de las BAL	56
2.3.4.- Determinación del perfil de resistencia a antibióticos	57
2.3.5.- Determinación de la capacidad de inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos	59
2.3.6.- Capacidad para disminuir el pH del medio	60
2.3.7.- Tolerancia a condiciones de pH ácido	61
2.3.8.- Tolerancia a las sales biliares	63
2.3.9.- Identificación molecular de los aislados de BAL	64

2.4.- Resultados y Discusión	67
2.4.1.- Aislamiento de BAL de origen aviar	67
2.4.2.- Resistencia de las BAL a los antibióticos	79
2.4.3.- Valoración de la capacidad inhibitoria del crecimiento frente a patógenos	98
2.4.4.- Disminución de pH del medio	117
2.4.5.- Tolerancia a condiciones de pH ácido	120
2.4.6.- Tolerancia a sales biliares	125
2.4.7.- Identificación molecular de las BAL seleccionadas	129
CAPÍTULO 3: Valoración <i>in vivo</i> de la acetamida furánica monobromada y de un probiótico de origen aviar frente a la infección por <i>Salmonella enterica</i> en broilers	135
3.1.- Introducción	137
3.2.- Objetivos	141
3.3.- Materiales y Métodos	142
3.3.1.- Animales, instalaciones y manejo	142
3.3.2.- Diseño experimental	145
3.3.3.- Preparación del inóculo para el desafío experimental	146
3.3.4.- Preparación de la acetamida furánica monobromada	147
3.3.5.- Preparación de la mezcla probiótica	147
3.3.6.- Aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i>	148
3.3.7.- Estudio histopatológico	149
3.3.8.- Análisis estadístico	152
3.4.- Resultados y Discusión	154
3.4.1.- Aislamiento bacteriológico	154
3.4.2.- Resultados bacteriológicos, cuadro clínico y lesional e índices productivos en el grupo control	158
3.4.3.- Resultados bacteriológicos, cuadro clínico y lesional e índices productivos en el grupo tratado con acetamida furánica monobromada	173
3.4.4.- Resultados bacteriológicos, cuadro clínico y lesional e índices productivos en el grupo tratado con una mezcla probiótica de origen aviar	185
CONCLUSIONES	209
RESUMEN	215
SUMMARY	219
BIBLIOGRAFÍA	223

INTRODUCCIÓN

La avicultura es, sin lugar a dudas, una de las ramas de la producción animal que más ha evolucionado, debido a la necesidad de buscar una forma rápida, segura y relativamente económica para garantizar una fuente proteica de alto valor biológico para la población (García, 2002), como son la carne de ave y los huevos (Lamelas *et al.*, 2011).

Las infecciones microbianas de todo tipo tienen gran relevancia en la avicultura y una repercusión notable en el rendimiento y la viabilidad de las explotaciones. Tradicionalmente se conoce que las aves son infectadas por diferentes bacterias del género *Salmonella*. Las bacterias de este género están ampliamente distribuidas en la naturaleza, localizándose en el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y salvajes, de reptiles, de aves e incluso de insectos. Participan en un amplio espectro de enfermedades en algunos de estos hospedadores, considerándose como la principal enterobacteria de importancia en salud pública (Stanchi, 2007; Chaengprachak, 2009).

Las aves pueden ser infectadas por una enorme variedad de cepas de *Salmonella*. El biovar Pullorum causa en pollitos la pullorosis o diarrea blanca bacilar mientras que en aves adultas, el biovar Gallinarum causa una enfermedad denominada tifosis, tifus o tifoidea aviar (Plana, 1979; Moreno, 1962; Carter, 1989; Acha, 1986; Cervantes, 1999; OIE, 2008; Sánchez, 2010; Tersolo, 2012). Otros muchos serovares de *Salmonella* infectan a las aves. Algunos causan enfermedad mientras que en otros casos se trata de infecciones asintomáticas pero todos ellos pueden transmitirse al hombre (Ulacia, 2008) constituyendo un importante problema de salud pública.

De forma general, la presencia de *Salmonella* en las aves y en los productos avícolas ha sufrido un incremento progresivo durante los últimos años. En diversos países se han llevado a cabo amplios programas de control y/o erradicación. En el caso de las salmonelas específicas del hospedador

aviar, Gallinarum y Pullorum, se han utilizado fundamentalmente vacunas mientras que para otras, se ha apostado por la aplicación exhaustiva de programas de bioseguridad y control.

La resistencia a los antimicrobianos constituye una amenaza creciente para todos, independientemente de la edad, sexo y nivel socioeconómico. Entre las bacterias clínicamente importantes que están adquiriendo resistencia con rapidez se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. y *Salmonella* spp. Entre numerosos ejemplos, podemos destacar que el 30 % de los aislados de *Str. pneumoniae* en los EE.UU. ya son resistentes a la penicilina y que la multirresistencia en ellos es frecuente: cerca del 11 % son resistentes también a las cefalosporinas de tercera generación y ya se ha descrito resistencia incluso a las fluoroquinolonas más recientes. En Cuba, igualmente, estos y otros muchos microorganismos patógenos han adquirido resistencias. Esto hace que los fármacos elegibles para el tratamiento de infecciones comunes sean cada vez más limitados y caros o, en algunos casos, inexistentes. Por tanto, se hace imprescindible buscar alternativas, nuevos productos que puedan sustituir los antibióticos, ya sean de origen sintético o biotecnológico.

El Grupo de Química y Medicamentos de la Universidad de Granma, hoy convertido en el Centro de Estudios de Química Aplicada, tiene una larga trayectoria de investigación para la obtención de productos potencialmente bioactivos. Desde hace casi 30 años ha colaborado con el Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central de las Villas para la producción de más de 200 derivados del furfural. Algunos de ellos, como la acetamida furánica monobromada, han demostrado ser sustancias bioactivas con cierta acción antifúngica y antibacteriana (Almeida, 1994; Peña, 2001).

Otra alternativa a los antibióticos son los probióticos, coadyuvantes dietéticos de origen microbiano que benefician la fisiología del hospedador al modular la inmunidad de la mucosa y la inmunidad sistémica (Steidler, 2003;

Edens, 2003; Guarner & Malagelada, 2003, Revollo, 2006; Higgins *et al.*, 2007) y mejorar el balance nutricional y microbiano en el tracto gastrointestinal (Tannock, 1999). Su empleo en producción avícola se asocia a resultados positivos, en la mayoría de los casos, alcanzándose mejoras notables en la producción (Ramírez *et al.*, 2005; Rondón, 2013). Habitualmente, los productos probióticos empleados en avicultura contienen microorganismos recuperados del tracto gastrointestinal de aves sanas (Miroslava *et al.*, 2004) principalmente bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y levaduras como *Saccharomyces*. La gran mayoría de los trabajos indican que su empleo se asocia a una reducción de patógenos intestinales y a un incremento de diferentes indicadores bioproductivos (Corrier *et al.*, 1998).

El presente trabajo surge de la colaboración, iniciada en el marco de un proyecto financiado por la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI) con el fin de favorecer la formación de doctores en veterinaria entre el profesorado adscrito a la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Granma, en el oriente de Cuba. Dado que la avicultura en la región constituye un sector relevante y que existían sospechas clínicas relativas a la participación de bacterias del género *Salmonella* en procesos asociados a elevada morbilidad y mortalidad en pollitos, el proyecto se inició con una investigación relativa a la etiología de estos procesos. Esta etapa se llevó a cabo en las instalaciones de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Granma y del Centro de Epizootiología y Diagnóstico Veterinario de la provincia de Holguín, ambos en Cuba, con las dificultades asociadas a las limitaciones de equipamiento y de material fungible, incluidos los medios de cultivo más básicos. Dados los resultados obtenidos, se decidió iniciar el presente proyecto, con la colaboración de instituciones de Cuba y España, con el objetivo general de evaluar dos estrategias de control de las infecciones por salmonela en pollitos: la acetamida furánica monobromada y un producto probiótico de origen aviar. El apoyo de la AECI, que financió el trabajo mediante una beca durante el año

2012, permitió continuar con la línea iniciada aunque, lamentablemente, los recortes económicos impidieron la renovación de esta ayuda económica en el año 2013. El esfuerzo realizado por parte de la Universidad de Granma y por el grupo de investigación DIGESPORC de la Universidad de León durante el año 2014 permitió completar el trabajo y finalizar el presente trabajo.

El objetivo general propuesto se ha desarrollado a lo largo de tres objetivos específicos que corresponden con los tres capítulos que componen esta tesis doctoral. En primer lugar se ha valorado *in vitro* la acción antisalmonela de la acetamida furánica monobromada. En una segunda etapa se ha obtenido una colección de aislados de bacterias del ácido láctico de origen aviar y se han caracterizado algunas de sus principales propiedades probióticas, incluyendo, entre otras, la ausencia de resistencia antimicrobiana y la actividad antisalmonela. Finalmente, se ha valorado, en un modelo experimental sobre pollitos broiler desafiados con un aislado de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis, el efecto de la acetamida furánica monobromada y de una mezcla probiótica sobre la invasión de diferentes órganos y tejidos, el cuadro clínico y lesional y los principales parámetros productivos.

CAPITULO 1

Valoración *in vitro* de la actividad antibacteriana de la acetamida furánica monobromada frente a aislados de *Salmonella enterica* de origen aviar y a cepas de referencia

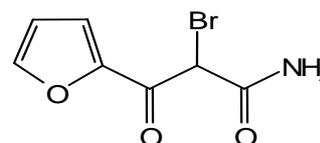
1.1.- INTRODUCCIÓN

El Grupo de Desarrollo de Medicamentos de la Universidad de Granma (Cuba) viene trabajando desde el año 1987 en el campo de los derivados furánicos con potencial actividad biológica, empleando para ello técnicas de síntesis orgánica. En estos años se han sintetizado más de 100 nuevos compuestos que han sido caracterizados empleando técnicas espectroscópicas.

De acuerdo a los resultados preliminares obtenidos por Almeida en su tesis doctoral (1994), entre los compuestos sintetizados destacan por su mayor potencialidad biológica dos acetamidas furánicas, mono y dibromada, cuyas estructuras químicas se muestran a continuación.

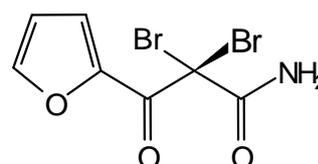
Acetamida furánica monobromada

2-bromo-2-(fur-2-yl)-acetamida



Acetamida furánica dibromada

2,2-dibromo-2-(fur-2-yl)-acetamida



Trabajos posteriores permitieron identificar otros compuestos sintetizados, derivados de las reacciones de γ -nitroacetonas furánicas, con similar potencial biológico. Igualmente, a partir de las acetamidas furánicas bromadas han sido sintetizados compuestos de estructura muy variada y con acción biológica sobre el sistema nervioso central, entre los que se destacan el 4-amino-5-benzoil-2-(2-toluidino)-3-tiofencar, el 4-amino-5-benzoil-2-(toluidino)-3-tiofencarboxilato de etilo y el 4-amino-5-benzoil-2-metiltio-3-tiofencarboxilato de metilo (Almeida, 1994).

La evaluación de la actividad biológica que presentan estos compuestos se llevó a cabo en el Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central de Las Villas (Cuba), en estrecha colaboración con el Grupo de Desarrollo de Medicamentos de la Universidad de Granma (Cuba). En una primera etapa se determinaron las predicciones teóricas de la actividad biológica, a partir de la estructura química de las moléculas sintetizadas (Keverling-Buisman, 1981; Golender & Rozenblit, 1985).

Para realizar esta predicción se compararon las fórmulas estructurales de los compuestos sintetizados con los compuestos incluidos en la base de datos del Instituto Cubano de Investigación en Derivados de Caña de Azúcar (ICIDCA). En base a los resultados obtenidos, los compuestos sintetizados presentaban un amplio y variado potencial pudiendo tener actividad como antiparasitarios, antifúngicos, antibacterianos, antiprotozoarios, hipotensores, reguladores del metabolismo, vasodilatadores coronarios, adrenolíticos, β -adrenobloqueantes, antineoplásicos e antihistamínicos. Para ello, se empleó la información de la base de datos del ICIDCA, denominada RIGA, y que incluye los resultados obtenidos con más de 300 compuestos procesados por el sistema OREX (Bermello *et al.*, 2003).

Del mismo modo, utilizando la metodología TOSS-MODE (*topological sub-structural molecular design*) se pudo predecir una importante actividad biológica de estos compuestos sintetizados como antivirales (anti-VIH), antibacterianos, antifúngicos, antidepresivos, sedativos e hipnóticos (Peña, 2001).

Teniendo en cuenta estos resultados de evaluación farmacológica preliminar que apuntaban hacia unas amplias posibilidades de aplicación tanto en medicina veterinaria como en medicina humana, se realizaron pruebas con el fin de confirmar el potencial antibacteriano y antifúngico de algunos de los compuestos caracterizados, determinándose la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la acetamida furánica monobromada y de la acetamina furánica dibromada, expresada en $\mu\text{g/mL}$, frente a tres especies bacterianas, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, y un

hongo, *Candida albicans* (Izada & Silveira, 1991). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la acetamida furánica monobromada y de la acetamida furánica dibromada frente a cepas de referencia de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*.

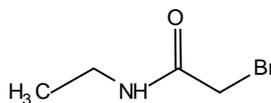
	CMI (µg/mL)			
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
Acetamida furánica monobromada	12,5	25	6,25	6,25
Acetamida furánica dibromada	100	200	50	6,25

El rango de CMI frente a las especies bacterianas valoradas para la acetamida furánica monobromada osciló entre 6,25 y 25 µg/mL mientras que para la acetamida furánica dibromada este rango fue superior, entre 50 y 200 µg/mL. En lo que respecta a la actividad fungicida, valorada frente a una cepa de referencia de *Candida albicans*, ambos productos mostraron valores de CMI de 6,25 µg /mL. Estos resultados demostraron que ambas acetamidas furánicas bromadas presentan actividad antibacteriana y antifúngica, existiendo plena correspondencia con la predicción teórica efectuada mediante el programa OREX y mediante la metodología TOSS-MODE.

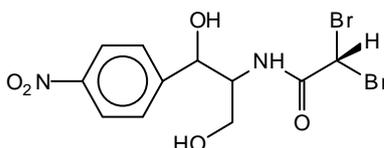
Tanto la acetamida furánica monobromada como la molécula dibromada son sustancias furánicas bioactivas que se caracterizan, a nivel molecular, por contener bromo en su cadena lateral. Los resultados de actividad biológica obtenidos contradecían publicaciones previas que señalaban que la actividad biológica de los derivados furánicos bromados está asociada con la tenencia de átomos de bromo en la posición 5 del anillo. Sin embargo, algunos trabajos han demostrado que existen sustancias furánicas bioactivas con átomos de bromo en otras posiciones. Así, otras dos moléculas, la N-etil-2-bromoacetamida y el

bromanfenicol, se han asociado con actividad fungicida (Weaver & Whaley, 1947) y antimicrobiana (Negwer, 1987).

N-etil-2-bromoacetamida



Bromanfenicol



Teniendo en cuenta que la actividad antimicrobiana era más elevada para la acetamida furánica monobromada, se determinó la pureza con la que se obtenía esta molécula en el proceso de síntesis. Para ello se aplicó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (*high performance liquid chromatography* o HPLC) observándose en el cromatograma un único pico, con un tiempo de retención de 2,447 minutos y una concentración del producto del 97,12 % lo que demuestra una alta pureza del producto sintetizado (Almeida, 1994).

El pH del compuesto obtenido fue de 4,15 y el resultado del análisis de metales pesados fue satisfactorio, no detectándose cobre, mercurio o plomo en el producto puro (Almeida, 1994). Teniendo en cuenta todos estos antecedentes se decidió ampliar el estudio de actividad antibacteriana de la acetamida furánica monobromada, enfrentando *in vitro* este compuesto con un mayor número de cepas bacterianas y de hongos aisladas de heridas en pacientes ingresados en la sala de terapia intensiva del Hospital Provincial de Santa Clara (Cuba). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la acetamida furánica monobromada frente a aislados obtenidos de heridas en individuos ingresados en el Hospital Provincial de Santa Clara, Cuba.

Microorganismos	Ref. aislados	CMI (µg/mL)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	12,5
	2	12,5
	3	12,5
	4	12,5
	5	6,25
	6	6,25
	7	12,5
	8	12,5
	9	6,25
	10	6,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	12,5
	2	12,5
	3	12,5
	4	12,5
	5	12,5
	6	25,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	50,0
	2	50,0
<i>Serratia spp.</i>	1	25,0
<i>Escherichia coli</i>	1	25,0
	2	12,5
	3	25,0
	4	12,5
	5	12,5
	6	25,0
	7	25,0
	8	25,0
	9	25,0
	10	25,0
<i>Candida albicans</i>	1	6,25
	2	6,25
	3	6,25
	4	6,25
	5	3,12
	6	3,12
<i>Acinetobacter spp.</i>	1	6,25
	2	25,0
<i>Enterobacter spp.</i>	1	12,5

Los resultados obtenidos corroboraron las determinaciones preliminares; la acetamida furánica monobromada mostró una elevada actividad frente a hongos del género *Candida* con valores de CMI entre 3,125 y 6,25 µg/mL. Frente a bacterias la actividad fue igualmente elevada, con valores de CMI de 6,25, 12,5, 25 y 50 µg/mL para el 15,6 %, 46,9 %, 31,25 % y 6,25 % de los microorganismos valorados, respectivamente. Empleando esta información se estimaron la CMI₅₀ y la CMI₉₀ o concentraciones del compuesto que inhibieron al 50 % y 90 % de los aislados, respectivamente (Izada & Silveria, 1991), comparando los resultados obtenidos con los valores reportados para otros principios activos de acción bactericida y/o fungicida (Azahares *et al.*, 1992). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3 y confirmaron que, en condiciones experimentales, la acetamida furánica monobromada tiene una actividad biológica elevada, similar a la de otros antibacterianos.

Tabla 3. CMI₅₀ y CMI₉₀ de la acetamida furánica monobromada y otros principios activos frente a algunos géneros de bacterias y hongos.

Microorganismos	Antimicrobianos	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)	Nº aislados
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Acetamida furánica	7,02	11,14	10
	G-1*	7,5	16	15
	Amikacina	107	176,7	15
	Polimixina B	78,1	162,5	15
	Gentamicina	95,8	172,4	15
	Tetraciclina	63,7	96,6	15
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Acetamida furánica	9,47	16,49	6
	G-1*	12	21,6	19
	Cefotaxima	1,3	32,2	19
<i>E. coli</i>	Acetamida furánica	15,75	25	10
	G-1*	9,3	19,6	14
	Cefotaxima	0,8	11,4	14
<i>Candida albicans</i>	Acetamida furánica	3,72	5,63	6
	G-1*	1,2	2,9	31
	Anfotericina B	1,3	5,2	31
	Miconazol	2,4	5,63	31

*G-1: derivado dibromado furánico incluido como principio activo de los medicamentos Dermofural® y Queratofural® del Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central de Las Villas (Cuba).

Cabe destacar que para el caso de *Pseudomonas aeruginosa* los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ más bajos fueron los mostrados por este compuesto.

Las investigaciones relativas a la acetamida furánica monobromada se han completado mediante estudios preliminares de toxicidad con vistas a determinar su dosis letal media (DL₅₀). Los trabajos fueron realizados por Izada & Silveira (1991), y permitieron determinar que esta DL₅₀ es de 1.879,3 mg/kg de peso vivo usando como vehículo aceite de maní por vía oral en ratones Balb/C y de 3.000 mg/kg de peso vivo utilizando como vehículo goma tragacanto por vía oral y en ratones OF-1, dosis relativamente elevadas y que permiten afirmar que la acetamida furánica monobromada es muy poco tóxica.

Finalmente, se ha estimado el coste de producción de la acetamida furánica monobromada con el fin de evaluar la factibilidad económica de su producción. El cálculo se realizó según la metodología propuesta por González (1987) para la producción en plantas químicas, por ser la que más se ajusta a la obtención de principios activos en laboratorios de producción como el utilizado en el Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central de Las Villas (Cuba). De acuerdo a esta metodología, para el cálculo total del costo preliminar de un kilogramo del producto se utilizaron las siguientes ecuaciones:

- Coste de fabricación = coste directo + coste fijo + coste indirecto.
- Gastos generales = administración + distribución y venta + investigación y desarrollo.
- Coste total = [Coste de fabricación + administración + interés bancario] x 100/86.

El cálculo se realizó a partir de la variante tecnológica menos eficiente con el fin de conocer los valores máximos y se tomando como materia prima de partida el furfural producido en Cuba. De acuerdo con el cálculo realizado, el coste de 1 kg del producto es de 1.665,28 dólares americanos (USD).

Este coste preliminar de 1 kg del 2-bromo-2-(fur-2-ol) acetamida fue comparado con el precio que tenían en 1991 en el mercado mundial algunos principios activos de acción bactericida y fungicida. Los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla 4.

Tabla 4. Coste preliminar estimado para la producción de 1 kg de acetamida furánica monobromada y de otros productos con actividad antimicrobiana.

Producto	Precio (USD)
Cefotaxima sódica	1.804,00
Azlocillin sódico	1.838,38
Ceftriaxona sódica	3.915,50
Anfotericina B	2.736,00
Acetamida furánica monobromada	1.665,28

1.2.- OBJETIVO

El objetivo del presente estudio ha sido la valoración *in vitro* de la actividad antibacteriana de la acetamida furánica monobromada frente a aislados de *Salmonella enterica* de origen aviar y a cepas de referencia.

1.3.- MATERIALES Y METODOS

1.3.1.- Obtención de aislados de *Salmonella enterica* de origen aviar

1.3.1.1.- Recogida de muestras

Para la obtención de aislados de *Salmonella enterica* de origen aviar se tomaron 50 pollitas de inicio ponedoras, línea L₃₃, de 1 día de edad, pertenecientes de la Empresa avícola de Granma (Cuba). En las aves de las granjas afectadas se observaba un cuadro clínico de enteritis, con diarreas blanquecinas, inapetencia, alas caídas, debilidad y alta mortalidad, que había llevado a un diagnóstico presuntivo de salmonelosis.

Estos animales fueron sacrificados, de acuerdo a las normas de bienestar animal, mediante dislocación cervical, y procesados en el Centro de Epizootiología y Diagnóstico Veterinario de la provincia de Holguín (Cuba).

Durante la necropsia se comprobó que las lesiones más relevantes se localizaban en el hígado, el bazo y el pulmón, los cuales mostraron aumento de tamaño y congestión, con presencia en este último de focos necróticos de color blanquecino. Además se pudo observar que los sacos vitelinos se encontraban deformados.

En cada una de las pollitas se recogieron muestras de corazón, hígado, bazo, intestino, saco vitelino y pulmón. En total se obtuvieron 300 muestras de órganos que fueron procesadas para el aislamiento e identificación de *Salmonella* spp.

1.3.1.2.- Aislamiento bacteriológico y caracterización bioquímica

La siembra inicial se realizó según la metodología descrita por Carter (1985). Se tomaron muestras de los diferentes órganos: corazón, hígado, bazo, intestino, saco vitelino y pulmón, de cada individuo en estudio, realizando una siembra en tubos de vidrio con 10 mL de caldo tetrionato como medio de enriquecimiento, mezclándose suavemente e incubándose durante 24 horas a 37°C. Como medio selectivo se utilizó el agar *Salmonella-Shigella* (agar SS), depositándose 20 µL del caldo de tetrionato tras la incubación, en placas de agar preparadas con 20 mL del medio SS y realizándose siembra en estría con

un asa bacteriológica. Este medio selectivo incorpora sales biliares y verde brillante, lo que inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas, de la mayoría de los coliformes y de *Proteus spp.* Por el contrario, *Salmonella* crece bien en el medio y da lugar a colonias transparentes, generalmente con centro de color negro a consecuencia de la producción de sulfhídrico, mientras que otros microorganismos fermentadores de la lactosa acidifican el medio y dan lugar a colonias rosadas o rojas. Las colonias identificadas como sospechosas fueron sembradas en agar triple azúcar hierro (agar TSI), un medio que permite la diferenciación de *Salmonella* al originar colonias rosas con el centro negro sobre un medio de color rojo.

Los aislados identificados preliminarmente como *Salmonella* fueron confirmados mediante pruebas bioquímicas, concretamente las pruebas de Kligler, reducción de nitratos a nitritos, indol, crecimiento en citrato, producción de ureasa, rojo metilo y Voges Proskauer. La tabla 5 muestra una breve descripción de las pruebas bioquímicas realizadas y de su interpretación.

1.3.1.3.- Confirmación serológica

Todas las colonias sospechosas de pertenecer al género *Salmonella* fueron confirmadas mediante técnicas serológicas de aglutinación. Para ello se obtuvieron cultivos puros en placas de agar hierro Kligler.

En una primera etapa se comprobó que no se tratase de colonias autoaglutinantes, para lo cual se dispensó una gota de solución salina fisiológica sobre un porta objeto y, sobre ella, una colonia recogida con un asa de siembra. Se mezcló con el asa hasta obtener una suspensión turbia homogénea, moviendo, a continuación, el portaobjeto suavemente durante 30-60 segundos. Se observó la existencia de grumos, visibles mediante lupa o con un microscopio estereoscópico. Los aislados autoaglutinantes no pudieron ser confirmados mediante reacciones serológicas de aglutinación.

Seguidamente, se procedió a la confirmación empleando un suero polivalente frente a antígenos somáticos. El procedimiento fue similar al anterior, adicionando una gota de antisuero comercial (Laboratorios Finlay) sobre las suspensiones bacterianas en un portaobjeto. La presencia de aglutinación visible permitió confirmar los aislados como pertenecientes al género *Salmonella*. Como control positivo se empleó una cepa de *Salmonella* aislada en aves de la provincia Granma (Cuba), previamente caracterizada, y como control negativo un aislado de colección de *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Los aislados identificados como *Salmonella* spp. fueron finalmente caracterizados hasta nivel de serogrupo empleando antisueros específicos frente a los serogrupos B, C, D y E de *Salmonella enterica* (Laboratorios Finlay).

Tabla 5: Pruebas bioquímicas realizadas para la confirmación de los aislados como *Salmonella* spp.

Prueba	Descripción	Interpretación
Kligler	Inoculación por picadura en el fondo del tubo y por estría en la superficie inclinada en tubos con medio Kligler. Incubación a 37°C durante 24 horas.	Color amarillo (parte inferior del tubo): fermentación de la glucosa. Color amarillo (todo el tubo): fermentación de la lactosa. Color negro (parte inferior del tubo): producción de SH ₂ .
Reducción de nitratos a nitritos	Inoculación de un tubo con caldo nitratos. Incubación a 37°C durante 48 horas. Añadir éter sulfúrico (1mL) agitar vigorosamente. Añadir una gota de α-naftilamina (0,5 %) y una gota de solución de ácido sulfamínico (0,8 %).	Color rojo intenso: reacción positiva. Color amarillo: reacción negativa.
Indol	Inoculación de un tubo con caldo triptonado. Incubación a 37°C durante 24-48 horas. Añadir 1 mL de reactivo de Ehrlich.	Anillo de color rojo en la interfase entre el reactivo y el cultivo: reacción positiva.
Utilización del citrato	Inoculación de un tubo inclinado con ágar Citrato de Simons. Incubar a 37°C durante 24-48 horas.	Viraje de color verde a azul en el tubo: reacción positiva.
Producción de ureasa	Inoculación de un tubo inclinado con ágar urea Christensen. Incubar a 37°C durante 24 horas.	Color fucsia: reacción positiva.
Rojo metilo	Inoculación de un tubo con caldo Voges-Proskauer. Incubar a 37°C durante 24-48 horas. Añadir a 2 mL del cultivo, 5 gotas de solución de rojo metilo y agitar suavemente.	Color rojo estable: reacción positiva.
Voges-Proskauer	Inoculación de un tubo con caldo Voges-Proskauer. Incubar incubando a 37°C durante 24-48 horas. Añadir a 1 mL del cultivo 0,5 mL de α-daftol (5 %) y 4 gotas de KOH (40 %).	Color rosado: reacción positiva.

1.3.2.- Determinación de la sensibilidad antimicrobiana frente a la acetamida furánica monobromada

1.3.2.1.- Método de macrodilución en tubo

Para la determinación de la sensibilidad a la acetamida furánica monobromada de los aislados de *Salmonella enterica* se empleó la técnica de macrodilución en tubo. Según CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2004). Esta determinación se llevó a cabo en el Laboratorio del Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad de las Villas (Cuba).

La acetamida furánica monobromada se obtuvo mediante la metodología descrita por Almeida (1994), en el Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad de las Villas (Cuba), con un grado de pureza del 97 %. Se preparó una solución madre con una concentración de 800 µg/mL en dimetilsulfóxido (DMSO). Partiendo de esta solución madre, se prepararon diluciones dobles seriadas, desde la 1/2 a la 1/512, en solución salina isotónica y en tubos de vidrio estériles con un volumen de 0,5 mL. Se realizaron tres réplicas de cada una de las diluciones.

Se emplearon 4 aislados de *Salmonella enterica* de los serogrupos B, C, D y E, procedentes de aislados aviares obtenidos anteriormente. Como cepa de referencia se empleó una cepa de *E. coli* (ATCC 225922). Para cada uno de ellos, se realizó una siembra en placas con medio TSA y se incubaron durante 24 horas a 37°C, siendo resuspendidas de 3 a 5 colonias en 5 mL de solución salina isotónica hasta alcanzar una turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de McFarland. Para cada aislado, se resuspendieron 0,01 mL de esta suspensión en 9,99 mL de solución salina isotónica.

Cada uno de los tubos anteriormente preparados con la acetamida furánica monobromada (tres réplicas por concentración valorada) fueron inoculados con 0,5 mL de la suspensión bacteriana. Las concentraciones de acetamina furánica monobromada fueron de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562 y 0,781 µg/mL. Los tubos se incubaron durante 24 horas a 37°C y en agitación. Para cada aislado valorado se incluyó un control positivo (0,5 mL

de solución salina isotónica + 0,5 mL de suspensión bacteriana) y un control negativo (1 mL de solución salina isotónica).

Tras la incubación se comprobó la ausencia de crecimiento bacteriano en el control negativo así como la pureza del cultivo, mediante la observación al microscopio y el subcultivo en placas de agar TSA de alícuotas del control positivo.

1.3.2.2.- Método de microdilución en placa

Para la determinación de la sensibilidad a la acetamida furánica monobromada de una selección de aislados de *Salmonella enterica* de origen aviar procedentes de Cuba y de cepas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECC) se utilizó la técnica de microdilución en placas de cultivo celular de 48 pocillos, en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León (España).

La acetamida furánica monobromada fue obtenida mediante la metodología descrita por Almeida (1994), en el CBQ de la Universidad Central de las Villas (Cuba), con un grado de pureza del 97 % resuspendiéndose en DMSO a una concentración de 800 µg/mL. Partiendo de esta solución madre, se prepararon diluciones dobles seriadas desde la 1/2 a la 1/256 en caldo Isolesensitest (OXOID, Inglaterra) y en tubos de vidrio estériles.

Se emplearon un total de 12 cepas: 6 aislados de *Salmonella enterica* del serogrupo D, de origen aviar y procedentes de Cuba y 6 cepas de *Salmonella enterica* procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT): CECT 700 (*Salmonella enterica* subsp. *enterica*), CECT 4594 (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium), CECT 4300 (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis), CECT 915 (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Cholerasuis), CECT 883 (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium) y CECT 443 (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium). Todos ellos fueron sembrados en placas de agar TSA (Merck) que se incubaron a 37°C durante 24 horas. Empleando un asa de siembra bacteriológica, se realizó una

suspensión, para cada uno de los aislados, en 2 mL de caldo Isosensitest hasta alcanzar una turbidez equivalente al patrón 0,5 de la escala de McFarland. A continuación, se realizó una dilución 1/500 (10 µL en 5 mL) para obtener una suspensión bacteriana con una concentración aproximada de $1-2 \times 10^5$ bacterias por mL. La concentración exacta de bacterias en cada una de estas suspensiones se estimó empleando una cámara de Neubauer para el recuento bacteriano.

El volumen total empleado en cada uno de los pocillos fue de 1 mL, de los cuales 500 µL correspondieron al inóculo bacteriano y 500 µL a la dilución de acetamida furánica bromada. Así pues, para cada aislado se valoró el efecto de las siguientes concentraciones de acetamida furánica monobromada: 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 y 1,562 µg/mL. En cada placa se incluyeron 4 controles positivos y cuatro negativos, uno para cada cepa. En los controles positivos se dispensaron 500 µL de inóculo bacteriano + 500 µL de caldo Isosensitest, mientras que los controles negativos se dispensaron 1000 µL de caldo Isosensitest. Todos los procedimientos de preparación de las placas se llevaron a cabo en cabina de flujo laminar. Inmediatamente, al terminar su preparación, las placas fueron incubadas a 37°C, en agitación durante 24 horas.

Tras la incubación se comprobó la ausencia de crecimiento bacteriano en el control negativo así como la pureza del inóculo mediante la observación al microscopio y el subcultivo en placas de TSA agar de alícuotas del control positivo.

1.3.3.- Análisis estadístico

Para la comparación de la proporción de resultados positivos proporcionados por cada uno de los órganos se empleó la prueba de χ^2 ($p < 0.05$). Este análisis se llevó a cabo con el programa EpiInfo para Windows versión 7.0 (CDC, Atlanta, EEUU).

1.4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Salmonella está considerada en Cuba como la tercera causa más frecuente de gastroenteritis en adultos y en niños, después de los rotavirus y de *Entamoeba histolytica* (Estévez *et al.*, 1993; Cabrera *et al.*, 1998). En el caso concreto de los brotes de toxiinfección de origen alimentario podemos destacar que durante el año 2006 se notificaron en la isla 471 brotes de toxiinfecciones provocadas por alimentos.

Aunque algunos estudios señalan a *Staphylococcus aureus* como la especie más prevalente en estas toxiinfecciones (Grillo *et al.*, 1996; Rivero *et al.*, 2006), otros informes apuntan a *Salmonella enterica* como el principal agente etiológico (Barreto Argilagos *et al.*, 2010).

A nivel mundial, la bacteria aislada con mayor frecuencia en los brotes de toxiinfección alimentaria es *Salmonella enterica*. De forma global, se estima que cada año ocurren un total de 93,8 millones de casos de salmonelosis, mientras que el número de muertes estimadas por *Salmonella* es de 155.000 (Majowicz *et al.*, 2010).

En la Unión Europea y a pesar de los grandes esfuerzos realizados para su control en la última década, *Salmonella* es el segundo patógeno más frecuentemente involucrado en toxiinfecciones alimentarias, solo superado por *Campylobacter*, y se mantiene como principal causa de los brotes de toxiinfección alimentaria, de acuerdo a los datos publicados por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en los últimos informes correspondientes a los años 2010, 2011 y 2012 (EFSA, 2012; 2013; 2014).

De forma similar, en EEUU el impacto de las enfermedades de transmisión alimentaria es muy significativo, con valores de incidencia anual próximos al 13 % del total de la población. Entre los principales patógenos identificados como responsables de estos brotes se encuentran: *Salmonella enterica*, *Campylobacter* y *Shigella*. Al igual que en el entorno europeo, las medidas tomadas por las autoridades sanitarias se han asociado a un progreso importante en cuanto a la reducción de su incidencia aunque las toxiinfecciones alimentarias continúan siendo un importante problema de salud pública

(Brackett, 2008).

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto, podemos concluir que tanto en países desarrollados como en regiones en vías de desarrollo, las infecciones por *Salmonella enterica* son causa importante de brotes de gastroenteritis aguda con gran impacto en la población (Cabrera *et al.*, 2004). Los alimentos de origen animal, particularmente la carne de ave, los huevos y la carne de cerdo, son las principales fuentes de infección tanto por el consumo directo de productos insuficientemente cocinados como a través de contaminaciones cruzadas que ocurren durante la manipulación y preparación de los alimentos.

1.4.1.- Obtención de aislados de *Salmonella enterica* de origen aviar

Se detectó la presencia de colonias sospechosas de pertenecer al género *Salmonella* el 87,3 % de los cultivos obtenidos en agar SS (262 cultivos positivos de un total de 300 muestras de órganos) a partir de las muestras recogidas en 50 pollitas de 1 día de edad procedentes de la empresa avícola de Granma (Cuba). Las pruebas bioquímicas confirmaron la presencia de *Salmonella enterica* en el 100 % de las muestras sospechosas. Los resultados obtenidos en estas pruebas se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Resultados proporcionados por las pruebas de caracterización bioquímica.

Prueba	Lectura
Kligler	Producción de SH ₂ (color negro en la parte inferior del tubo).
Reducción de nitratos a nitritos	Reacción negativa.
Indol	Reacción negativa.
Utilización del citrato	Reacción positiva (viraje a color azul).
Producción de ureasa	Reacción negativa.
Rojo metilo	Reacción positiva (color rojo estable).
Voges-Proskauer	Reacción negativa.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio en función de la muestra empleada para el aislamiento se muestran en la Tabla 7. El porcentaje de muestras positivas varió entre el 74 %, determinado para las muestras de corazón, y el 96 % en el caso de las muestras de saco vitelino.

Tabla 7. Detección de *Salmonella enterica* en las muestras recogidas en 50 pollitas de 2 días de edad procedentes de Granma (Cuba).

Muestra	Nº total	Nº positivos	Nº negativos	%
Corazón	50	37 ^a	13 ^b	74
Hígado	50	45 ^a	5 ^b	90
Bazo	50	47 ^a	3 ^b	94
Intestino	50	40 ^a	10 ^b	80
Saco vitelino	50	48 ^a	2 ^b	96
Pulmón	50	45 ^a	5 ^b	90
Total	300	262 ^a	38 ^b	87,3

Valores con letras distintas presentan diferencia significativa ($p < 0,05$)

En general, el porcentaje de aislamiento de *Salmonella* a partir de órganos obtenidos en nuestra investigación fue muy elevado, con valores superiores a los descritos por Ruiz *et al.* (2008) al determinar la prevalencia del aislamiento de *S. Enteritidis* en diferentes órganos de pollos broilers de 4 días de edad tras su inoculación experimental. En esta investigación, los valores de prevalencia más elevados fueron proporcionados por las muestras de diferentes tramos del intestino, íleon (18,1 %), ciego (13,9 %) y duodeno (11,1 %), mientras que la proporción de muestras positivas fue inferior en otros órganos, tanto del aparato digestivo (4,2 % de muestras positivas en el buche) como en el corazón o en el pulmón (2,8 %).

El análisis estadístico demostró la existencia de diferencias significativas en la proporción de muestras positivas detectadas en diferentes órganos. Así, el aislamiento a partir de muestras de corazón fue menos frecuente que a partir de muestras de saco vitelino ($\text{Chi}^2= 9,49$, $p= 0,002$), de bazo ($\text{Chi}^2= 7,43$, $p= 0,006$), de pulmón ($\text{Chi}^2= 4,33$, $p= 0,037$) o de hígado ($\text{Chi}^2= 4,33$, $p= 0,037$). Por su parte, el aislamiento a partir de muestras de intestino fue igualmente menos frecuente que el aislamiento a partir de muestras de saco vitelino ($\text{Chi}^2= 6,06$, $p= 0,014$), o de bazo ($\text{Chi}^2= 4,33$, $p= 0,037$).

Aunque el saco vitelino fue el órgano donde se detectó con mayor frecuencia la presencia de *Salmonella*, la proporción de resultados positivos que proporcionó no varió de forma significativa respecto a la obtenida con muestras de bazo, pulmón o hígado.

Clásicamente se ha identificado al tracto digestivo como el órgano diana donde *Salmonella* se multiplica en las primeras etapas de la infección. Sin embargo, hoy en día conocemos que las infecciones a través de otras vías como la respiratoria son muy frecuentes (Poppe, 2000; Lutful Kabir, 2010). De hecho, se ha comprobado que las aves son más receptivas a la infección por la vía inhalatoria o por vías de inoculación parenteral que por la vía oral (Poppe, 2000). Tras la multiplicación en el punto de entrada, *Salmonella* se distribuye a diferentes órganos y tejidos a través de los macrófagos. Se ha demostrado que los genes de la isla de patogenicidad 2 (SPI-2), que están implicados en la

prevención de la maduración de los fagolisosomas en los macrófagos, son fundamentales en la aparición de infecciones sistémicas tanto por *S. Typhimurium* como por *S. Gallinarum* (Barrow *et al.*, 2011).

En concordancia con los resultados obtenidos por nosotros, se ha descrito que los órganos internos con mayor concentración de células del sistema retículo endotelial, como el bazo o el hígado, son colonizados de forma más rápida e intensa. Por otra parte, la colonización del intestino fue significativamente inferior. Este hecho es característico de las infecciones sistémicas por salmonelas de serotipos inmóviles como los biovars *Gallinarum* y *Pullorum*, que colonizan menos eficientemente el tracto digestivo en comparación con los aislados que expresan de forma normal sus flagelos y que, consecuentemente, están dotadas de movilidad (Barrow & Freitas Nieto, 2011).

En lo que respecta a la caracterización serológica de los aislados, podemos destacar que ninguno mostró autoaglutinación. La aglutinación con un suero polivalente permitió confirmar de forma definitiva todos los aislados como *Salmonella enterica*. Finalmente, el empleo de antisueros específicos demostró que el serogrupo D era el identificado más frecuentemente (61,24 % de los aislados), seguido en orden descendente por el serogrupo E (19,3 %), el serogrupo C (11,33 %) y finalmente el serogrupo B (8,13 %) (Tabla 8).

Tabla 8. Caracterización serológica de los aislados de *Salmonella enterica* obtenidos a partir de las muestras recogidas de 50 pollitas de 2 días de edad procedentes de Granma (Cuba).

Suero	%
Polivalente	100
Grupo B	8,13
Grupo C	11,33
Grupo D	61,24
Grupo E	19,3

Las gallinas pueden ser infectadas por una gran variedad de serotipos de *Salmonella* y esta variedad se traduce en dos aspectos bien diferenciados. Por una parte, las infecciones por bacterias del género *Salmonella* son causa de enfermedad clínica en estos animales mientras que, por otra, las aves y sus productos derivados son fuente de infección en los brotes de toxiinfección alimentaria en el hombre (Poppe, 2000; Luful Kabir, 2010; Barrow & Freitas, 2011; Barrow *et al.*, 2011).

Entre esta amplia variedad de serotipos podemos distinguir aquellos particularmente adaptados al hospedador aviar, concretamente los dos biovares del serotipo Gallinarum, que causan enfermedades específicas, tifosis (biovar Gallinarum) y pullorosis (biovar Pullorum) y de importancia económica en países en vías de desarrollo como Cuba. Estos biovares específicos están muy raramente vinculados a casos de infección en el hombre. Por el contrario, existe un segundo grupo, mucho más numeroso, de serotipos de *Salmonella* no adaptados específicamente al hospedador aviar que son capaces de infectar a pollos y gallinas dando lugar, generalmente, a infecciones limitadas al tracto gastrointestinal. Estas infecciones localizadas, con frecuencia, no se asocian a un cuadro clínico evidente pero son igualmente de gran relevancia puesto que pueden alcanzar la cadena alimentaria y son una muy importante causa de brotes de toxiinfección alimentaria en el hombre. Un caso particular entre estos serotipos no adaptados específicamente al hospedador aviar lo constituyen los serotipos Typhimurium y Enteritidis por encontrarse entre los más frecuentemente identificados en aves y por causar infecciones sistémicas con diferentes manifestaciones clínicas, principalmente anorexia y diarrea, que pueden provocar la muerte en una cierta proporción de los individuos.

En la mayoría de los países con una producción avícola desarrollada y especializada, la tifosis y la pullorosis han sido controladas y erradicadas, gracias al empleo de vacunas o de estrategias basadas en la identificación de aves infectadas y su sacrificio (Poppe, 2000; Barrow *et al.*, 2011). Sin embargo, su impacto continúa siendo notable en países en desarrollo, afectando tanto a la avicultura industrial como a las explotaciones más familiares.

Los resultados obtenidos en el muestreo realizado en pollitas de un día de edad de la empresa avícola de Granma (Cuba) demuestra la elevada frecuencia del aislamiento de bacterias del género *Salmonella* y corrobora las sospechas clínicas de salmonelosis aviar en estos animales. En la práctica totalidad de los animales muestreados se demostró la existencia de una infección sistémica por *Salmonella enterica*. Sin embargo y a consecuencia de limitaciones asociadas a la disponibilidad de equipos y reactivos en las instalaciones del Centro de Epizootiología y Diagnóstico Veterinario de la provincia de Holguín (Cuba) no ha sido posible concretar los serotipos implicados en la infección. La determinación de los serogrupos permitió demostrar una amplia variedad, con cuatro grupos identificados, a pesar de la corta edad de los pollitos muestreados.

En este sentido, podemos indicar que el aislamiento de *Salmonella enterica* en pollitas de un día de edad puede estar vinculado a una transmisión vertical, asociada a la infección del ovario y/o oviducto, y que se ha demostrado para los dos biovars de *S. Gallinarum* así como para *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg* y *S. Menston* (Poppe, 2000) así como a una transmisión horizontal que puede ocurrir en diferentes momentos. Se ha descrito que las bacterias del género *Salmonella* son capaces de atravesar la cáscara a través de pequeñas roturas o soluciones de continuidad en la misma o incluso la cáscara íntegra si la contaminación ocurre antes de que se establezca en la superficie de la misma la barrera cuticular (Poppe, 2000). Igualmente, la contaminación puede ocurrir durante la eclosión (Cason *et al.*, 2004) o en los momentos inmediatamente posteriores a ésta.

El serogrupo más frecuentemente identificado fue el serogrupo D en el que se incluyen los biovars *Gallinarum* y *Pullorum* del serotipo *Gallinarum* así como el serotipo *Enteritidis*. Aunque los signos clínicos presentes en las explotaciones afectadas así como las lesiones observadas parecen más compatibles con una infección por *S. Gallinarum* biovar *Pullorum* no se puede excluir la posibilidad de que otros serotipos del serogrupo D estén igualmente incluidos. Igualmente cabe destacar que el serogrupo B, en el que se engloban,

entre otros muchos, los aislados de *S. Typhimurium* ocupó el tercer lugar en importancia relativa.

1.4.2.- Determinación de la sensibilidad antimicrobiana frente a la acetamida furánica monobromada

Un problema adicional asociado a las infecciones por *Salmonella enterica* es el de la resistencia antimicrobiana. En muchos países se ha observado una alta proporción de aislados de *Salmonella* con resistencia múltiple a los antibióticos, hecho que se ha asociado al inadecuado uso de antibióticos en medicina humana así como en medicina veterinaria y en producción animal (Breuil *et al.*, 2000; Acha & Szyfres, 2001; Cruchaga *et al.*, 2001; Butaye *et al.*, 2003; Casewell *et al.*, 2004; Philips *et al.*, 2004; Shea, 2004; WHO, 2006). Esta resistencia a antimicrobianos es un problema cada día más importante, tanto desde la perspectiva de la salud humana como para la salud animal. Diversos trabajos han demostrado que la resistencia a diferentes grupos de antibióticos como los aminoglucósidos, las tetraciclinas, los β -lactámicos como la ampicilina, las quinolonas como la flumequina, las sulfamidas y sulfamidas potenciadas o, incluso, las cefalosporinas son muy frecuentes entre los aislados de *Salmonella enterica* de origen aviar. Más aún, la mayoría de los trabajos concluyen que estas resistencias muestran una clara tendencia hacia su incremento progresivo (John *et al.*, 2006). Particularmente preocupantes son las resistencias que se describen a los antibióticos empleados en el tratamiento de los casos complicados de salmonelosis en el hombre, como la ciprofloxacina y otras moléculas del grupo de las fluoroquinolonas o las cefalosporinas de espectro ampliado.

En el caso concreto de Cuba existen estudios que han reportado un alto porcentaje de resistencia de los aislados de *Salmonella enterica* a algunos antimicrobianos de uso más habitual como la ampicilina, el cloranfenicol, el ácido nalidíxico o la combinación de trimetopin y sulfametoxazol (Llop, 2002) y es por ello que la búsqueda de nuevas herramientas para el control de las infecciones por bacterias del género *Salmonella* es de gran interés.

Recientemente, Puig *et al.* (2011) caracterizaron el serotipo y la resistencia antimicrobiana de 178 cepas de *Salmonella enterica* aisladas de alimentos en diferentes regiones de Cuba entre enero de 2008 y diciembre de 2009. Se identificaron 20 serovariedades diferentes entre las que predominaron *S. Enteritidis* (23 %), *S. Agona* (13,5 %) y *S. London* (11,2 %) y se determinó el perfil de resistencia en 100 aislados, comprobándose que el 75 % de las cepas fueron resistentes al menos a uno de los antibióticos probados. La resistencia más frecuente fue para la tetraciclina (70,7 %) seguida de la ampicilina (22,7 %) y del ácido nalidíxico (14,7 %), corroborándose 10 patrones de resistencia diferentes. Aunque predominaron las cepas resistentes a un único antimicrobiano (89,3 %), se detectaron aislados multirresistentes de los serotipos *Infantis*, *Derby* y *Enteritidis* y cabe destacar la existencia de resistencias al ácido nalidíxico y a la ciprofloxacina entre los aislados de *S. Enteritidis* lo que permitió reflexionar acerca de la necesidad de extremar la vigilancia sanitaria en el país en lo que respecta a la emergencia de aislados resistentes o multirresistentes.

No existe ningún estudio previo relativo a la resistencia antimicrobiana en aislados de *Salmonella enterica* de origen aviar en Cuba. Un estudio reciente realizado en Colombia sobre 20 aislados aviares del serogrupo D, incluyendo cepas móviles e inmóviles, demostró la existencia de resistencia a 17 antimicrobianos empleados de forma habitual en avicultura comercial. Las proporciones de resistencia variaron entre el 22 % y el 44 % lo que permitió valorar la necesidad de utilizar de forma muy adecuada los productos antimicrobianos disponibles con el fin de minimizar la progresión de las cepas multirresistentes (Mantilla & Pulido, 2010).

De forma general, la resistencia y multirresistencia antimicrobiana en *Salmonella* se han vinculado a plásmidos, trasposones y a un integrón de clase 1, donde se localizan los genes de resistencia (Guerra *et al.*, 2000; Roe *et al.*, 2003; Hall, 2010). Diversos trabajos han permitido demostrar que la diseminación de la resistencia es consecuencia tanto de la diseminación de clones bacterianos resistentes como de la diseminación de los elementos

genéticos transferibles que incluyen estos genes de resistencia (Severino & Magalhaes, 2004).

En la presente investigación se ha valorado la posible utilidad anti-salmonella de la acetamida furánica monobromada. En una primera etapa se llevó a cabo la determinación de la CMI de este compuesto utilizando la técnica de macrodilución en tubo y sobre un total de 4 aislados de *Salmonella enterica* de los sergrupos B, C, D y E. Posteriormente, se determinó la CMI para un total de 12 aislados, 6 aislados de campo de origen aviar y 6 cepas de la Colección Española de Cultivo Tipo (CECT) empleando, en este caso, una técnicas de microdilución en placa.

La Figura 1 muestra una microplaca de una valoración de la actividad de la acetamida furánica monobromada frente a un aislado de *Salmonella*. Los resultados obtenidos para el total de aislados evaluados se muestran en la Tabla 9 y demuestran la existencia de una potente actividad antibacteriana, en concordancia con los resultados obtenidos previamente para este mismo compuesto frente a otros microorganismos (Almeida, 1994).



Figura 1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la acetamida furánica monobromada mediante la prueba de microdilución en placa.

Tabla 9. Sensibilidad antimicrobiana frente a la acetamida furánica monobromada en aislados de *Salmonella enterica* de origen aviar y cepas de referencia

Método de macrodilución en tubo	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Salmonella enterica</i> serogrupo B	25
<i>Salmonella enterica</i> serogrupo C	25
<i>Salmonella enterica</i> serogrupo D	12,5
<i>Salmonella enterica</i> serogrupo E	25
<i>E. coli</i> ATCC 225922	12,5
Método de microdilución en placa	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Salmonella enterica</i> (de origen aviar)	50
<i>Salmonella enterica</i> (de origen aviar)	25
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> CECT 700	25
<i>Salmonella</i> Typhimurium CECT4595	50
<i>Salmonella</i> Enteritidis CECT 4300	25
<i>Salmonella</i> Cholerasuis CECT 915	25
<i>Salmonella</i> Typhimurium CECT 883	25
<i>Salmonella</i> Typhimurium CECT 443	25

Los valores de CMI observados son similares o superiores a los reportados para algunos de los antibióticos de uso más habitual y nos permiten concluir que la acetamida furánica monobromada es una sustancia bioactiva con potente acción bactericida. La posibilidad de emplear esta molécula en el control de las infecciones causadas por *Salmonella enterica* en la producción avícola cubana se ve apoyada por el hecho de que la acetamida furánica monobromada es una sustancia poco tóxica (Almeida, 1994), con valores de DL₅₀ muy por encima de las concentraciones que ejercen acción antibacteriana.

Estos resultados preliminares, sin embargo, requieren de estudios *in vivo*, que permitan concluir cual es el efecto asociado a la administración por vía oral de esta molécula así como de estudios más específicos relativos a la fármaco-dinámica, distribución y disponibilidad de esta molécula tras su administración por diferentes vías, así como estudios que permitan caracterizar el mecanismo mediante el cual ejerce su actividad antimicrobiana.

CAPITULO 2

**Selección y caracterización *in vitro* de cepas de bacterias del ácido láctico
con potencial probiótico procedentes de aves**

2.1.- INTRODUCCIÓN

La intensificación de la producción avícola y la generalización del empleo de estirpes o líneas genéticas de alto rendimiento se han asociado al uso generalizado de promotores de crecimiento (Contreras, 1995; 2001), aditivos alimentarios que se incorporan en baja proporción a la formulación de los alimentos con el fin de alcanzar mayores índices de crecimiento en tiempos más cortos y, por tanto, mejorar parámetros productivos (Correa, 2002). Una consecuencia de esta intensificación son las constantes situaciones de estrés a las que se ven sometidos los animales y que favorecen el aumento de enfermedades y, por consiguiente, en ocasiones la disminución en los niveles de producción (Sissons, 1989; Ouwehand *et al.*, 1999b; Schneitz, 2005).

Para contrarrestar estos efectos se emplean diversos aditivos alimentarios y/o promotores del crecimiento en la alimentación de los animales, definidos por Hess (1997) como compuestos utilizados para mejorar el la productividad y las funciones inmunológicas en los animales. En la producción avícola se describen múltiples resultados sobre el empleo de estos aditivos que, en la mayoría de los casos, suelen ser muy satisfactorios (Paul *et al.*, 2002; Doug *et al.*, 2005; Ramírez *et al.*, 2005). Una condición requerida para el empleo de dichos aditivos es que cumplan los requisitos primarios de elevar la eficiencia productiva sin provocar la aparición de residuos en los productos finales (Brozca *et al.*, 2000; Nava & Dávila, 2004).

Sin duda, los aditivos más utilizados tradicionalmente como promotores del crecimiento han sido los antibióticos aunque, en la actualidad, su utilización está decreciendo, debido a que su uso excesivo puede conducir al desarrollo de resistencias bacterianas. Sin duda, el incremento progresivo de resistencias antimicrobianas (Maden, 2009) es la principal razón que ha justificado las limitaciones o prohibiciones del uso de antibióticos en algunas regiones (Forrest *et al.*, 1975; Froning & Uijttenboogaart, 1999). Los antibióticos como aditivos en las dietas se han empleado desde hace muchos años para aumentar la productividad animal, fundamentalmente al promover el

crecimiento, aunque existen otros efectos como el aumento de la eficiencia en el proceso de transformación, así como la reducción de la mortalidad y morbilidad debidas a la presencia de enfermedades. Dentro de los antimicrobianos más empleados como promotores de crecimiento en producción animal se incluyen aquellos que actúan sobre bacterias Gram positivas existentes en el tracto digestivo, como la bacitracina, clortetraciclina, penicilina, virginamicina o la flavomicina, entre otros (Cuca, 1990).

Ya en la década de los 70 comenzaron a surgir las primeras alarmas que relacionaban el consumo de antibióticos como promotores de crecimiento en producción animal con el incremento de la resistencia en numerosos microorganismos (Anom, 1969). Consecuentemente, en la UE (en aquel entonces CEE) se publicó la Directiva 70/254/ECC de 23 de noviembre de 1970 sobre los aditivos en la alimentación animal. Se limitó el número de antibióticos que podían ser empleados con ese fin, restringiéndolo a aquellos con un efecto demostrado sobre el crecimiento animal, activos frente a bacterias Gram positivas y que no fueran absorbidos a nivel intestinal con el fin de evitar la presencia de residuos en la carne. Se prohibió el empleo como promotores de crecimiento de antibióticos que fueran utilizados en medicina humana o animal como las tetraciclinas o los β -lactámicos en todo el entorno de la UE (Jiraphocakul *et al.*, 1990).

De forma progresiva, diferentes Directivas europeas han ido modificando la lista de antibióticos que podían ser empleados como promotores de crecimiento. En la década de los 90 se comprobó que existía, en diversos países europeos, una proporción importante de cepas de *Enterococcus* con elevado nivel de resistencia a la vancomicina en los aislados recuperados de muestras de alimentos, de aguas residuales o de heces de humanos y/o animales sanos. Sin embargo, la resistencia a vancomicina en los aislados recuperados a partir de muestras clínicas era muy inferior. Teniendo en cuenta que la vancomicina era, en ocasiones, la única alternativa para el tratamiento de las infecciones graves por enterococos multirresistentes, la aparición de esta resistencia podía constituir un importante problema de salud pública. Diversos estudios relacionaron esta resistencia con el empleo de avoparcina

como promotor del crecimiento en explotaciones animales europeas dado que ambas moléculas presentan estructura similar, un mismo mecanismo de acción y resistencias cruzadas.

Consecuentemente, en abril de 1997 se prohibió de forma cautelar el empleo de la avoparcina como promotor del crecimiento animal en todos los países miembros de la UE. Dos años más tarde, en 1999, se prohibió, adicionalmente, el empleo de la espiramicina, tilosina, virginiamicina y bacitracina. En el año 2003 se impusieron mayores restricciones (Reglamento CE 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003), indicándose que los promotores de crecimiento debían ser inócuos para los animales de destino, para los usuarios y para los consumidores, con especial referencia a la posibilidad de generación y transmisión de resistencias a antibióticos y a la potencial producción de metabolitos tóxicos, manteniéndose autorizados únicamente cuatro antibióticos como promotores de crecimiento (avilamicina, flavofosfolipol, monensina sódica y salinomicina). Finalmente, desde enero del año 2006, el uso de antibióticos como promotores de crecimiento en producción animal está prohibido en la UE.

Esta nueva situación ha estimulado la investigación relativa a nuevas sustancias, con la misma finalidad que los antibióticos pero sin sus efectos secundarios. En este sentido, los aditivos probióticos son una de las propuestas más prometedoras, habiéndose señalado que pueden favorecer el establecimiento de una microflora beneficiosa en los animales y la disminución paulatina de la microbiota potencialmente enteropatógena (Urrutia, 1997; Paul *et al.*, 2002).

El término probiótico surgió inicialmente para identificar aquellas sustancias con actividad beneficiosa sobre la microbiota o promotores de la misma, en contraposición al término antibiótico cuya actividad es la de inhibición de determinados microorganismos. Sin embargo, esta definición etimológica no es totalmente correcta; los propios antibióticos gozan de una duplicidad antagónica combinando una acción probiótica y antibiótica, según la especie bacteriana considerada. Según Kralik *et al.* (2004), los probióticos son aditivos alimentarios de origen biológico, constituidos por microorganismos

vivos o muertos de diferentes especies de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* y *Saccharomyces*. Sin embargo, hoy en día, la mayoría de los autores no incluyen los microorganismos muertos dentro del concepto de probióticos. En este sentido, una de las definiciones más aceptadas es la propuesta por la FAO que indica que los probióticos son aquellos microorganismos vivos que cuando son administrados en un número adecuado confieren al hospedador beneficios para su salud (FAO/WHO, 2002). Los probióticos se caracterizan por ser productos naturales y económicos, que no dejan residuos en los productos finales, que fortalecen el sistema inmune y que mejoran la productividad animal (Hess, 1997; Arias, 2000; Piad *et al.*, 2005).

La fundamentación del uso de probióticos se remonta a principios de siglo, con los estudios de Metchnikoff (1908) quien describió que la ingestión de bacterias podía tener efectos beneficiosos en la flora intestinal, atribuyendo éstos, principalmente, a las de tipo ácido láctico presentes en el yogurt.

Desde un punto de vista funcional, Lyons (1997) definió los probióticos como productos naturales que, al ser utilizados como promotores del crecimiento en los animales, permiten obtener mayores rendimientos, mayor resistencia inmunológica, una reducción de los microorganismos patógenos en el tracto gastrointestinal (TGI) y una menor presencia de residuos de antibióticos u otras sustancias de carácter análogo en los productos finales.

Otras definiciones recientes indican que bajo el concepto de probiótico se incluyen aquellos productos que contienen microorganismos viables y en número suficiente para alterar la microbiota, mediante su implantación o colonización, mejorando el comportamiento del huésped y provocando efectos beneficiosos (Jadamus *et al.*, 2001; Casula & Cutting, 2002). Esta definición hace énfasis en la presencia de microorganismos viables en número suficiente para inducir efectos beneficiosos en la salud, mediante la alteración positiva de la microbiota a través de la colonización del intestino.

Es importante señalar que las denominadas mezclas de exclusión competitiva (EC) o mezclas no bien definidas de microorganismos con

capacidad probiótica deben distinguirse claramente de los probióticos que siempre deben ser preparaciones de uno o unos pocos microorganismos bien establecidos y definidos. Estas mezclas de EC excluyen selectivamente géneros específicos de microorganismos que colonizan el tracto digestivo y provocan enfermedades (Blankenship *et al.*, 1993; Gusils *et al.*, 1999; Laurencio *et al.*, 2002).

Las mezclas de EC constituyen una perspectiva con muy buenos resultados como promotores de crecimiento para aves. En la actualidad se aplican diversos productos de EC en avicultura como AVIFREE[®] (Alltech) (cultivo de exclusión competitiva único fabricado a partir de bacterias intestinales liofilizadas), BROILACT[®] (Ilender), AVIGUARD[®] (Bayer) o PREEMPT[®] CF3 que han demostrado una alta eficacia como probióticos, tanto desde el punto de vista de su contribución a la reducción de patógenos intestinales, como en la mejora de los indicadores productivos en las aves de cría (Corrier *et al.*, 1998).

En Cuba, Samaniego *et al.* (2004) evaluaron la actividad probiótica de una mezcla de EC que contenía bacterias del ácido láctico (BAL) y *Bacillus* spp., elaborada por Laurencio *et al.* (2002), comprobando que el producto mejoraba el balance microbiano en el ciego de las aves así como los indicadores productivos (ganancia de peso, conversión y viabilidad). Sin embargo, la baja estabilidad de esta mezcla de EC fue un problema cuando se presentó en formulaciones con alto contenido de humedad (Mulder, 1996). Su estabilidad en el tiempo fue muy limitada, con una disminución del conteo de BAL al cabo de 6 semanas y de *Bacillus* a las 7 (Laurencio *et al.*, 2002), indicando que eran necesarias nuevas formas de presentación, como liofilizado o secado en spray para mejorar la estabilidad del producto.

Murry *et al.* (2004) demostraron una inhibición en el crecimiento de *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium y *Clostridium perfringens* en pollos broiler cuando se añadió al alimento una mezcla de *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus plantarum*. Estos autores comprobaron que *L. salivarius* y *L. plantarum* fermentan carbohidratos produciendo ácido láctico, acético y

propiónico, provocando una disminución del pH en el intestino de las aves, lo que inhibe el crecimiento de *E. coli*, *S. Typhimurium* y *Cl. perfringens*.

Otros autores han demostrado efectos probióticos favorables de mezclas de EC en pollos broiler (Chaveerach *et al.*, 2004; Schneitz, 2005), destacando el efecto inhibitorio frente a enteropatógenos como *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *Listeria sp.* y *Salmonella Typhimurium*, entre otros, así como la mejora en los principales indicadores productivos en las aves tratadas.

Los azúcares y otros compuestos que no son digeridos por los animales pero que si lo son por la microflora intestinal y que, al igual que los probióticos, son beneficiosos para el hospedador son conocidos como prebióticos (Walker & Duffy), 1998; Steer *et al.*, 2000). Su principal acción es estimular el crecimiento y/o activar el metabolismo de algún grupo de bacterias beneficiosas presentes en la microbiota intestinal e incluyen fructooligosacáridos, manosaoligosacáridos, galactooligosacáridos o la inulina entre otros (Zopf & Roth, 1996; Collins & Gibson, 1999).

La combinación de pre y probióticos en un mismo producto da lugar a los denominados simbióticos. Por regla general, los simbióticos incluyen un componente prebiótico que favorece la multiplicación del probiótico o probióticos asociados. El término simbiótico también se aplica a la administración conjunta de un producto de EC o de probióticos junto a algún tipo de prebiótico (Collins & Gibson, 1999; Schrezenmeir & De Vrese, 2001) con el fin de que ambos tengan un efecto sinérgico, pudiendo el prebiótico aportar un sustrato específico para la fermentación del probiótico. Para Bengmark (2001) el término simbiótico es algo más restrictivo y solo debe aplicarse al producto surgido tras un proceso de fermentación del prebiótico por parte de las bacterias probióticas pero ésta solo es posible si la elección de los pre y probióticos es la adecuada. Ejemplos de simbióticos son las combinaciones de fructooligosacáridos y bifidobacterias o lactitol y lactobacilos (Collins & Gibson, 1999). En el caso concreto de la producción avícola, se ha comprobado que la combinación de fructooligosacáridos con mezclas de EC reduce la colonización por salmonelas (Bailey *et al.*, 1991).

Los beneficios asociados al empleo de probióticos pueden clasificarse en nutricionales o sanitarios. Entre los beneficios nutricionales destacan la reducción de las reacciones de producción de metabolitos tóxicos, la estimulación de determinadas rutas enzimáticas, la producción de vitaminas y sustancias antimicrobianas, mientras que entre los beneficios sanitarios destacan el incremento de la resistencia a la colonización por patógenos y la estimulación de la respuesta inmune (Guillot, 2003).

Es importante tener en cuenta que las bacterias empleadas como probióticos deben poseer una serie de propiedades que garanticen su efecto en el hospedador. Básicamente, deben de ser capaces de colonizar el intestino, sobreviviendo al paso de la barrea gástrica y al efecto de su bajo pH, así como al efecto detergente de las sales biliares que pueden reducir su viabilidad a consecuencia de la destrucción de sus membranas (Gilliland *et al.*, 1984; Gilliland, 1987).

Las principales bacterias usadas como probióticos en la alimentación animal son bacterias Gram positivas entre las que destacan las del género *Bacillus* (*B. cereus* var. *toyoi*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*), *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. farciminis*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*), *Pediococcus* (*P. acidilactici*), *Streptococcus* (*S. infantarius*) así como algunas levaduras entre las que destacan *Saccharomyces cerevisiae* y *S. kluyvery* (Anadon *et al.*, 2006; Farias *et al.*, 2006).

Como acabamos de indicar las denominadas comúnmente como bacterias ácido lácticas o BAL se encuentran entre las más frecuentemente empleadas con fines probióticos. Numerosos trabajos han demostrado la capacidad de un gran número de estas BAL para inhibir distintos patógenos, incluidas las bacterias del género *Salmonella*. Esta inhibición ha sido demostrada *in vitro* tanto en medios sólidos como en caldos (Drago *et al.*, 1997; Fernández *et al.*, 2003) y en distintas líneas celulares intestinales (Fernández *et al.*, 2003; Fayol-Messaoudi *et al.*, 2005). Además, son numerosos los autores que han descrito los efectos beneficiosos de preparados de BAL *in vivo*, en diferentes especies animales y frente a diferentes enteropatógenos.

Así, en aves, la administración de *Lactobacillus salivarius* reduce la colonización por *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (Nisbet *et al.*, 1998; Pascual *et al.*, 1999), mientras que en conejos se ha demostrado que la utilización de *Lactobacillus casei* cepa Shirota reduce la colonización y la intensidad de la diarrea producida por *E. coli* O157:H7 (Ogawa *et al.*, 2001).

Entre las razones más frecuentemente citadas para justificar el efecto beneficioso de gran número de aislados de BAL se incluyen la producción de sustancias con capacidad antimicrobiana como ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno, bacteriocinas y sustancias semejantes a las bacteriocinas y, posiblemente, biosurfactantes (Fernández *et al.*, 2003).

2.1.1.- Principales características de las BAL

Las BAL constituyen un vasto conjunto de microorganismos que se caracterizan por generar ácido láctico como producto final del proceso de fermentación. De forma general las BAL son cocos o bacilos, Gram positivos y no esporulados ni móviles, anaerobios, estrictos o en muchos casos facultativos (aerotolerantes), oxidasa negativos, catalasa negativos y sin citocromos. Para su multiplicación necesitan de azúcares como glucosa o lactosa así como de aminoácidos, vitaminas y determinados factores de crecimiento. Como principal característica del grupo destaca su capacidad para producir ácido láctico como único o principal producto de la fermentación. Están muy ampliamente distribuidas en la naturaleza pudiendo ser aisladas del tracto digestivo y de la vagina de diferentes de mamíferos así como de alimentos, tierra o plantas.

En función de las características de su fermentación, las BAL se pueden clasificar en homo o heterofermentativas. El primer grupo incluye algunas especies de *Lactobacillus* y bacterias del género *Pediococcus* y *Streptococcus* y se caracterizan por poseer la enzima aldolasa y producir ácido láctico como producto fundamental de la fermentación de la glucosa (Salminen *et al.*, 1993; Axelsson, 1998). Por su parte, las BAL heterofermentativas son capaces de metabolizar las hexosas a pentosas por la vía 6-fosfogluconato-fosfocetolasa produciendo ácido láctico en este proceso junto con otros productos como

acetato, etanol y CO₂. Incluyen bacterias del género *Leuconostoc* así como algunas especies de *Lactobacillus* (Carr *et al.*, 2002).

Las bacterias del género *Lactobacillus* tienen forma bacilar, rectas o curvas, pudiendo presentarse aisladas, por parejas o en cadenas cortas. Carecen de flagelos y son inmóviles. Crecen en superficie sobre medios sólidos, a una temperatura óptima de entre 35 y 38°C y a pH ácido (5,5-5,8), favoreciéndose este crecimiento en condiciones de anaerobiosis (concentración de O₂ inferior al 5-10 %) (Kandler & Weiss, 1992).

Por el contrario, las bacterias del género *Streptococcus* tienen morfología cocoide y se disponen habitualmente en parejas o formando cadenas cortas. Crecen a una temperatura y pH óptimos de 37°C y 9,6, respectivamente (Hardie, 1992).

2.1.2.- Mecanismos de acción de las BAL

Los primeros estudios con BAL en animales demostraron que su administración estaba asociada a la reducción de la mortalidad y de los cuadros de diarrea, justificándose las mejoras de tipo productivo como una consecuencia de esta acción (Sandine *et al.*, 1972). Con posterioridad, han sido numerosos los estudios que han analizado los efectos beneficiosos asociados al empleo de BAL en diferentes especies animales (Kinsey, 1981; Fuller, 1989; Sisson, 1989; Tannock *et al.*, 1989).

Teniendo en cuenta que estas bacterias ejercen múltiples efectos beneficiosos en el organismo, es fácil comprender que su mecanismo de acción se establezca por vías muy distintas y a veces poco conocidas. De forma general, se ha descrito que estos efectos beneficiosos pueden ser debidos a la acción antagónica frente a grupos de microorganismos específicos, a un efecto sobre el metabolismo microbiano o a un estímulo de la inmunidad (Fuller, 1989).

Acción antagónica sobre grupos de microorganismos específicos

Las BAL inhiben la multiplicación de microorganismos patógenos en el tracto intestinal. Este efecto puede ser consecuencia de la producción de compuestos antibacterianos, de la generación de ácido láctico y consecuentemente de un pH ácido en el tracto intestinal o de un antagonismo competitivo (Grossowicks *et al.*, 1947).

En lo que respecta a la producción de compuestos con actividad antibacteriana, se ha descrito la producción de diferentes compuestos que han recibido variadas denominaciones: lactobacilín (Wheater *et al.*, 1951), lactolín (Kodama, 1952), lactocidín (Vincent *et al.*, 1959), acidolín (Mikolajcik & Hamdan, 1975) o acidofilín (Shahani *et al.*, 1976), entre otros.

Las BAL poseen gran capacidad fermentativa, produciendo cantidades significativas de ácidos orgánicos, fundamentalmente ácido láctico y también ácido acético o fórmico a partir de carbohidratos simples. Esto determina un aumento de la acidez intestinal y limita el crecimiento, especialmente de los gérmenes patógenos Gram negativos (Ten Brink *et al.*, 1987). En este sentido, se ha comprobado que el crecimiento de *E. coli* puede detenerse ajustando el pH de un medio de cultivo a 4,5 mediante la adición de ácido láctico o clorhídrico (Fuller, 1977).

La competencia directa por los lugares de adherencia en la superficie epitelial del intestino se ha descrito como un importante factor en la acción antagónica frente a microorganismos patógenos (Schleifer, 1985). Si los receptores de la superficie epitelial están saturados, la colonización intestinal por parte de estos microorganismos será inviable (Van Der Waaij *et al.*, 1971). A este fenómeno de resistencia a la colonización se le ha dado el nombre específico de exclusión competitiva (EC). Sin embargo, su eficiencia es limitada y bien a consecuencia de un ataque masivo por parte de los microorganismos patógenos o de una reducción temporal de dicha resistencia a la colonización, esta EC se ve frecuentemente superada.

El efecto de EC ejercido por los microorganismos de la microbiota frente a especies patógenas fue demostrado por Waksman en 1945. Posteriormente,

Freter (1962) y Raibaud *et al.* (1977) comprobaron la existencia de un verdadero efecto de barrera microbiana en el tracto digestivo, interviniendo activamente esta barrera en la implantación y proliferación de gérmenes exógenos. Tancrede & Raibaud (1978) distinguieron dos tipos de efecto barrera; el denominado efecto drástico, que conduce a la eliminación total de la cepa exógena, y el efecto permisivo, que si bien permite o posibilita al germen su implantación, limita el tamaño de su población.

Además, para multiplicarse en el intestino, los microorganismos necesitan utilizar los nutrientes disponibles. El contenido intestinal es una rica fuente de nutrientes para el crecimiento microbiano pero la deficiencia en alguno de ellos puede afectar a este crecimiento. Las BAL requieren vitaminas, que en ocasiones se encuentran en concentraciones muy bajas. En este sentido, Wilson & Perini (1988) han propuesto que la competencia por carbohidratos específicos entre los microorganismos de la microbiota y los microorganismos patógenos podría ser responsable, al menos parcialmente, de la eliminación de *Clostridium* en el ciego en un modelo murino.

Efecto sobre el metabolismo microbiano

Las BAL pueden alterar el metabolismo microbiano, modificando la actividad enzimática en el medio. Goldin & Gorbach (1984) comprobaron cómo algunas especies de *Lactobacillus* reducían la actividad glucuronidasa, nitroreductasa y azoreductasa, aunque a los 30 días de finalizar la administración de lactobacilos, la actividad enzimática recuperó los niveles previos a la administración de los mismos.

Los *Lactobacillus* pueden contribuir también a la digestión de carbohidratos más complejos que la lactosa. Champ *et al.* (1983) aislaron tres cepas de *Lactobacillus* del buche de pollos con actividad amilolítica. Además, los probióticos aumentan la síntesis de vitaminas y son muy utilizados para estos fines, pues se comprobó que promueven la producción de vitaminas del complejo B (Yeo *et al.*, 1997).

Existen pruebas que indican que las BAL pueden prevenir, retardar o disminuir la iniciación y desarrollo de tumores (Zhang & Ohta, 1991; Adachi,

1992; Goldin, 1996). Dentro de los mecanismos propuestos para explicar este efecto, se encuentra la unión de las bacterias a compuestos mutagénicos, la inhibición de las células malignas y la supresión de bacterias que producen enzimas β -glucosidasas, β -glucuronidasas, nitroreductasas y azoreductasas, responsables de la liberación de carcinógenos de complejos inócuos y la destrucción de carcinógenos como las nitrosaminas (De Ross & Katan, 2000).

Se ha propuesto la necesidad de profundizar en el estudio del efecto de los probióticos en el metabolismo microbiano y del hospedador, pues se pueden lograr resultados prometedores en la obtención de enzimas y medicamentos que puedan modificar algunos métodos terapéuticos utilizados en la actualidad (García *et al.*, 2005).

Efecto de estimulación de la respuesta inmunitaria

La mucosa intestinal constituye una barrera inmunológica esencial para el hombre y los animales estando implicada en la defensa del hospedador contra enfermedades infecciosas, así como en el reconocimiento de los microorganismos de la microbiota digestiva y de los antígenos presentes en la dieta (Revolledo, 2006). Algunos componentes de las paredes celulares de las bacterias tales como los peptidoglicanos y los lipopolisacáridos, despliegan un importante papel en la activación del sistema inmunológico (Hamman *et al.*, 1998). La colonización microbiana del tracto digestivo puede afectar también a la composición del tejido linfoide asociado al intestino, incrementando los linfocitos intraepiteliales y las células productoras de inmunoglobulinas en los folículos y en la lámina propia (Guarner & Malagelada, 2003).

El tracto gastrointestinal es un importante órgano para la defensa del hospedador frente a microorganismos patógenos y la microbiota intestinal ejerce una profunda influencia en el estado inmunológico del individuo. Según Belmear *et al.* (1984), la actividad fagocitaria y los niveles de globulinas en suero son superiores en los animales con una microbiota intestinal completa en comparación con los animales libres de gérmenes. Ma *et al.* (1990) demostraron en ratones que los lactobacilos, en particular *L. casei*, estimulan la actividad fagocitaria estando este hecho avalado por otras investigaciones (Saito *et al.*, 1981; Bloksma *et al.*, 1981; Perdígón *et al.*, 1986).

La estimulación de la respuesta inmune en las aves por las BAL se manifiesta a través del incremento en la producción de inmunoglobulinas (de los tipos IgA, IgM o IgG), de la fagocitosis y de la producción de citoquinas, además de promover la generación de linfocitos T (Edens, 2003).

Los lactobacilos pueden también traslocarse a través del tejido epitelial y sobrevivir por varios días en el bazo y en otras localizaciones, estimulando el proceso de fagocitosis y a las células inmunocompetentes del tejido linfático asociado al intestino (Hedouin, 1995).

El efecto estimulante de la inmunidad ha servido para que algunos investigadores hayan sugerido la posible utilidad de los lactobacilos en la prevención de tumores (Reddy *et al.*, 1983; Friend & Shahany, 1984). Según varios trabajos, la primera referencia a efectos antitumorales de las BAL fue realizada por Bogdanov (1962) siendo relativa a *L. bulgaricus* (Fuller, 1989; Perdigón *et al.*, 1991). Años más tarde, Havenaar & Huis In't Veld (1992) propuso que el mecanismo de acción asociado a este efecto estaba relacionado con la inducción de cambios en la composición de la microbiota y consecuentemente en la respuesta inmunitaria.

En este sentido, se ha propuesto que las BAL no solamente poseen la facultad de favorecer el equilibrio de la microbiota intestinal sino que también pueden, indirectamente, influir en procesos patológicos como infecciones o tumores en tejidos alejados del tracto digestivo (Drasar & Hill, 1972; Gorbach & Goldin, 1990).

2.2.- OBJETIVOS

El objetivo del presente estudio ha sido la obtención de un preparado probiótico que pueda ser empleado para el control de las infecciones causadas por *Salmonella enterica* o por otros enteropatógenos en producción aviar.

Este objetivo general se desarrolló a través de los siguientes objetivos específicos:

- Aislamiento de BAL de origen aviar a partir del contenido intestinal y las heces de aves de una raza autóctona y criada en condiciones no intensivas, los gallos de pluma de León, así como de perdices.
- Caracterización del potencial probiótico de los aislados de BAL obtenidos a través de la determinación del perfil de resistencia a antibióticos, de la capacidad de inhibición de microorganismos patógenos, de la capacidad para disminuir el pH del medio, de la tolerancia a condiciones de pH ácido y de tolerancia a sales biliares.
- Identificación molecular de los aislados seleccionados en el apartado anterior.

2.3.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1.- Recogida de muestras

La recogida de muestras se realizó en gallos de pluma de León y en perdiz común, *Alectoris rufa*.

Los gallos de pluma de León son animales rústicos y criados en condiciones extensivas para la obtención de plumas destinadas a la fabricación de moscas empleadas en la pesca (pesca a mosca). El origen de la raza es incierto, criándose principalmente en localidades de la cuenca del río Curueño, en la montaña centrorienta de la provincia de León. Las primeras descripciones son muy antiguas y, de hecho, en el año 1624, en el Manuscrito de Astorga, ya se describe la existencia de gallos criados en la zona norte de León, diferenciándose dos razas y varias variedades. Las dos razas existentes son denominadas Pardo e Indio (Figura 1) y el censo actual está alrededor de los 3.000 ejemplares (Gil, 2013).



Figura 1. Gallos pluma de León (Indio y Pardo). Explotación de Tomás Gil.

El sistema de crianza de los animales se corresponde con un sistema extensivo y tradicional, con las aves alojadas siempre en corrales abiertos o vallados, al aire libre. Cada criador desarrolla de forma autónoma e independiente, según su experiencia, el manejo que cree conveniente. La mayoría de los criadores no tienen control ni registros de cada una de las fases del ciclo productivo. El control más importante se realiza entre el nacimiento y la primera pela, a los 6 meses de edad, momento en el que se seleccionan los mejores pollos en base a la calidad de la pluma.

La alimentación se realiza fundamentalmente a base de cereales y lo que las aves encuentran en el terreno de los parques o corrales donde se crían según la época del año (brotes de la vegetación, invertebrados del suelo, etc). En el caso de los pollitos, durante los primeros meses de vida se les alimenta con pienso compuesto (De la Fuente *et al.*, 2009).

Por su parte, la perdiz roja es una especie de ave galliforme de la familia *Phasianidae*, autóctona de Europa sudoccidental (Francia, Península Ibérica y noroeste de Italia). Es la especie de perdiz más extendida y común en la Península Ibérica. Se trata de un ave principalmente terrestre y sedentaria, que se reproduce en planicies abiertas y montes bajos de clima seco, siendo característica de tierras de agricultura de secano y de áreas abiertas pedregosas. Anida en el suelo y se alimenta de semillas y otras materias vegetales aunque los animales jóvenes, en particular, también capturan insectos y otros pequeños invertebrados como suplemento proteico esencial. Entre los vegetales que ingiere predominan los cereales cultivados por el hombre, las hojas, las hierbas verdes de los prados y las frutas silvestres. Además, la perdiz roja suele encontrarse con cierta regularidad en las cercanías de las fuentes de agua, charcas y arroyos, ya que necesita beber con elevada frecuencia (Hernández-Briz, 1991).



Figura 2. Perdiz roja (*Alectoris rufa*).

Se realizaron dos muestreos. En el primero de ellos, se recogieron:

- 5 muestras de heces de gallos de pluma de León de 5 años de edad.

- Muestras de mucosa y de contenido intestinal (duodeno, íleon y ciego) de 5 gallos de pluma de León, adultos sanos procedentes de la mayor explotación de estas aves y que cuenta con unos 800 ejemplares. Los cinco ejemplares fueron sacrificados en la explotación, mediante dislocación cervical y trasladados de forma inmediata y en refrigeración a las instalaciones del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de León. De cada uno de los tramos muestreados se tomaron muestras de raspado de mucosa y de contenido, ambas de 1 g de peso.

Se realizó un segundo muestreo reuniéndose:

- Muestras de mucosa y contenido intestinal (duodeno, íleon y ciego) de 3 perdices cazadas en coto privado y trasladadas en condiciones de refrigeración al laboratorio, tomándose en cada caso 1 g de raspado de la mucosa y 1 g del contenido del tramo considerado.

2.3.2.- Aislamiento de las BAL

Cada una de las muestras recogidas fue procesada de forma separada. Se resuspendió 1 g de muestra (heces o raspado de mucosa) en 9 mL de agua de peptona (Oxoid) en matraces de 50 mL que se mantuvieron en un incubador orbital en agitación a 150 rpm durante 10 minutos a 39°C. A partir de estas suspensiones se tomaron 100 µL del homogeneizado y se diluyeron en microtubos con 900 µL de agua de peptona y se realizaron diluciones seriadas, desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁶ en agua de peptona. De las diluciones 10⁻³ a 10⁻⁶, se sembraron en placas con medio agar rogosa (MRS) (Merck), a razón de 0,1 mL por placa. Las placas fueron incubadas a 39°C durante 48 horas en anaerobiosis. Se seleccionaron las placas en las que existió crecimiento y un número de colonias entre 20 y 200.

2.3.3.- Selección preliminar y conservación de las BAL

Se seleccionaron todas aquellas colonias que presentaron morfología diferente. Fueron resembradas en placas de agar MRS (Merk), en anaerobiosis y a 39°C durante 48 horas. Este subcultivo se realizó de forma sucesiva hasta obtener cultivos puros a los que se realizó la tinción de Gram y la prueba de catalasa, seleccionándose los aislados Gram positivos y catalasa negativos.

Para su conservación, los aislados fueron cultivados en 5 mL de caldo MRS (Merk), en condiciones de anaerobiosis y durante 48 horas a 39°C, centrifugando a continuación a 10.000 g durante 10 minutos y resuspendiéndose el sedimento en 1 mL de caldo MRS suplementado con un 20 % de glicerol. La suspensión resultante se alicuotó y almacenó en crioviales a -80°C.

2.3.4.- Determinación del perfil de resistencia a antibióticos

Se estudió la resistencia de los aislados de BAL a una selección de antibióticos mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) empleando el método de microdilución en placas de 96 pocillos.

Preparación de los antibióticos

Se seleccionaron los antibióticos de acuerdo a las recomendaciones de la European Food Safety Authority (EFSA). En total se determinó el perfil de resistencia a un total de nueve antimicrobianos: ampicilina, clindamicina, estreptomina, eritromicina, gentamicina, kanamicina, tetraciclina, vancomicina y cloranfenicol. El proveedor de todos ellos fue Sigma, salvo en el caso de la clindamicina que fue suministrada por Cofares.

Para la prueba se utilizaron microplacas de cultivo celular, de 96 pocillos y estériles, que se manipularon en cabina de flujo laminar durante todo el procedimiento. Inicialmente, se dispensaron 50 μ L de caldo LSM, compuesto por un 90 % de medio Iso-sensitest (Oxoid) suplementado con un 10 % de caldo MRS (Merk), en todos los pocillos de la microplaca, salvo en la primera columna y en el primer pocillo de la columna 11, correspondiente a la concentración más elevada de cloranfenicol. A continuación, en los pocillos de la primera columna así como en el primer pocillo de la columna 11 se dispensaron 100 μ L de medio LSM suplementado con antibiótico al doble de la concentración inicial que se muestra en la Tabla 1. Seguidamente, se realizaron diluciones dobles, pasando 50 μ L del pocillo con antibióticos hacia el siguiente y así, sucesivamente, hasta llegar al último pocillo con antibióticos y eliminando los 50 μ L restantes al finalizar el proceso.

Tabla 1. Diseño de las placas de antibiograma (96 pocillos). El color verde refleja el intervalo de valores de punto de corte microbiológico propuestos por la EFSA para diferentes especies de bacterias del ácido láctico (EFSA, 2012).

Antibióticos	MCI (µg/mL)												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11 Clor	12
Ampicilina	A	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	C+	64	C-
Clindamicina	B	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	C+	32	C-
Estreptomina	C	256	128	64	32	16	8	4	2	1	C+	16	C-
Eritromicina	D	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	C+	8	C-
Gentamicina	E	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	C+	4	C-
Kanamicina	F	512	256	128	64	32	16	8	4	2	C+	2	C-
Tetraciclina	G	256	128	64	32	16	8	4	2	1	C+	1	C-
Vancomicina	H	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	C+	0,5	C-

Clor: cloranfenicol

Preparación del inóculo de BAL

Los aislados fueron descongelados y sembrados en placas de agar MRS (Merk), incubándose en anaerobiosis a 39°C durante 48 horas. Seguidamente, una colonia de cada aislado fue resembrada nuevamente en placas de agar MRS (Merk), durante 24 horas y en condiciones de anaerobiosis. Para cada aislado, se tomaron entre 1 y 3 colonias y se resuspendieron en 2 mL de solución salina isotónica (NaCl al 0,85 %) en tubos estériles de vidrio, con el fin de generar una suspensión con una turbidez aproximada a la correspondiente a un valor de $1-2 \times 10^8$ UFC en la escala de McFarland. Se utilizaron como controles una cepa de *E. coli*, referencia ATCC 25922 y recomendada por la Clinical and Laboratory standards Institute (CLSI) y una cepa de *Lactobacillus plantarum* 748, referencia ATCC 14917. Ambas fueron proporcionadas por la colección española de cultivos tipo (CECT).

Se realizó una dilución 1:500 (20 µL en 10 mL o 10 µL en 5 mL) de la suspensión bacteriana en caldo LSM, mezclando durante 15 segundos mediante agitación suave. Esta suspensión correspondió, aproximadamente, a una concentración de $1-2 \times 10^5$ bacterias por mL.

Realización de la microdilución en placa

Se distribuyeron 50 µL de la suspensión bacteriana en todos los pocillos de la placa, con excepción del pocillo del control negativo en el que se añadieron 50 µL de caldo LSM (no suplementado con suspensión bacteriana).

La incubación de las placas de 96 pocillos se realizó en agitación suave (60 rpm), durante 48 horas, en jarras de anaerobiosis, a 37°C y protegidas de la luz. La lectura se realizó a partir de la presencia de turbidez en los pocillos que permitió determinar la existencia o no de crecimiento bacteriano.

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) como la menor concentración de antibiótico para la cual no se observó crecimiento bacteriano. Los aislados con valores de CMI menores o iguales a los puntos de corte proporcionados por la EFSA (2012) fueron seleccionados para realizar otras pruebas.

2.3.5.- Determinación de la capacidad de inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos

La capacidad para inhibir el crecimiento de determinados microorganismos patógenos fue valorada mediante el método denominado "agar spot" descrito por Zamora (2003). Como enterobacterias indicadoras se emplearon: *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, *E. coli* CECT 434, un aislado de *E. coli* β-hemolítico, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* y *Clostridium perfringens*.

Los aislados de BAL fueron descongelados y sembrados en placas de agar MRS (Merk), incubando a 39°C durante 48 horas en condiciones de anaerobiosis. Las cepas de microorganismos patógenos indicadores fueron descongeladas y sembradas en placas de agar triptosa soja (TSA) (Merck), durante 24 horas a 37°C en condiciones de aerobiosis (*Salmonella enterica*, *E. coli* y *Listeria* spp.) o anaerobiosis (*Cl. perfringens*).

Para cada uno de los aislados de BAL, 3-4 colonias fueron resuspendidas en un tubo con 20 mL de caldo de MRS (Merck), incubando a 39°C durante 48 horas y en condiciones de anaerobiosis. Transcurrido este tiempo, 10 µL del cultivo fueron transferidos a 6 puntos o spots (10 µL en cada spot) en una placa de agar MRS (Merk), incubando a 37°C durante 24 horas en condiciones de anaerobiosis.

Simultáneamente, se prepararon cultivos en medio líquido de cada uno de los microorganismos indicadores, inoculando 3-4 colonias en 50 mL de caldo BHI (Merck) e incubando 12-16 horas en condiciones de aerobiosis (*Salmonella enterica*, *E. coli* y *Listeria* spp.) o anaerobiosis (*Cl. perfringens*) y en agitación.

Al completar las 24 horas de incubación, las placas con los spots de BAL fueron recubiertas con 7 mL de agar BHI semisólido, caldo BHI (Merk) suplementado con agar bacteriológico (Conda) al 0,7 %, atemperado en baño maría a 40°C y suplementado al 1 % con el cultivo líquido de cada uno de los microorganismos indicadores. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas y en condiciones de aerobiosis, realizándose la medición de los halos de inhibición con una regla graduada. Se consideró que existía inhibición cuando este halo fue superior o igual a 10 mm.

2.3.6.- Capacidad para disminuir el pH del medio

Los aislados de BAL seleccionados fueron sembrados en tubos de vidrio con 10 mL de caldo MRS (Conda), incubando a 39°C durante 48 horas en condiciones de anaerobiosis. A partir de estos cultivos se tomó 1 mL que se transfirió a matraces con 50 mL de caldo MRS (Merck) ajustado a pH 6,5, incubando a 37°C durante 24 horas a 90 rpm. Transcurrido ese tiempo, se midió el pH en las suspensiones.

Se consideró que un aislado era capaz de disminuir el pH del medio cuando se alcanzaron valores menores o iguales a 4,5.

2.3.7.- Tolerancia a condiciones de pH ácido

Se valoró la tolerancia o resistencia de las BAL a condiciones ácidas, con el fin de estimar su capacidad para mantenerse viables durante el paso por el estómago.

Las cepas de BAL fueron sembradas en placas de agar MRS (Merck) e incubadas a 39°C durante 48 horas en condiciones de anaerobiosis. Tres o cuatro colonias fueron transferidas a tubos con 10 mL de caldo MRS (Merck) incubando a 39°C durante 18 horas y en anaerobiosis. De cada cultivo, se tomó 1 mL (10^9 UFC/mL aproximadamente) y se empleó para inocular tubos con 20 mL de caldo MRS (Merk) ajustados a diferentes valores de pH: pH 1,5, pH 2,0 y pH 2,5, mediante la adición de HCL 0,1 N, así como un tubo con caldo MRS a pH 6,5, que fue empleado como control. Los tubos fueron incubados a 39°C durante 3 horas en agitación (110 rpm) y en anaerobiosis. Antes del inicio de la incubación, tiempo hora cero (H0), a las 2 horas, tiempo hora 2 (H2) y a las 6 horas, tiempo hora 6 (H6), se recogió una muestra que se empleó para realizar el conteo de células viables mediante diluciones decimales seriadas, siembra en placas de agar MRS (Merk) e incubación en condiciones de anaerobiosis a 39°C durante 48 horas.

La tolerancia a pH ácido se determinó comparando el conteo de bacterias viables en agar MRS para las diferentes horas valoradas (hora 0, hora 2 y hora 6) con el conteo de bacterias viables en el control a la hora 0. Teniendo en cuenta los criterios de selección propuestos anteriormente (Zavaglia *et al.*, 1998; Pennacchia *et al.*, 2004), se valoraron como resistentes a condiciones de pH ácido aquellas cepas de BAL que mantuvieron viables al menos el 50 % de las bacterias.

El porcentaje de resistencia se estimó, para cada uno de los pH valorados y tiempos de incubación, empleando la fórmula proporcionada por Kociubinski *et al.* (1999).

$$\% R_{pH2,5} = \text{UFC/mL}_{MRS\ pH=2,5} \times 100 / \text{UFC/mL}_{MRS\ pH=6,2}$$

Donde:

$\% R_{pH\ 2,5}$ (porcentaje de resistencia a pH 2,5)

UFC/mL_{MRS pH=2,5} (bacterias viables a las 6 horas).

UFC/mL_{MRS pH=6,2} (bacterias viables en el testigo a la hora 0)

$$\% R_{pH2,0} = \text{UFC/mL}_{MRS\ pH=2,0} \times 100 / \text{UFC/mL}_{MRS\ pH=6,2}$$

Donde:

$\% R_{pH\ 2,0}$ (porcentaje de resistencia a pH 2,0)

UFC/mL_{MRS pH=2,0} (bacterias viables a las 6 horas).

UFC/mL_{MRS pH=6,2} (bacterias viables en el testigo a la hora 0)

$$\% R_{pH1,5} = \text{UFC/mL}_{MRS\ pH=1,5} \times 100 / \text{UFC/mL}_{MRS\ pH=6,2}$$

Donde:

$\% R_{pH\ 1,5}$ (porcentaje de resistencia a pH 1,5)

UFC/mL_{MRS pH=1,5} (bacterias viables a las 6 horas).

UFC/mL_{MRS pH=6,2} (bacterias viables en el testigo a la hora 0)

2.3.8.- Tolerancia a las sales biliares

Se valoró la resistencia de las BAL a las sales biliares y, por tanto, su capacidad teórica para mantenerse viables en las condiciones del intestino delgado.

Los aislados de BAL fueron descongelados y sembrados en placas de agar MRS (Merck), incubando a 39°C durante 48 horas en condiciones de anaerobiosis.

Seguidamente, 3 o 4 colonias de cada aislado fueron transferidas a caldo MRS (Merk), incubando durante 18 horas a 39°C y en condiciones de anaerobiosis. Completada la incubación, se utilizó 1 mL del cultivo (10^9 UFC/mL, aproximadamente) para inocular tubos con 20 mL de caldo MRS (Merk) con un pH de 8,0, ajustado mediante la adición de NaOH 1N (Sigma-Aldrich) y suplementado con sales biliares (Cultimed) al 0,45 %. Los cultivos se incubaron a 37°C, en anaerobiosis y en agitación a 110 rpm. Para cada aislado se preparó un control, cultivando en caldo MRS (a pH 6,2 y no suplementado con sales biliares) y bajo las mismas condiciones.

A las 2 horas (H2) y a las 4 horas (H4) se realizó el conteo de células viables mediante diluciones decimales seriadas y siembra en placas de agar MRS (Merk). Se consideró un aislado como resistente a sales biliares cuando el porcentaje de resistencia, estimado empleando una modificación de la fórmula descrita por Kociubinskiy *et al.* (1999), fue mayor o igual al 50 % tras 4 horas de incubación.

$$\% \text{RSB} = \frac{\text{UFC/mL}_{\text{MRS pH 8 - 0,45 \% SB}}}{\text{UFC/mL}_{\text{MRS pH 6,2}}} \times 100$$

Donde:

% RSB (porcentaje de resistencia a sales biliares).

$\text{UFC/mL}_{\text{MRS pH 8 - 0,45 \% SB}}$ (bacterias viables a las 4 horas con 0,45 % de sales biliares).

$\text{UFC/mL}_{\text{MRS pH 6,2}}$ (bacterias viables en el testigo a la hora 0).

2.3.9.- Identificación molecular de los aislados de BAL

La identificación molecular se llevó a cabo mediante la amplificación, por PCR, y posterior secuenciación de la región intergénica 16S-23S.

Para la extracción del ADN partimos de 3-4 colonias de cada aislado de BAL que fueron resuspendidas en tubos eppendorf estériles que contenían 100 μ L de solución buffer de lisis compuesto por:

Tris (Panreac) HCl (pH=8,3) 20 mM

KCl (Prolabo) 50 mM

MgCl₂ (Merck) 1,5 mM

Tween 20 (Panreac) 0,05 %

Noninet P40 (Fluka) 0,45 %

Gelatina (Prolabo) 0,01 %

El buffer de lisis se suplementó con 1 μ L de proteinasa K (0,015 mg/ μ L) (Roche) y la suspensión se incubó en baño a 52°C durante 50 minutos seguidos de 10 minutos a 98°C. Completada la incubación, los tubos fueron centrifugados durante 10 minutos a 4°C y 13.000 rpm, recogiendo el sobrenadante que contenía el ADN.

Para la amplificación por PCR de la región intergénica (16S-23S) se empleó el protocolo descrito por Berthier & Ehrlich (1998). Los primers utilizados fueron los siguientes:

- Cebador 16S (directo): 5'-GCTGGATCACCTCCTTTC-3'.
- Cebador 23S (reverso): 5'-AGTGCCAAGGCATCCACC-3'

El volumen de la reacción fue de 50 μ L, distribuido según se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Preparación de la PCR para la identificación de los aislados de bacterias del ácido láctico.

Reactivos	Concentración	Proveedor	Cantidad
Buffer	10x	Invitrogen	5 µL
MgCL ₂	50 mM	Invitrogen	2 µL
dNTP	10 mM	Invitrogen	1 µL
Primer 16S	0,5 µM	Eurofins	2,5 µL
Primer 23S	0,5 µM	Eurofins	2,5 µL
Agua mili-Q estéril	-	-	34,5 µL
ADN molde	-	-	2 µL
Taq ADN polimerasa	5 U/µL	Invitrogen	0,5 µL

La reacción se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler Gradient® (Eppendorf), con el siguiente programa:

- 95°C, 5 minutos
- 35 ciclos de:
 - 95°C, 30 segundos
 - 55°C, 30 segundos
 - 72°C, 1 minuto
- 72°C, 5 minutos
- Mantenimiento final a 4°C hasta retirada de las muestras

La electroforesis se realizó en gel de agarosa (Agarose D1 Low EEO, Conda) al 1,8 % suplementado con Gel Red Nucleic Acid Stain (1X) (Biotium), para la posterior visualización del ADN. Se dispensaron 48 µL del producto de PCR con tampón de carga TrackIt Cyan/Orange Loading Buffer 1x (Invitrogen). En un pocillo de cada fila de los geles se dispensaron 2 µL del marcador de peso molecular (100 bp ADN Ladder 0,5 µg, Invitrogen) suplementados con tampón de carga 1x y agua milli-Q. La electroforesis se realizó a un voltaje

constante de 90 V durante 1 hora y 50 minutos. El ADN se visualizó en un transiluminador con luz ultravioleta.

Las bandas visualizadas fueron cortadas y pesadas. Se usó un kit comercial, Illustra GFX PCR ADN o Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), para extraer el ADN de las bandas, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Finalmente, el producto de PCR obtenido fue secuenciado en el Servicio de Análisis de Ácidos Nucléicos de la Universidad de León, usando los cebadores descritos con anterioridad para la PCR. Los resultados obtenidos de la secuenciación fueron comparados a través del programa BLAST, disponible en el National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), en la base de datos GenBank. Los aislados se consideraron identificados cuando existió como mínimo un 95 % de similitud entre las secuencias.

2.4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1.- Aislamiento de BAL de origen aviar

La concentración de BAL detectada en los diferentes tipos de muestras incluidas en el presente estudio tras el cultivo en agar MRS a 37°C durante 48 horas en condiciones de anaerobiosis se muestran en la Tabla 3.

En las muestras de heces de gallos de pluma de León la concentración de BAL fue de 10^6 UFC/g. En el duodeno se detectó una concentración que osciló entre 10^4 y 10^6 UFC/g, en el íleon de 10^5 UFC/g mientras que en el ciego se alcanzaron los valores más elevados, alrededor de 10^6 UFC/g.

Tabla 3. Concentración de BAL por gramo en los diferentes tipos de muestras recogidas en gallos de pluma de León y perdices.

Especie	Tipo de muestra	UFC/ g
Gallos de pluma de León	Contenido de duodeno	$10^{4,1}$
	Mucosa de duodeno	$10^{5,5}$
	Contenido de íleon	$10^{5,0}$
	Mucosa de íleon	$10^{5,1}$
	Contenido de ciego	$10^{6,0}$
	Mucosa de ciego	$10^{6,1}$
	Heces	$10^{6,3}$
Perdices	Contenido de duodeno	$10^{3,2}$
	Mucosa de duodeno	$10^{3,0}$
	Contenido de íleon	$10^{3,3}$
	Mucosa de íleon	$10^{5,0}$
	Contenido de ciego	$10^{3,5}$
	Mucosa de ciego	$10^{5,3}$

Se encontró una concentración de BAL algo inferior en perdices, 10^3 UFC/g en el duodeno y entre 10^3 y 10^5 UFC/g para el íleon y el ciego, que en los gallos de pluma.

La concentración bacteriana se mantuvo en valores que oscilaron entre 10^3 y 10^6 UFC/g, valores semejantes a los descritos por otros autores (Aguavil, 2012). Cabe destacar que las diferencias de concentración bacteriana observadas pueden ser consecuencia de la localización de las muestras en el tracto intestinal así como de otros factores como el estrés, el tipo de alimentación y su pH, la edad, la especie o el tipo de sistema de crianza, entre otros muchos.

Sin embargo, otros trabajos (Apajalahti *et al.*, 2004; Chambers & Gong, 2011) proporcionan datos sensiblemente más elevados. Así, se ha señalado que el tracto digestivo de los pollos posee cerca de 10^{13} bacterias aunque una elevada proporción, cerca del 90 %, no han podido ser cultivadas e identificadas por métodos de cultivos convencionales.

Específicamente en lo que respecta a las BAL, Gabriel *et al.* (2005) describieron una concentración media de 10^8 UFC/g en el duodeno así como valores ligeramente superiores a las 10^8 UFC/g en el íleon y el ciego de aves. Cabe destacar que en el caso del ganado porcino, Collazos (2008) reportó, empleando una metodología muy similar, valores de concentración de BAL superiores a los detectados en el presente estudio, entre 10^7 y 10^9 UFC/g.

En lo que respecta a las diferencias en la distribución de BAL en los diferentes tramos, se ha descrito que la concentración de microorganismos aumenta de la región proximal a la distal en pollos broilers, proporcionando los valores más elevados el íleon con 10^{8-9} UFC/g y el ciego con 10^{10-11} UFC/g (Chambers & Gong, 2011). Un resultado similar fue reportado por Collazos (2008) para cerdos en producción intensiva, con una concentración de BAL en el ciego y el colon superior a la detectada en otros tramos del tracto digestivo. En concordancia con estos resultados, en nuestro estudio, aunque las cifras obtenidas de recuentos totales de BAL fueron inferiores, podemos destacar que

la concentración de BAL en el ciego fue superior a la detectada en otros tramos más proximales del tracto digestivo.

En total se seleccionaron y cultivaron de forma sucesiva hasta lograr cultivos puros un total de 139 aislados. En una segunda etapa y con el fin de confirmar estos aislados como BAL se emplearon la prueba de la catalasa y la tinción de Gram. Se comprobó que 95 de los 139 aislados (68,3) cumplían los requisitos de ser bacterias Gram positivas y catalasa negativas. Un resultado semejante ha sido descrito previamente en trabajos basados en el empleo de este mismo o de muy similares protocolos para la obtención y selección de BAL a partir de muestras del tracto digestivo (Du Toit *et al.*, 1998; Brashears *et al.*, 2003).

En nuestro trabajo la elección del tracto gastrointestinal de aves para el aislamiento de las BAL está justificada por dos razones principales. En primer lugar, es evidente que estas BAL son residentes habituales del complejo ecosistema del tracto gastrointestinal (Mitsuoka, 1992) y, en segundo lugar, se ha tenido en cuenta la posible existencia de especificidad por parte del hospedador que ha sido descrita en algunos trabajos al evaluar la eficacia de productos probióticos o de mezclas de EC. Así, Borczyk *et al.* (1987), Fuller & Turvey (1971) y Ozawa *et al.* (1983), coinciden en señalar que los aislados de BAL procedentes de cerdos, aves o vacas muestran una gran eficacia en estos hospedadores pero no cuando se administran a otros diferentes de aquellos donde se habían aislado.

En lo que respecta a la selección de los animales para la toma de muestras de heces y/o contenido intestinal, podemos indicar que se seleccionaron los gallos de pluma de León por ser animales criados en condiciones extensivas, en libertad, que alcanzan la edad adulta y que reciben una dieta natural que asegura unas condiciones idóneas para el desarrollo del plumaje que es el objetivo final de la cría de estos animales. Estos animales son alimentados con una dieta especial a base de granos y cereales, con un uso de antibióticos nulo o mínimo.

El gallo de pluma de León es una de las razas aviares más antiguas de España, con muy limitada evolución a lo largo de sus cientos de años de historia lo que ha permitido mantener los mismos coloridos y características de pluma (Gil, 2013). Se ha especulado mucho acerca de las causas por las que las plumas de estos gallos criados en un área geográfica muy concreta presentan estas características. En algún caso se ha asociado a la presencia de vetas de uranio en la zona aunque no existe ningún trabajo científico que sustente esta afirmación. El régimen extensivo o familiar es el sistema de cría de elección en la producción de gallos de pluma ya que se piensa que es el que proporciona mejores plumas. Los animales se encuentran sueltos, en huertas y corrales, alimentándose a base de granos de cereales (trigo, cebada, maíz) además de lo que obtienen del picoteo de hierba, tierra y estiércol (De la Fuente, 2009; Gil 2012, comunicación personal). En cuanto al agua de bebida se utiliza preferentemente la de los arroyos de la zona.

En segundo lugar, se tomaron muestras en perdices que fueron seleccionadas por ser el principal representante de las aves gallináceas silvestres. Aunque no puede descartarse que estos animales procedan de sueltas realizadas con fines cinegéticos y de repoblación, también existe la posibilidad de que se trate de animales no criados por el hombre y, consecuentemente, se minimiza el efecto de las modificaciones asociadas a la cría por el hombre y la posibilidad de exposición previa a antibióticos.

Klander & Weiss (1992) describen las BAL como bacterias Gram positivas de la familia Lactobacillae que se caracterizan porque sus miembros pueden ser bacilos, largos o cortos, o cocos que se dividen como los bacilos, solamente en un plano, produciendo cadenas o tétradas de forma ocasional y filamentos, falsamente llamados ramificados.

En nuestro estudio, mediante la tinción de Gram, se comprobó que morfológicamente la mayoría de los aislados recuperados tenían una morfología cocoide (74,1 %) mientras que una proporción más limitada fueron bacilos (20,9 %) y coco bacilos (5 %).

En el caso concreto de las muestras de heces se obtuvieron 25 colonias con diferente morfología, de las que el 72 % fueron cocos, el 16 % bacilos y el 12 % cocobacilos. Así pues, predominó la morfología cocoide (Tabla 4).

Tabla 4. Morfología de los aislados de bacterias del ácido láctico recuperados a partir de heces de gallos pluma de León.

Aislado	Cocos	Bacilos	Cocobacilos
1	X		
2	X		
3	X		
4	X		
5		X	
6	X		
7	X		
8	X		
9			X
10	X		
11	X		
12	X		
13		X	
14	X		
15			X
16	X		
17	X		
18	X		
19	X		
21		X	
22		X	
23	X		
24	X		
25			X

A partir de las muestras de contenido y mucosa de duodeno, íleon y ciego de gallos pluma de León se recuperaron en placas de agar MRS un total de 60 colonias con diferente morfología. La evaluación mediante tinción de Gram y observación al microscopio mostró que la morfología predominante en estas muestras era la de cocos (63,3 %) mientras que el 25 % presentó una morfología bacilar. Se observó además un 11,7 % de las colonias correspondía con una morfología coco bacilar (Tabla 5).

Tabla 5. Morfología de los aislados de bacterias del ácido láctico recuperados a partir de diferentes tramos del intestino de gallos pluma de León.

Aislado	Tipo de muestra	Cocos	Bacilos	Cocobacilos
26	Contenido de duodeno	X		
27	Contenido de duodeno	X		
28	Mucosa de duodeno	X		
29	Mucosa de duodeno	X		
30	Contenido de íleon	X		
31	Contenido de íleon		X	
32	Mucosa de íleon	X		
33	Mucosa de íleon		X	
34	Contenido de ciego	X		
35	Contenido de ciego	X		
36	Mucosa de ciego	X		
37	Mucosa de ciego	X		
38	Contenido de duodeno	X		
39	Contenido de duodeno	X		
40	Mucosa de duodeno		X	
41	Mucosa de duodeno		X	
42	Contenido de íleon		X	
43	Contenido de íleon			X
44	Mucosa de íleon	X		

45	Mucosa de íleon		X	
46	Contenido de ciego	X		
47	Contenido de ciego	X		
48	Mucosa de ciego	X		
49	Mucosa de ciego		X	
50	Contenido de duodeno		X	
51	Contenido de duodeno		X	
52	Mucosa de duodeno	X		
53	Mucosa de duodeno	X		
54	Contenido de íleon			X
55	Contenido de íleon	X		
56	Mucosa de íleon	X		
57	Mucosa de íleon			X
58	Contenido de ciego	X		
59	Contenido de ciego	X		
60	Mucosa de ciego	X		
61	Mucosa de ciego	X		
62	Contenido de duodeno		X	
63	Contenido de duodeno	X		
64	Mucosa de duodeno	X		
65	Mucosa de duodeno	X		
66	Contenido de íleon	X		
67	Contenido de íleon		X	
68	Mucosa de íleon	X		
69	Mucosa de íleon	X		
70	Contenido de ciego	X		
71	Contenido de ciego	X		
72	Mucosa de ciego			X
73	Mucosa de ciego	X		
74	Contenido de duodeno	X		

75	Contenido de duodeno	X		
76	Mucosa de duodeno	X		
77	Mucosa de duodeno		X	
78	Contenido de íleon	X		
79	Contenido de íleon	X		
80	Mucosa de íleon	X		
81	Mucosa de íleon	X		
82	Contenido de ciego			X
83	Contenido de ciego		X	
84	Mucosa de ciego		X	
85	Mucosa de ciego		X	

Se recuperaron en placas de agar MRS 54 colonias con diferente morfología a partir de las muestras de contenido y mucosa de diferentes segmentos del intestino de perdices (duodeno, íleon y ciego). Al igual que en el caso de los gallos pluma, la morfología cocoide fue predominante (88,9 %) (Tabla 6).

Tabla 6. Morfología de los aislados de bacterias del ácido láctico recuperados a partir de diferentes tramos del intestino de perdices.

Aislado	Tipo de muestra	Cocos	Bacilos	Cocobacilos
86	Contenido de duodeno	X		
87	Contenido de duodeno	X		
88	Mucosa de duodeno	X		
89	Mucosa de duodeno	X		
90	Contenido de íleon	X		
91	Contenido de íleon	X		
92	Mucosa de íleon	X		
93	Mucosa de íleon		X	
94	Contenido de ciego	X		

95	Contenido de ciego	X		
96	Mucosa de ciego	X		
97	Mucosa de ciego	X		
98	Contenido de duodeno	X		
99	Contenido de duodeno	X		
100	Mucosa de duodeno	X		
101	Mucosa de duodeno	X		
102	Contenido de íleon	X		
103	Contenido de íleon	X		
104	Mucosa de íleon	X		
105	Mucosa de íleon		X	
106	Contenido de ciego	X		
107	Contenido de ciego	X		
108	Mucosa de ciego	X		
109	Mucosa de ciego	X		
110	Contenido de duodeno	X		
111	Contenido de duodeno	X		
112	Mucosa de duodeno	X		
113	Mucosa de duodeno	X		
114	Contenido de íleon	X		
115	Contenido de íleon	X		
116	Mucosa de íleon	X		
117	Mucosa de íleon	X		
118	Contenido de ciego	X		
119	Contenido de ciego			x
120	Mucosa de ciego	X		
121	Mucosa de ciego	X		

Las Figuras 3, 4 y 5 muestran las variedades de morfología observadas.

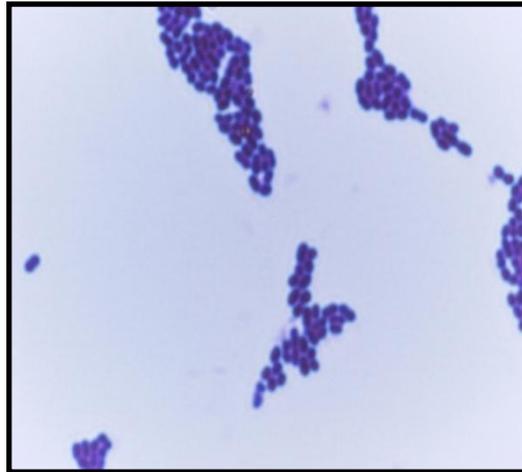


Figura 3

Morfología cocoide en un aislado de BAL obtenido en el presente estudio.

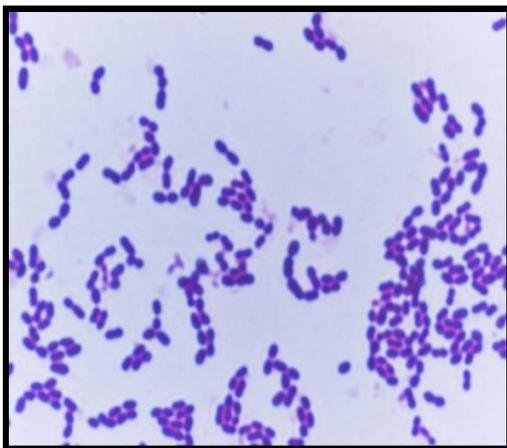


Figura 4

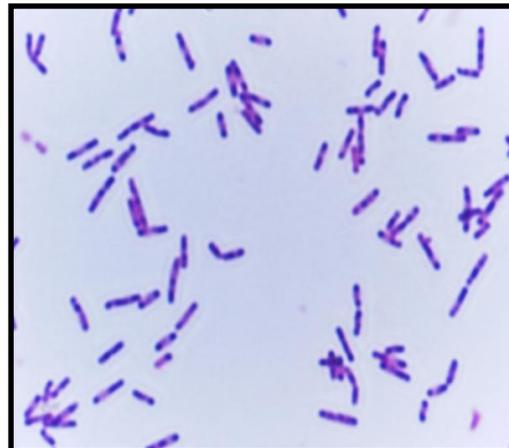


Figura 5

Morfología cocobacilar (Figura 4) y bacilar (bacilos cortos) (Figura 5) en dos aislados de BAL obtenidos en el presente estudio.

Con relación a la morfología de los aislados recuperados de muestras de duodeno, íleon y ciego de perdices no hemos encontrado en la revisión realizada ninguna referencia previa en la que se hayan reportado algunos resultados al respecto.

Los resultados obtenidos en lo que se refiere a la morfología de las BAL en los aislados procedentes de heces de gallos de pluma de León son diferentes a lo reportado por Collazos (2008), quien observó, en los aislados de BAL recuperados de las heces de cerdo, un 70 % de bacilos y un 30 % de cocos o cocobacilos. Un resultado similar fue reportado por Brashears *et al.* (2003) en aislados de BAL obtenidos de ganado vacuno.

Igualmente y en contraposición a nuestros resultados, en las investigaciones realizadas por Rodríguez *et al.* (2012) se describe que el 100 % de los aislados de *Lactobacillus* spp. recuperados del tracto gastrointestinal de aves (*Gallus gallus*) mostraban una morfología de bacilo. Por su parte, Mejía *et al.* (2007), a partir de un total de 360 aislados de *Lactobacillus*, identificaron una morfología cocoide en el 22,2 %.

Según Walker (2000), otra característica de las BAL es el hecho de que su capacidad anabólica es muy limitada, lo que contribuye a reducir el rendimiento de su cultivo y crecimiento, formando colonias que en general son pequeñas o muy pequeñas. Por este mismo motivo, las BAL son bacterias exigentes en su nutrición y requieren de una importante cantidad de factores nutritivos: aminoácidos, bases nitrogenadas, algunas vitaminas, principalmente del grupo B, y fuentes de carbono. La mayor parte obtienen energía sólo del metabolismo de los azúcares y compuestos relacionados fermentables por lo cual su desarrollo está restringido a ambientes ricos en azúcares (Levean & Bouix, 2000; Madigan *et al.*, 2004). Generalmente estos requerimientos suelen cumplirse aportando en el medio de cultivo carbohidratos fermentables, peptona, extracto de carne y extracto de levadura.

En nuestro trabajo hemos empleado para el aislamiento de BAL el medio MRS, un medio que cubre las necesidades para el crecimiento de la gran

mayoría de las BAL. Sin embargo, debemos señalar que existen especies de BAL que requieren sustratos muy particulares y factores de crecimiento especiales (Prescott *et al.*, 1999).

Por su parte, Saloff-Coste (1994) describió que una característica distintiva de las BAL es el crecimiento bajo condiciones de alta concentración de NaCl, siendo elevado en concentraciones de entre el 2 y el 4 %, muy bajo en concentraciones del 7 % y nulo en caldos MRS suplementados con NaCl al 10 %. Sin embargo esta característica selectiva no fue empleada para la selección de aislados BAL en el presente estudio.

En lo que respecta a la temperatura, podemos señalar que la mayoría de las BAL son mesófilas, aunque algunas son capaces de crecer a temperaturas tan bajas como 5°C mientras que otras se multiplican en temperaturas de hasta 45°C. En nuestro estudio se empleó una temperatura de 39°C durante todo el protocolo de aislamiento.

Las colonias de BAL obtenidas en el presente estudio fueron pequeñas, de entre 2 y 5 mm, convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y de color blanco-lechoso, de acuerdo a lo descrito por Prescott *et al.* (1999). No se identificaron colonias de otras coloraciones a pesar de que se ha descrito que algunos aislados de BAL producen pigmentos, dando lugar a colonias amarillentas, naranjas, rojas o pardas. Tampoco se identificaron colonias rugosas ni viscosas, como las que han sido descritas en algunos aislados de *Lactobacillus confusus*. En coincidencia con lo descrito previamente, las colonias no presentaron ningún olor característico al crecer en medios comunes ni mostraron halos en sus márgenes que pudieran estar asociados a actividades proteolíticas o lipolíticas (Law & Kolstad, 1983).

Finalmente, podemos destacar que todos los aislados seleccionados cumplieron el requisito de ser catalasa negativos. La catalasa es una enzima que degrada el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Para sintetizar esta enzima es necesario un grupo porfirínico que no es producido por las BAL, por lo que este grupo bacteriano no posee la enzima. Sin embargo, es importante conocer que, en ciertas condiciones, algunas bacterias son capaces de tomar grupos hemo

externos y sintetizar una enzima denominada pseudocatalasa. (Prescott *et al.*, 1999).

2.4.2.- Resistencia de las BAL a los antibióticos

Durante años los antibióticos se han utilizado para contrarrestar los efectos de las enfermedades de etiología infecciosa en las aves, además de como promotores del crecimiento (Reynolds *et al.*, 1997; Yeo & Kim, 1997; Levy, 1998; Edens, 2003). Su uso continuado ha generado resistencia en los aislados microbianos de origen aviar y, en ocasiones, la presencia de residuos en los alimentos derivados de las aves que se destinan al consumo humano (Levy, 1998; Williams & Heymann, 1998).

La asociación demostrada entre el uso de avoparcina en cerdos y aves y el incremento de la proporción de aislados de enterococos resistentes a glicopéptidos fue la primera demostración clara del impacto del empleo de los antimicrobianos como promotores del crecimiento en la salud humana (Bager *et al.*, 1997; Wegener, 2003). Entre los géneros bacterianos que más preocupan en la actualidad por su resistencia o multiresistencia destacan los enterococos resistentes a vancomicina (VRE) y los aislados de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) (Mathur & Singh, 2005). Ambos comparten un nicho ecológico común, el tracto gastrointestinal.

Consecuentemente, en los años más recientes se ha limitado de forma notable el empleo de antimicrobianos o antibióticos, prohibiéndose en el entorno de la UE su utilización como promotores de crecimiento. Es por ello que la búsqueda de nuevas opciones que puedan ser empleadas como aditivos en alimentación animal y que se asocien a un incremento en el rendimiento productivo y a una mejora del estado de salud de los animales es, en el momento actual, una prioridad. Los probióticos, como hemos señalado anteriormente, constituyen una alternativa relevante al uso de antibióticos ya que contribuyen a mantener el equilibrio ecológico en el intestino así como al buen funcionamiento del sistema inmunológico sin estar relacionados con ninguno de los problemas asociados al empleo de antibióticos (Bengmark, 1998; Lucchini *et al.*, 1998).

Sin embargo, el papel de las BAL como reservorio de resistencia a los antibióticos que puede ser transmitido hacia otras especies de microorganismos patógenos es identificado, en la actualidad, como un importante riesgo potencial para la salud (Teuber *et al.*, 1999; Marshall *et al.*, 2009; Van Reenen & Dicks, 2011).

El objetivo principal de este estudio ha sido la obtención de aislados de BAL de origen aviar con potencial probiótico. Teniendo en cuenta que una de las características que deben cumplir las cepas para ser utilizadas con estos fines es la relativa a la ausencia de genes de resistencia a antibióticos transferibles, decidimos centrar nuestro muestreo en dos poblaciones particulares, los gallos de pluma de León y las perdices. Partiendo de la hipótesis de que la exposición a antibióticos sería en estos dos grupos de animales significativamente inferior a la que sufren las aves cridas en condiciones intensivas, hemos tratado de identificar la presencia de aislados de BAL con baja o nula resistencia a los antibióticos.

De acuerdo a Salminen *et al.* (1998), un aspecto fundamental en la elección de microorganismos con fines probióticos es la seguridad de los mismos, siendo *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* los géneros más utilizados, precisamente por su seguridad probada. Su empleo en alimentación durante años avala su clasificación como microorganismos GRAS o microorganismos generalmente reconocidos como seguros Sin embargo, el desarrollo de resistencia a antibióticos en cepas bacterianas es un problema de salud pública de gran relevancia que ha hecho limitar el uso de estas moléculas en medicina humana y en medicina veterinaria así como en producción animal, como promotores del crecimiento (Abbasi, 1998; Davies, 1994). La presión de selección ejercida por los antibióticos empleados en animales favorece la proliferación de microorganismos resistentes, habiéndose probado que estas resistencias tienen posibilidad de alcanzar a los seres humanos, apareciendo tanto en los microorganismos patógenos como en los microorganismos que forman parte de la microbiota. Los genes de resistencia adquiridos por estas cepas comensales constituyen un riesgo indirecto para la salud pública puesto que pueden ser transferidos hacia microorganismos patógenos.

Por este motivo, una de las condiciones que, de acuerdo a las recomendaciones de la EFSA (2012) deben de cumplir los microorganismos viables empleados como probióticos, es la relativa a su resistencia a antimicrobianos. En ningún caso los probióticos pueden incrementar el riesgo de transmisión de resistencias antimicrobianas aportando genes de resistencia transferibles a las comunidades microbianas. Este proceso de adquisición de genes exógenos es el resultado de mecanismos de intercambio de información genética entre bacterias. De forma general, el riesgo potencial de diseminación horizontal de la resistencia intrínseca es considerado como nulo o muy bajo pero el riesgo de diseminación de las resistencias codificadas en genes externos es considerado como muy elevado, por lo que se debe de evitar.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto, se recomienda que la selección de microorganismos que se pretendan emplear como aditivos alimentarios debe estar orientada hacia aquellos con menor grado de resistencia antimicrobiana frente a una selección de antimicrobianos de uso habitual en medicina humana y veterinaria. Entre estos antibióticos, según el criterio de la EFSA, se deben incluir como mínimo los siguientes: ampicilina, vancomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina y cloranfenicol (EFSA, 2012). Es por ello que en el presente estudio, la primera prueba realizada en el proceso de selección de microorganismos con potencial probiótico fue la de valoración de las resistencias antimicrobianas en los aislados de BAL de origen aviar obtenidos.

La técnica empleada para la determinación de la sensibilidad a antibióticos fue el método de microdilución en caldo sobre placas de 96 pocillos. Esta técnica permite estimar valores de CMI, necesarios para conocer el verdadero comportamiento de los aislados. Diferentes autores han reportado diferencias en los resultados proporcionados por diferentes técnicas aunque la mayoría de los trabajos coinciden en señalar los métodos de dilución en caldo como los más adecuados, particularmente en el caso de bacterias anaerobias como son las BAL. Además, de acuerdo a las recomendaciones del CLSI y de la EFSA, se incluyeron como controles de calidad de la técnica dos cepas de referencia.

A partir de los 96 aislados recuperados de las muestras de heces y de diferentes tramos del tracto digestivo de gallos de pluma de León y perdices que fueron confirmados como BAL en función de los resultados de la tinción de Gram y de la prueba de la catalasa se seleccionaron un total de 48 en función de las características de su crecimiento. Algunos aislados fueron descartados por las dificultades asociadas a su cultivo rutinario en las condiciones empleadas durante el presente estudio o por no haber sido adecuadamente recuperados tras la congelación.

La prueba de sensibilidad a los antibióticos se realizó a estos 48 aislados de BAL seleccionados, que se enfrentaron a los 9 antibióticos anteriormente mencionados. De acuerdo a los puntos de corte propuestos por la EFSA (2012), los aislados fueron clasificados como resistentes (valores de CMI superiores al límite superior del rango de punto de corte propuesto) o sensibles (valores de CMI igual o inferior al límite inferior del rango de puntos de corte propuestos). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7, destacándose en color verde oscuro los aislados resistentes y en color verde claro los que cumplieron los objetivos de sensibilidad antimicrobiana para cada uno de los antibióticos valorados.

Tabla 7. Concentración mínima inhibitoria (CMI) (mg/L) frente a los nueve antibióticos valorados para los 48 aislados de bacterias del ácido láctico.

BAL	ANTIBIOTICOS y rango de CMI (mg/L) propuesto como punto de corte								
	Ampi (1-4)	Vanc (2)	Gent (8-32)	Kana (16-64)	Strep (16-64)	Clind (1-2)	Eritro (1)	Tetra (4-32)	Clora (4-8)
3	≤ 0,125	0,025	0,5	4	2	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125
5	0,025	1	64	512	256	≤ 0,125	2	≤ 0,125	0,5
7	0,025	0,025	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125	4	2
8	32	32	64	512	256	32	32	256	64
11	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125	8	4	≤ 0,125	≤ 0,125	8	4
12	0,5	4	8	128	256	1	1	64	2
13	0,025	1	64	512	256	4	4	≤ 0,125	≤ 0,125
15	32	32	64	64	256	32	32	256	≤ 0,125
17	0,5	≤ 0,125	≤ 0,125	8	8	≤ 0,125	≤ 0,125	2	0,5
19	0,025	0,5	4	64	4	0,125	0,025	≤ 0,125	≤ 0,125
21	≤ 0,125	0,025	64	128	256	1	≤ 0,125	≤ 0,125	0,5
23	≤ 0,125	32	2	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125	2	4
24	0,5	1	64	512	256	2	0,025	16	4
29	≤ 0,125	0,125	64	2	4	≤ 0,125	≤ 0,125	1	≤ 0,125
30	0,025	0,025	64	512	256	0,5	≤ 0,125	2	0,5
33	≤ 0,125	≤ 0,125	64	512	256	16	1	≤ 0,125	2
35	1	16	8	64	256	1	2	2	4
39	1	0,025	0,5	≤ 0,125	≤ 0,125	0,025	0,5	8	4
40	≤ 0,125	0,5	64	512	256	0,025	1	≤ 0,125	4
43	≤ 0,125	1	4	512	8	2	2	≤ 0,125	≤ 0,125
45	≤ 0,125	≤ 0,125	2	64	8	≤ 0,125	0,025	4	2
47	≤ 0,125	1	64	512	256	1	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125
48	1	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125	2	0,5
53	1	16	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125	16	2	≥ 0,125	1
54	≤ 0,125	0,5	64	512	256	0,5	8	64	2
57	32	32	64	256	128	32	≥ 0,125	64	16
59	4	8	64	512	256	2	8	256	2
60	4	1	16	32	32	8	32	256	8
61	4	0,5	64	64	128	1	4	64	16
65	4	8	64	128	256	4	16	128	1
66	0,025	1	4	64	16	0,025	0,025	64	2
67	1	1	2	128	64	0,025	0,025	8	4
68	1	32	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125	16	4	4
70	≤ 0,125	1	1	8	16	≤ 0,125	0,025	≤ 0,125	16
71	1	0,5	0,5	16	8	1	0,025	8	4
72	0,025	0,5	≤ 0,125	16	64	1	1	64	16
75	2	2	8	32	16	≤ 0,125	≤ 0,125	32	≤ 0,125
77	2	2	4	32	16	0,025	0,025	64	4
78	8	2	≤ 0,125	16	≤ 0,125	≤ 0,125	2	≤ 0,125	1
81	0,025	2	0,5	4	2	0,5	0,025	64	0,5
83	0,025	2	16	≤ 0,125	≤ 0,125	1	0,025	32	2
84	1	1	16	256	8	≤ 0,125	0,025	8	8
87	2	1	8	128	128	≤ 0,125	0,025	16	8
91	2	2	8	128	128	≤ 0,125	0,5	16	8
92	2	0,5	8	128	256	≤ 0,125	0,5	32	8
94	1	≤ 0,125	≤ 0,125	16	32	≤ 0,125	1	4	1
95	0,5	2	1	16	8	≤ 0,125	≤ 0,125	4	1
96	0,5	0,5	4	16	64	≤ 0,125	0,025	1	0,5

En color verde oscuro se resaltan los valores de CMI superiores al rango de punto de corte propuesto y en color verde claro los valores de CMI menores o iguales a este rango. **Ampi** (Ampicilina), **Vanc** (Vancomicina), **Gent** (Gentamicina), **Kana** (Kanamicina), Estreptomina (**Strep**), Clindamicina (**Clind**), Eritromicina (**Eritro**), Tetraciclina (**Tetra**), Cloranfenicol (**Clora**).

Resistentes: Valores de CMI > al límite superior del rango de punto de corte propuesto por la EFSA (2012).

Sensibles: Valores de CMI ≤ al límite inferior del rango de punto de corte propuesto por la EFSA (2012).

Resulta destacable el hecho de que el 29,1 % de los aislados evaluados, identificados como aislados: 3, 7, 11, 17, 19, 39, 45, 48, 71, 75, 83, 94, 95 y 96 presentaron valores de CMI inferiores a los valores propuestos por la EFSA (2012), pudiendo ser clasificados como sensibles a todos los antibióticos valorados. En base a este resultado, estos 14 aislados fueron seleccionados para la realización del resto de las pruebas de evaluación de la actividad probiótica.

Cabe destacar que solo 1 aislado de BAL identificado como aislado 8, mostró resistencia a todos los antibióticos, lo que representa un 2 % sobre el total de aislados de BAL valorados. Dos de los aislados (4,1 %), identificados como aislados 15 y 57, fueron resistentes a 7 de los antibióticos valorados. El primero mostró resistencia a ampicilina, vancomicina, gentamicina, estreptomina, clindamicina, eritromicina y tetraciclina, mientras que el segundo mostró resistencia a ampicilina, vancomicina, kanamicina, estreptomina, clindamicina, tetraciclina y cloranfenicol. Un único aislado (2 %) mostró resistencia a 6 antibióticos: vancomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomina, eritromicina y tetraciclina (aislado 59). Se observó resistencia del 6,2 % de los aislados de BAL valorados a 5 antibióticos (aislados 13, 54 y 61); el primero fue resistente a gentamicina, kanamicina, estreptomina, clindamicina y eritromicina, el segundo mostró resistencia frente a gentamicina, kanamicina, estreptomina, tetraciclina y eritromicina mientras que el tercer aislado evidenció resistencia frente a gentamicina, estreptomina, eritromicina, tetraciclina y cloranfenicol.

El 4,1 % de los aislados mostró resistencia a 4 antibióticos, aislados 5 y 33; el primero mostró resistencia a gentamicina, kanamicina, estreptomina y eritromicina y el segundo fue resistente a gentamicina, kanamicina, estreptomina y clindamicina.

La resistencia a 3 o menos de los antibióticos valorados fue el hallazgo más común, detectándose en casi la mitad de los aislados valorados (43,5 %). Mostraron resistencia a 3 de los antibióticos valorados el 14,5 % de los aislados (aislados 12, 21, 24, 30, 35, 40, 47, 53 y 60); el aislado 12 fue resistente a

kanamicina, estreptomina y tetraciclina mientras que los aislados 21, 24, 30, 40 y 47 fueron resistentes a gentamicina, kanamicina y eritromicina y el aislado 53 fue resistente a vancomicina, clindamicina y eritromicina.

Fueron resistentes a dos de los antibióticos incluidos en el presente estudio los aislados 43, 68, 72, 78, 87, 91 y 92 (14,5 % del total). El aislado 43 fue resistente a la kanamicina y eritromicina, el 68 a vancomicina y eritromicina, el 72 mostró resistencia frente a tetraciclina y cloranfenicol y el 78 evidenció resistencia frente a los antibióticos ampicilina y eritromicina.

Finalmente, el mismo porcentaje de aislados, 14,5 %, presentó resistencia a uno solo de los antibióticos; el aislado 23 mostró resistencia a la vancomicina, el aislado identificado como 29 a la gentamicina, el aislado 67 fue resistente a la kanamicina, el 70 mostró resistencia al cloranfenicol y los aislados 66, 77 y 81 fueron resistentes a la tetraciclina.

La distribución de los valores de CMI de los aislados de BAL frente a los diferentes antibióticos se muestra en la Tabla 8 y la proporción de aislados clasificados como sensibles o resistentes y la mediana de la CMI obtenida para uno de ellos en la Tabla 9.

Tabla 8. Distribución de la CMI ($\mu\text{g/mL}$) obtenida por los 48 aislados de bacterias del ácido láctico frente a los antibióticos estudiados.

	Concentraciones Mínimas Inhibitorias($\mu\text{g/mL}$)												
	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,025	\leq 0,125
Ampi					3		1	4	5	9	5	9	12
Vanco					5	2	2	1	7	11	8	5	7
Genta				15	1	3	6	5	3	2	4		9
Kana	11	2	7	6	3	6	3	2	1				7
Estre		16	4	3	2	4	6	3	2				8
Clind					3	2	1	2	3	8	3	5	21
Eritro					3	2	2	2	5	5	3	13	13
Tetra		4	1	8	3	3	5	5	5	2			12
Clora				1		4	5	10	8	5	7		8

Ampi (Ampicilina), **Vanco** (Vancomicina), **Genta** (Gentamicina), **Kana** (Kanamicina), **Estre** (Estreptomina), **Clind** (Clindamicina), **Eritro** (Eritromicina), **Tetra** (Tetraciclina) y **Clora** (Cloranfenicol).

Tabla 9. Proporción de sensibles, resistentes y mediana de la distribución de las MCI de los 48 aislados de bacterias del ácido láctico frente a los diferentes antibióticos.

Antibióticos	% Aislados Sensibles	% Aislados Resistentes	Medianas de la distribución de las CMI ($\mu\text{g/mL}$) de los antibióticos
Ampicilina	91,67	8,33	0,5
Vancomicina	81,25	18,75	1
Gentamicina	68,75	31,25	8
Kanamicina	58,34	41,66	64
Estreptomina	58,34	41,66	32
Clindamicina	83,34	16,66	0,125
Eritromicina	70,84	29,16	0,125
Tetraciclina	72,92	27,08	6
Cloranfenicol	89,59	10,41	2

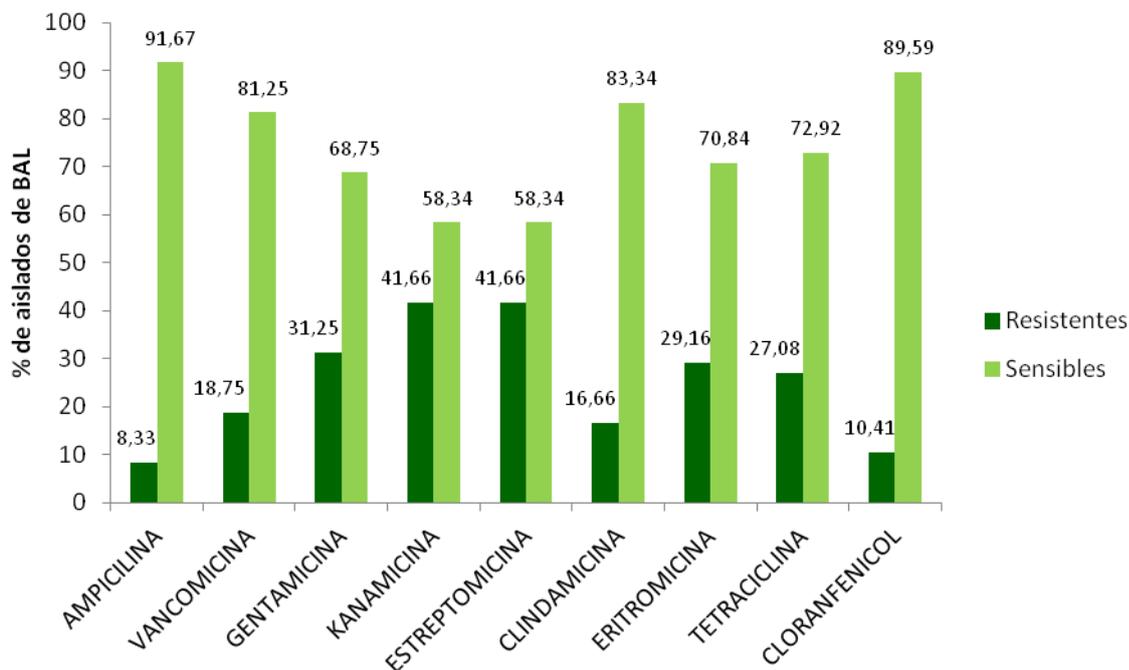
Los valores más altos de CMI en nuestro trabajo se observaron frente a la kanamicina, mostrando 11 aislados una CMI de 512 $\mu\text{g/mL}$, 2 aislados una CMI de 256 $\mu\text{g/mL}$ y 7 aislados un valor de CMI de 128 $\mu\text{g/mL}$. En global, un total de 20 aislados de BAL tuvieron una CMI por encima de los valores de los puntos de corte propuestos por la EFSA (2012). La mediana de la CMI para la kanamicina en el presente estudio fue de 64 $\mu\text{g/mL}$.

Los aislados de BAL también presentaron valores elevados de CMI para la estreptomicina. Así, 16 aislados tuvieron una CMI de 256 $\mu\text{g/mL}$ y 4 aislados de 128 $\mu\text{g/mL}$, siendo, en total, 20 los aislados que presentaron valores de CMI superiores a los propuestos por la EFSA (2012), que en el caso de este antimicrobiano están en el rango entre 16 y 64 $\mu\text{g/mL}$. La mediana de los resultados proporcionados por los aislados de BAL valorados en el presente trabajo fue de 32 $\mu\text{g/mL}$ para la estreptomicina, detectándose 28 aislados con valores de CMI inferiores a los sugeridos por la EFSA (2012).

Igualmente, los valores de CMI para la tetraciclina fueron relativamente elevados, observándose 4 aislados con CMI de 256 $\mu\text{g/mL}$ y 1 aislado con CMI de 128 $\mu\text{g/mL}$. Un total de 13 aislados mostraron valores superiores a los propuestos por la EFSA (2012) y 35 aislados presentaron valores de CMI inferiores, rango entre 4 y 32 $\mu\text{g/mL}$. En nuestro trabajo, la mediana de la CMI para la tetraciclina fue de 6 $\mu\text{g/mL}$.

La distribución de los aislados de BAL en función de su resistencia o sensibilidad a los 9 antibióticos evaluados se muestra en la Figura 6.

Figura 6. Distribución de las proporciones de aislados de bacterias del ácido láctico resistentes y sensibles a los antibióticos evaluados.



El porcentaje más elevado de aislados sensibles o con valores de CMI iguales o inferiores a los propuestos por la EFSA fue observado para un antibiótico β -lactámico, la ampicilina, con un 91,67 % de aislados sensibles. Cabe destacar que Kolar *et al.* (2002) obtuvieron valores aún más elevados, con un 100 % de aislados sensibles a la penicilina y a la ampicilina entre las BAL recuperadas de pollos, atribuyendo este resultado a la disminución en el uso de este antibiótico beta-lactámico en las explotaciones de pollos de engorde así como en otros tipos de ganado. Por el contrario, otros trabajos han sugerido una mayor frecuencia para esta resistencia. Así, Bassam (2011) describe resistencia a la ampicilina y la penicilina G en el 62,5 % de los aislados de *Leuconostoc mesenteroides lactis*. De forma general, se ha propuesto que los lactobacilos son sensibles a las penicilinas y otros beta-lactámicos, aunque muestran ligera resistencia a la oxacilina y a las cefalosporinas (Danielsen & Wind, 2003; Coppola *et al.*, 2005).

Tanto los antibióticos del grupo de los β -lactámicos como los glicopéptidos (vancomicina, teicoplanina y avoparcina), la bacitracina y las estreptograminas (virginiamicina, quinupristina y dalfopristina) tienen un mecanismo de acción similar, basado en el ataque a la pared bacteriana, ejerciendo su efecto a través del bloqueo de su biosíntesis. Todos ellos interfieren en la síntesis de los peptidoglicanos, elementos esenciales de la estructura de la pared bacteriana. Los defectos de la pared celular que generan se asocian a la lisis bacteriana (Errecalde, 2004).

Entre los mecanismos de la resistencia antibiótica a β -lactámicos destacan los relacionados con la presencia de enzimas β -lactamasas que hidrolizan el anillo β -lactámico de penicilinas y cefalosporinas, originando derivados biológicamente inactivos (Charteris *et al.*, 1998; Coppola *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2005). Otro mecanismo de acción está relacionado con la alteración de la diana y genera incapacidad de unión del antibiótico a sus receptores específicos (Walsh, 2000). Las modificaciones estructurales que afectan a las proteínas de unión a penicilina (PBPs), presentes en la pared bacteriana de algunas cepas, son el mecanismo de resistencia de algunos de los aislados resistentes a estos antibióticos. Cabe destacar que estas alteraciones de las PBPs son siempre adquiridas y que casi siempre se deben a mutaciones cromosómicas.

La sensibilidad de los aislados de BAL frente al cloranfenicol en nuestro trabajo fue también muy elevada, próxima al 90 %. Tan solo estuvieron por encima de los valores de punto de corte propuestos por la EFSA (2012) el 10,41 % de los aislados valorados. Resultados muy superiores de resistencia han sido reportados por otros autores. Así, Sieo *et al.* (2005) describieron un 100 % de resistencia al cloranfenicol (CMI \geq 200 g/mL) en aislados de *Lactobacillus* recuperados del tracto gastrointestinal de pollos y un resultado similar fue descrito por Toomey *et al.* (2010) en aislados de BAL. Lin *et al.* (1996) describieron, igualmente, resistencia al cloranfenicol y a la eritromicina en aislados de *Lactobacillus* recuperados a partir de muestras de aves de corral.

Entre las causas que han sido propuestas para explicar la elevada prevalencia de la resistencia a cloranfenicol podemos destacar que este antimicrobiano de amplio espectro y con actividad contra bacterias Gram positivas y negativas se ha utilizado durante mucho tiempo, tanto para el tratamiento de procesos de etiología infecciosa como a modo de promotor del crecimiento en producción animal. Sin embargo, su utilización está limitada en la actualidad por haberse asociado a un importante efecto tóxico, causando graves problemas de salud en humanos como la anemia aplásica y el síndrome gris en recién nacidos. Además, se ha demostrado que su empleo en vacas lecheras se relaciona con infecciones por *Salmonella* resistentes al cloranfenicol (Spika *et al.*, 1987; Torres & Zarazaga, 2000).

La diana donde ejerce su acción el cloranfenicol es el ribosoma, actuando a nivel de la subunidad 50S y ocasionando la inhibición de la síntesis proteica (Errecale, 2004). Entre los mecanismos de resistencia descritos destacan los basados en la modificación del antibiótico, asociados a la presencia de la enzima cloranfenicol-acetil-transferasa, que acetila los grupos hidroxilos de la molécula. Tannock *et al.* (1994) han descrito la presencia de plásmidos que incluyen genes que codifican resistencia al cloranfenicol en aislados de lactobacilos. Así, el plásmido pT82 que ha sido identificado en una cepa de *Lactobacillus reuteri* incorpora un gen que codifica una cloranfenicol-acetil-transferasa similar a la codificada en el plásmido pC194 de *S. aureus* (Lin *et al.*, 1996).

Se obtuvo en nuestro trabajo una sensibilidad de los aislados de BAL frente a la clindamicina del 83,34 %. Este es un antibiótico semisintético derivado de la lincomicina, por substitución de un átomo de cloro por un grupo hidroxilo. Las lincosamidas son antibióticos inhibidores de la síntesis proteica, actuando a nivel de la subunidad ribosomal 50S e inhibiendo la traslocación (Errecale, 2004). Cauwerts *et al.* (2007) evaluaron la sensibilidad a la clindamicina en una colección de aislados de *Lactobacillus* obtenidos a partir de contenido cloacal de pollos broiler y demostraron la presencia de resistencia adquirida en una proporción significativa. Más de la mitad de las cepas

resistentes fueron portadoras de un gen *erm(B)*, *erm(C)*, *mef(A)*, *inu(A)* o de una combinación de algunos de estos genes.

Aunque en nuestro trabajo la sensibilidad de los aislados de BAL al glicopéptido vancomicina fue del 81,25 %, debemos tener en cuenta que este antibiótico constituye el último recurso terapéutico en infecciones causadas por microorganismos con multiresistencia por lo que debe valorarse con gran atención la posibilidad de transferencia de esta resistencia a cepas patógenas como las de *S. aureus* meticilin resistente (Woodford *et al.*, 1995; Leclercq & Courvlin, 1997). Además se ha señalado que, aun cuando los valores de resistencia a vancomicina, como ha ocurrido en nuestro trabajo, sean bajos o nulos, esta resistencia puede ser fácilmente adquirida por las BAL al estar dicha resistencia codificada en plásmidos o transposones. Por este motivo se recomienda que antes de su utilización con fines probióticos se valore de forma particular la capacidad de los aislados a emplear para adquirir o transferir la resistencia a dicho antibiótico (FAO/WHO, 2002).

Resultados similares a los obtenidos en este estudio en lo que respecta a la sensibilidad a la vancomicina han sido reportados por otros trabajos (Cueto & Aragón, 2012; Lapierre, 1997). Por el contrario, Leclercq & Courvlin (1977), Woodford *et al.* (1998) y Danielsen & Wind (2003), en investigaciones similares, han descrito proporciones de aislados resistentes a vancomicina más importantes. En este mismo sentido, se ha identificado una elevada proporción de resistencia a vancomicina en aislados de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* (Hamilton-Miller & Shah, 1998; Geimonde *et al.*, 2013).

El mecanismo de acción de este glicopéptido es a través del bloqueo de la síntesis de la pared bacteriana, interfiriendo en la síntesis de peptidoglicanos, y provocando la lisis bacteriana (Danielsen & Wind, 2003; Coppola *et al.*, 2005).

Diversos estudios han propuesto que los aislados de BAL de especies heterofermentativas pueden presentar resistencia intrínseca a la vancomicina (Kolar *et al.*, 2002; Danielsen & Wind, 2003). Así, varias especies de

Lactobacillus muestran resistencia intrínseca o natural (Nelson, 1999; Mathur & Singh, 2005; Blandino *et al.*, 2008). Esta resistencia no puede ser transferida de forma horizontal (Klein *et al.*, 2000) y está asociada a la ausencia de diana molecular de acción. Así, por ejemplo, la resistencia a este glicopéptido en muchas especies de *Lactobacillus* y *Leuconostoc* es consecuencia de la ausencia del dipéptido D-Alanina-D-Alanina, que en estos microorganismos se substituye, de forma natural, por D-Alanina-D-lactato (Elisha & Courvalin, 1995). En otras ocasiones, los genes que codifican para la resistencia a vancomicina se localizan en el ADN cromosómico, siendo muy bajo el riesgo asociado a su translocación (Klein *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2005; Delgado *et al.*, 2005; Ocaña *et al.*, 2006; Ashraf & Shah, 2011).

La sensibilidad a la tetraciclina determinada entre los aislados de BAL recuperados en el presente estudio fue del 72,92 % mientras que se describieron valores superiores o iguales al rango propuesto por la EFSA (2012) en el 27,08 % de los aislados. Un valor ligeramente inferior fue reportado por Sieo *et al.* (2005), con un 17 % de aislados de *L. acidophilus* resistentes entre los aislados del tracto gastrointestinal de broilers. Igualmente se ha descrito la presencia de resistencia a tetraciclina y vancomicina en aislados de *L. brevis* (Fukao *et al.*, 2009).

Las tetraciclinas fueron ampliamente utilizadas como promotores del crecimiento en los años 60 y 70 (Wegener, 2003) y los determinantes de resistencia correspondientes son los más frecuentemente descritos en las BAL que se aíslan a partir de alimentos (Roberts, 2005; Thaker *et al.*, 2010; Devirgiliis *et al.*, 2011). Este grupo de antibióticos se une al ribosoma, a la subunidad ribosomal 30S, inhibiendo la síntesis de proteínas.

Se ha descrito que la resistencia a las tetraciclinas es un ejemplo perfecto de resistencia transmitida por plásmidos portadores de genes de resistencia, denominados en este caso genes *tet* (Chopra & Roberts, 2001). En la actualidad se conocen más de 20 genes *tet* diferentes, capaces de transferir resistencia a tetraciclina u oxitetraciclina. Estos genes aportan a las bacterias receptoras la capacidad de resistencia mediante diferentes

mecanismos: alteraciones en la membrana externa bacteriana que disminuyen la penetración intracelular del fármaco, resistencia por protección de los ribosomas y resistencia por inactivación enzimática. Además, se desconoce el mecanismo de acción por el cual ciertos de estos genes como el *tet(U)* o el *tet(M)* confieren resistencia a las bacterias receptoras, sospechándose que deben existir otros mecanismos de acción diferentes a los ya descritos (Williams & Heymann, 1998; Chopra & Roberts, 2001).

Diferentes investigadores han reportado la presencia del gen *tet(M)* en aislados de *L. acidophilus* (Cataloluk & Gogebakan, 2004), *L. alimentarius* (Gevers *et al.*, 2003), *L. casei* (Cataloluk & Gogebakan, 2004), *L. crispatus* (Cataloluk & Gogebakan, 2004), *L. curvatus* (Gevers *et al.*, 2003), *L. gasseri* (Cataloluk & Gogebakan, 2004) o *L. plantarum* (Cataloluk & Gogebakan, 2004). Este gen codifica para una proteína de protección ribosomal. Otros genes de resistencia a tetraciclinas identificados en aislados de *Lactobacillus* incluyen *tet(K)*, *tet(S)*, *tet(W)*, *tet(36)*, *tet(O)* o *tet(Q)* que codifican proteínas secretoras o de protección ribosomal (Chopra & Roberts, 2001; Villedieu *et al.*, 2003; Roberts, 2005).

De forma general, los genes de resistencia *tet* son altamente movilizables, debido a su asociación con elementos transponibles (Clewell *et al.*, 1995; Rice, 1998). Estas asociaciones también han sido frecuentemente reportadas en el caso de los genes que codifican la resistencia a eritromicina, que también se encuentran entre los factores determinantes de resistencia más extendidos entre las BAL transmitidas por los alimentos (Mathur & Singh, 2005; Ammor *et al.*, 2007). Florez *et al.* (2005) describieron la presencia de genes que confieren resistencia a varios antimicrobianos (cloranfenicol, eritromicina, estreptomina, tetraciclina, y vancomicina) en plásmidos identificados en aislados de *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Enterococcus* recuperados de diferentes alimentos. En este mismo sentido, Ammor *et al.* (2008) demostraron la presencia de dos genes de resistencia a tetraciclina, *tet(M)* y *tet(L)*, co-existentes en una cepa de *L. sakei*, dentro de un elemento de tipo transposón y de un plásmido, respectivamente. Igualmente se ha comprobado que una cepa resistente a la tetraciclina de *L. paracasei* de origen lácteo presentaba un gen

tet(M) asociado a un transposón Tn916 que podría transferirse, aunque con baja frecuencia, a *E. faecalis* (Devirgillis *et al.*, 2009).

Según Bryan & Kwan (1981a) la penetración de tetraciclina en las células se ve reducida cuando las porinas disminuyen o se modifican. La ausencia de transporte mediada por los citocromos es causa de resistencia natural a los aminoglicósidos en microorganismos anaerobios como las bifidobacterias. Otro mecanismo de acción está asociado a la secreción del antibiótico al exterior celular una vez que ha sido incorporado. De esta forma, la expulsión de tetraciclina por proteínas de membrana reduce la concentración intracelular (Chopra & Roberts, 2001).

El 70,8 % de los aislados de BAL valorados mostraron valores de CMI para la eritromicina menores al límite inferior del rango propuesto por la EFSA (2012). Por el contrario, el 29,2 % de los aislados fueron clasificados como resistentes a este macrólido. Numerosos trabajos han reportado previamente la existencia de resistencia a eritromicina en aislados de BAL. Blandino *et al.* (2008) describieron esta resistencia en aislados de *Lactobacillus*. Sieo *et al.* (2005) reportaron un 58 % de aislados de *Lactobacillus* resistentes a eritromicina entre los recuperados del tracto gastrointestinal de broilers. Bassam (2011) encontró un 75 % de aislados del género *Leuconostoc* resistentes a este macrólido. De igual modo Axelsson *et al.*, (1998), corroboró la resistencia a la eritromicina de *Lactobacillus*, la cual estuvo relacionada con un gen plasmidial.

Cabe destacar que los macrólidos como la eritromicina y sus sucesores se introdujeron para combatir los problemas asociados a la resistencia a la meticilina. De acuerdo a Lapierre (1997), los genes involucrados con mayor frecuencia en la resistencia a macrólidos son *mef(A)*, *erm(A)* y *erm(B)*. El gen *mef(A)* codifica una bomba de flujo mientras que los genes *erm(A)* y *erm(B)* codifican para enzimas metilasas que modifican el sitio de unión del antimicrobiano. En este sentido, se ha comprobado que en algunas cepas la resistencia está mediada por una metil-transferasa que incorpora un grupo metilo en el residuo de adenina situado en la posición 2058 del RNAr 23S o en

posiciones adyacentes (Bussiere *et al.*, 1998). De igual forma, las cepas se convierten en resistentes cuando se sustituye, por mutación, el residuo de adenina de esta posición por guanina (Lucier *et al.*, 1995).

Estudios recientes han permitido demostrar que el gen *erm(B)* es el más frecuentemente identificado en los aislados resistentes a eritromicina. En el caso concreto de aislados de BAL de origen aviar, 28 de un total de 35 aislados resistentes a eritromicina presentaron este gen *erm(B)*, un aislado presentó el gen *erm(A)* y otro el gen *mef(A)* (Lapierre, 1997). Además, se ha propuesto que el gen *erm(B)* se asocia en ocasiones a genes de resistencia a tetraciclina como el gen *tet(M)* (Toomey *et al.*, 2010). Este hecho ha sido demostrado en aislados de *L. paracasei* (Huys *et al.*, 2008; Comunian *et al.*, 2010), de *L. plantarum* y de *L. salivarius* (Nawaz *et al.*, 2011). También se ha descrito la presencia simultánea de genes de resistencia *tet(W)* y *erm(B)* en *L. paracasei* (Huys *et al.*, 2008; Comunian *et al.*, 2010) aunque su posible asociación genética no está, en este caso, claramente establecida. De igual manera, se ha comprobado la existencia de aislados de BAL como los de *L. fermentum* en los que coinciden genes de resistencia a tetraciclina y eritromicina: genes *tet(S)*, *tet(W)*, *tet(K)*, *tet(L)* o *tet(O)* y genes *erm(C)* o *msr(C)* (Thumu & Halami, 2012).

En lo que respecta a la resistencia de los aislados de BAL a los aminoglicósidos, gentamicina, kanamicina y estreptomicina, en nuestro trabajo las proporciones más elevadas de sensibilidad se detectaron para la gentamicina (68,75 %) siendo ligeramente inferiores para la kanamicina y estreptomicina. La proporción de aislados para los que la CMI fue superior o igual al rango definido por la EFSA fue del 58,34 % para la kanamicina y estreptomicina y de 68,75 % para la gentamicina. Estos valores son similares o inferiores, en general, a los reportados en otros estudios (Charteris *et al.*, 1998; Coppola *et al.*, 2005). Bassam (2011) describió un 50 % de aislados de *Leuconoctoc* resistentes a gentamicina, estreptomicina y kanamicina mientras que Majhenic & Matijasic (2001) encontraron una elevada frecuencia de resistencia a la kanamicina y la neomicina en aislados de *Lactobacillus*. Por otra parte, Alvarado *et al.* (2009) describieron la existencia de resistencia a ciprofloxacina, gentamicina y kanamicina en 10 cepas de *Lactobacillus* aisladas

del pastizal de una finca lechera mientras que Vankerckhoven *et al.* (2008) reportaron la resistencia de aislados de *Lactobacillus plantarum* a la gentamicina, kanamicina y estreptomina.

El mecanismo de acción de los antibióticos aminoglicósidos está ligado a la inhibición de la síntesis proteica. Al igual que las tetraciclinas, provocan una parada en la traducción a nivel de la subunidad ribosomal 30S. De acuerdo a Magnet & Blanchard (2005) la principal diana biológica de este grupo de antimicrobianos es el ribosoma bacteriano; los aminoglicósidos se unen específicamente a la sub-unidad menor del ribosoma bacteriano ocasionando defectos en la lectura del ARN mensajero e induciendo, consecuentemente, errores en las proteínas sintetizadas. Además, se ha descrito que posiblemente estas moléculas inducen alteraciones en las membranas que pueden colaborar en su efecto bactericida (Errecalde, 2004).

El profuso empleo de la estreptomina desde su descubrimiento en el año 1952 se ha asociado al desarrollo de aislados resistentes. La aparición de nuevos derivados aminoglicósidos como la kanamicina o la gentamicina y su incorporación al mercado, se ha asociado, igualmente, al desarrollo de resistencias. De forma similar a como ocurre con otros microorganismos anaerobios, la resistencia a aminoglicósidos en las BAL está determinada por la ausencia del transporte ligado a la cadena de citocromos (Bryan & Kwan, 1981; Condon, 1983).

En lo que respecta a las bases moleculares de la resistencia a aminoglicósidos, se han descrito varios genes implicados; básicamente se incluyen genes que codifican aminoglicósido acetiltransferasas (AACs), genes que codifican aminoglicósido nucleotidiltransferasas (ANTs) y genes que codifican aminoglicósido fosfotransferasas (APHs). Todos ellos pueden ser transferidos y han sido descritos en muy diferentes especies bacterianas como *Campylobacter coli* (Quin *et al.*, 2012) y *Staphylococcus aureus* (Argudin *et al.*, 2014). Suárez & Mendoza (1991) establecieron que esas enzimas, adenil transferasas (AMP), fosforil transferasas (-PO₃) o acetil transferasas, modifican los aminoglicósidos de manera que reducen o pierden su afinidad por

el ribosoma (Shaw *et al.*, 1993). En este mismo sentido, la adición de un grupo glutatión a la fosfomicina por una glutatión S-transferasa inactiva el antibiótico. Los estudios realizados por Ouba *et al.* (2008) demostraron la existencia de amplicones positivos de algunos de estos genes de resistencia (*APH(3')-III*, *aadA*, *AADE* y *tet(S)*) en aislados de *Lactobacillus* resistentes a aminoglicósidos con más frecuencia que en las cepas sensibles a estos antibióticos.

De forma general, aunque clásicamente se señalaba que las BAL presentan una baja proporción de resistencias adquiridas (Perreten *et al.*, 1997; Teuber *et al.*, 1999), los trabajos más recientes apuntan al incremento de estas resistencias en las BAL aisladas tanto del hombre como de los animales domésticos o de alimentos. La aparición de resistencia a antibióticos es un fenómeno natural que puede ser debido a la diseminación de los sistemas de defensa que presentan las cepas productoras o a cambios en genes que codifican para proteínas que modifican su actividad, hasta ser capaces de modificar el blanco de acción o de modificar a los propios antibióticos para transformarlos en moléculas sin actividad biológica (Hawkey, 2000; Davies, 1994). Ambos tipos de procesos contribuyen para alcanzar la enorme diversidad y variabilidad en los mecanismos de resistencia (Walsh, 2000).

Como hemos visto, las bases moleculares de estas resistencias son idénticas a las descritas para otros grupos bacterianos, por lo que cabe pensar que estas resistencias son, en su gran mayoría, resistencias adquiridas, de forma relativamente reciente y a partir de las resistencias existentes en otros microorganismos con los que comparten hábitat. En este sentido, resulta de gran interés el conocer los procesos de intercambio génico, que en las BAL son los mismos que en otros microorganismos, básicamente mecanismos de transformación, transducción y conjugación.

De acuerdo a lo propuesto por Shazali *et al.* (2014), el desarrollo y expansión de las resistencias a los antibióticos está ligado al empleo de los mismos, a la exposición a largo plazo a través de su empleo bien como agentes terapéuticos o profilácticos o como promotores del crecimiento, tanto

en los animales como en el hombre. Diversos trabajos han asociado los diferentes sistemas de cría animal con la presencia de resistencia a los diferentes antibióticos, reportando mayores valores de resistencia para las BAL procedentes de animales criados en sistemas intensivos, atribuyendo este resultado al mayor uso de promotores del crecimiento en este sistema de crianza en comparación con los animales mantenidos en condiciones extensivas (Berford, 2000; Edens, 2003; Souza *et al.*, 2007). En este sentido, la elección de los gallos pluma de León y perdices como origen de las BAL empleadas en el presente estudio, nos ha permitido obtener valores de resistencia similares o inferiores a los descritos previamente y obtener un cierto número de aislados de BAL con valores de CMI compatibles con las exigencias de la EFSA.

2.4.3- Valoración de la capacidad inhibitoria de crecimiento frente a patógenos

La capacidad de las BAL para inhibir el crecimiento de otros organismos en cultivos mixtos ha sido observado durante más de 70 años, habiendo recibido, comúnmente, la denominación de antagonismo láctico (Jay, 1997; Ouwehand *et al.*, 1999b; Nava, 2008). La reducción del pH y la utilización de carbohidratos disponibles han sido propuestos como el primer mecanismo de antagonismo microbiano. No obstante, también la producción de peróxido de hidrógeno y de otros radicales libres como diacetilos, isómeros D de los aminoácidos o la producción de bacteriocinas (Daeschel, 1989; Klaenhammer, 1988; Rolfe, 2000), la adherencia a los sitios de colonización de los patógenos (Savage, 1992; Gusils *et al.*, 2003; Variyam & Hoskins, 1981; Deplancke *et al.*, 2002; Lammers *et al.*, 2003) y la estimulación del sistema inmune de los hospedadores (Christensen *et al.*, 2002; Lammers *et al.*, 2003; Steidler, 2003; Dalloul *et al.*, 2003; Patterson & Burkholder, 2003; Lan *et al.*, 2005; Rondón *et al.*, 2009; Dar *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010) han sido propuestos como posibles mecanismos de acción en este efecto de inhibición.

La existencia de esta actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos en cepas de BAL justifica su empleo como probióticos con utilidad en la prevención y control de enfermedades asociadas a la presencia de microorganismos no deseables como *Salmonella*, uno de los grupos de bacterias más importantes y ampliamente difundidos en el caso de las aves domésticas. Por su importancia como agente zoonótico, su alta resistencia y amplia distribución ecológica, el elevado número de serotipos, gran variedad de hospedadores, compleja patogenia y epidemiología, el control de las salmonelosis implica a los animales, al hombre y al ambiente (Moreno,1962).

Tras la realización de la prueba con el fin de determinar el patrón de resistencia y/o sensibilidad a los antimicrobianos de los aislados de BAL recuperados de heces, duodeno, íleon y ciego de gallos de pluma de León y perdices, se seleccionaron un total de 23 aislados que fueron, en una segunda etapa, evaluados con el fin de determinar su actividad inhibitoria frente a siete microorganismos patógenos: *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli*, *E. coli* β -hemolítico, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* y *Clostridium perfringens*. Esta determinación se realizó utilizando el método agar spot test descrito por Zamora (2003). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada por otros investigadores (Geis *et al.*, 1983; McDonald *et al.*, 1990; Schillinger & Lucke, 1989; Uhlman *et al.*, 1992; Zamora, 2003). Podemos destacar, sin embargo, que existen otros métodos como la difusión en agar (Tagg *et al.*, 1976; Tsai *et al.*, 2004). La enorme variedad de sustancias antimicrobianas y de mecanismos por los cuales se produce el efecto de inhibición frente a patógenos hace que ninguna de estas técnicas sea claramente superior al resto.

En nuestro trabajo se observaron halos de inhibición con un diámetro de hasta 21 mm frente a la mayoría de los microorganismos valorados (*S. enteritidis*, *E. coli*, *E. coli* β -hemolítico, *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *L. innocua*). Por el contrario, el halo de inhibición frente a *Cl. perfringens* estuvo próximo a los 10 mm de diámetro en los pocos aislados con capacidad para inhibir la multiplicación de este patógeno.

Como se puede observar en la Tabla 10, todos los aislados de BAL valorados (100 %) mostraron actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *L. innocua*. Los halos de inhibición mostrados fueron de 21 mm para estos tres microorganismos patógenos.

El 91,3 % de los aislados demostró actividad antimicrobiana frente a *S. Enteritidis*. Esto ocurrió para los aislados de BAL identificados como 3, 7, 11, 17, 19, 29, 39, 45, 48, 66, 67, 70, 71, 75, 77, 78, 83, 84, 94, 95 y 96. Tan solo dos aislados (8,7 %), identificados como aislado 23 y 72, no inhibieron de forma significativa la multiplicación de *S. Enteritidis*.

En el caso del enfrentamiento con *E. coli* el resultado fue similar. Dos de los aislados (8,7 %), en este caso los aislados 66 y 71, no mostraron capacidad para inhibir a *E. coli* mientras que el resto (aislados 3, 7, 11, 17, 19, 23, 29, 39, 45, 48, 70, 72, 75, 77, 78, 83, 84, 94, 95 y 96) dieron lugar a halos de inhibición significativos frente a este microorganismo. Cabe destacar que tanto para *S. Enteritidis* como para *E. coli*, los halos de inhibición observados tuvieron un diámetro de entre 10 y 21 mm.

La actividad antibacteriana fue más limitada en el caso del enfrentamiento con un aislado de *E. coli* β -hemolítico. Tan solo el 26,1% de los aislados de BAL evidenció actividad frente a esta cepa, aislados identificados como 11, 13, 19, 45, 71 y 83, con halos de inhibición de 21 mm. El resto de las cepas de BAL valoradas (7, 17, 23, 29, 39, 48, 66, 67, 70, 72, 75, 77, 78, 84, 94, 95 y 96) no inhibieron el crecimiento de un aislado de *E. coli* β -hemolítico (73,9 %).

En el caso del *C. perfringens*, el 21,7 % de los aislados de BAL mostró actividad inhibitoria (aislados identificados como 11, 19, 45, 78 y 96), observándose halos de inhibición de 10 mm de diámetro. Sin embargo, el 78,3 % de los aislados (3, 7, 17, 23, 29, 39, 48, 66, 67, 70, 71, 72, 75, 77, 83, 94 y 95) no inhibieron el crecimiento de este patógeno.

Tabla 10. Diámetro del halo de inhibición (mm) obtenido al enfrentar las bacterias del ácido láctico de origen a aviar a diferentes aislados de microorganismos patógenos.

Aislado	S. Enteritidis	E. coli	E. coli hemolítico	S. aureus	L. monocytogenes	L. innocua	Cl. perfringens
3	21	21	21	21	21	21	0
7	11	21	0	21	21	21	0
11	21	21	21	21	21	21	10
17	10	21	0	21	21	21	0
19	21	21	21	21	21	21	10
23	8	21	0	21	21	21	0
29	10	21	0	21	21	21	0
39	10	21	0	21	21	21	0
45	21	21	21	21	21	21	10
48	21	10	0	21	21	21	0
66	21	7	0	21	21	21	0
67	21	21	0	21	21	21	0
70	21	10	0	21	21	21	0
71	21	8	21	21	21	21	0
72	8,5	10	0	21	21	21	0
75	11	10	0	21	21	21	0
77	10	25	0	21	21	21	0
78	21	21	0	21	21	21	10
83	21	21	21	21	21	21	0
84	21	21	0	21	21	21	0
94	21	21	0	21	21	21	0
95	21	21	0	21	21	21	0
96	21	21	0	21	21	21	10

Cepa SIN actividad antimicrobiana: diámetro del halo de inhibición < 10 mm
 Cepa CON actividad antimicrobiana: diámetro del halo de inhibición ≥ 10 mm

Cabe destacar que todos los aislados de BAL mostraron actividad antimicrobiana al menos frente a una de las cepas de bacterias patógenas ensayadas. Además, se constató que el 13 % de los aislados de BAL mostraron actividad inhibitoria frente a los 7 microorganismos patógenos valorados. Estos aislados fueron los identificados como aislados 11, 19 y 45. El 8,7 % de las BAL valoradas mostró actividad frente a 6 de los patógenos: *S. Enteritidis*, *E. coli*, *E. coli* β -hemolítico, *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *L. innocua* (aislados 3 y 83). El 73,9 % presentó actividad inhibitoria frente a 5 de los microorganismos: *S. Enteritidis*, *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *Cl. perfringens* (aislados 7, 17, 29, 39, 48, 66, 67, 70, 71, 72, 75, 77, 78, 84, 94, 95 y 96). Finalmente, el 8,7 % de los aislados de BAL fue activo frente a 4 patógenos: *S. Enteritidis*, *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *L. innocua* (aislados 23 y 66).

Un número importante de estudios ha valorado la actividad antimicrobiana de cepas potencialmente probióticas, aún no comercializadas, en aves. Los microorganismos más comúnmente estudiados con este fin incluyen bacterias de los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *E. coli*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* así como levaduras (Applegate *et al.*, 2010). Se espera que los probióticos puedan incrementar la resistencia de las aves a la colonización por patógenos sin producir efectos adversos sobre su salud. Su capacidad para reducir la colonización intestinal por *Salmonella* (Al-Zenki *et al.*, 2009; Mountzouris *et al.*, 2009; Vilà *et al.*, 2009; Higgins *et al.*, 2010; Knap *et al.*, 2011; Menconi *et al.*, 2011), *Clostridium perfringens* (Hofacre *et al.*, 1998; Knap *et al.*, 2011) o *Campylobacter* spp. (Soerjadi *et al.*, 1982; Soerjadi-Liem *et al.*, 1984; Schoeni & Wong, 1994; Santini *et al.*, 2010) ha sido demostrada por un número significativo de estudios.

La actividad inhibitoria observada en nuestro estudio en los aislados de las BAL frente a *S. aureus*, *L. innocua* y *L. monocytogenes* fue similar a la reportada por otros autores (González, 2004; Mendoza *et al.*, 2004; Sánchez, 2003; Santillán, 2004). Un efecto inhibitorio similar ha sido observado en

aislados de los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* recuperados de muestras de carne y productos cárnicos y empleando el mismo método de difusión de agar que nosotros hemos utilizado en nuestro estudio (De Martinis *et al.*, 2001). De igual forma, Monteagudo (2010) describió la actividad inhibitoria de aislados de *L. lactis* (660 y ATCC 11454), *E. fecalis* (189, 888 y 1076) y *Leuconostoc mesenteroides* (875) frente a *L. monocytogenes*. En contrapartida a nuestros resultados, este mismo trabajo describió que un aislado de *S. aureus* era la cepa con mayor capacidad de resistencia a los aislados de *Lactococcus*, *Enterococcus* y *Leuconostoc* valorados.

Lima *et al.* (2007) determinaron la capacidad inhibitoria de 474 cepas de *Lactobacillus* aisladas del intestino y el ciego de pollos broiler frente a microorganismos indicadores Gram-positivos y Gram-negativos por el método de difusión en agar. Del total de cepas aisladas, 265 demostraron actividad inhibitoria frente a *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. Resultados similares han sido obtenidos por diferentes investigadores (De Martinis *et al.*, 2001; Santillán, 2004; Savadogo *et al.*, 2006), que han reportado acción inhibitoria de las BAL frente a más de un microorganismo. Así, por ejemplo, Santillán (2004) demostró actividad inhibitoria frente a *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *S. aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) y *E. coli* (ATCC 8739).

Cabe destacar que en nuestro estudio la capacidad de inhibición de los aislados de BAL valorados frente a *L. monocytogenes* y *L. innocua* fue del 100 %. Ambas especies de *Listeria* son microorganismos patógenos que pueden contaminar alimentos de origen animal como carnes y productos lácteos, siendo responsables de infecciones alimentarias de relevancia en salud pública (OIE, 2004) y que pueden alcanzar tasas de mortalidad elevadas, de entre el 20 y el 30 % (Slutsker & Schuchat, 1999; Evans *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2008). Otros investigadores han reportado la inhibición de *L. monocytogenes* por BAL (González, 2004; Mendoza *et al.*, 2004; Sánchez, 2003; Santillán, 2004). En algún caso esta actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* se ha asociado a una bacteriocina (De Martinis *et al.*, 2001).

En contrapartida con los resultados obtenidos en este trabajo, Buncic *et al.* (2001) reportaron, para una colección de BAL, la ausencia de halo de inhibición frente a *L. monocytogenes*. Un resultado similar fue obtenido por Botina *et al.* (2008), concluyendo que el comportamiento de las BAL al ser enfrentadas a diferentes cepas de *L. monocytogenes* es muy variable. Hasta el momento, no se ha podido demostrar ninguna correlación entre la actividad antagónica de las BAL y el origen o el serogrupo de una variedad de cepas de *L. monocytogenes* (Buncic *et al.*, 2001). Sin embargo, se han propuesto diferentes hipótesis con el objetivo de explicar las diferencias en este comportamiento de las cepas de *L. monocytogenes*. Una de estas hipótesis señala que en ocasiones pueden coexistir diferentes clones individuales en los aislados. Algunos de los clones podrían disponer de mecanismos como la síntesis de enzimas capaces de degradar las bacteriocinas (Abee *et al.*, 1995). En este sentido, algunos trabajos han reportado la existencia de mutantes espontáneos de *L. monocytogenes* resistentes a ciertas bacteriocinas (Juneja & Davidson, 1993). Según Rekhif *et al.* (1994), la resistencia que presentan estos microorganismos a las bacteriocinas es un carácter estable, que persiste tras diez subcultivos de la bacteria, tanto en presencia como en ausencia de la respectiva bacteriocina. Por otra parte, de acuerdo a otros autores, las condiciones del cultivo como el pH o la temperatura, no siempre son las óptimas para permitir la producción y la acción de las bacteriocinas. Una baja concentración de las mismas impide que se lleve a cabo de forma adecuada el efecto antagónico (Messens & De Vuyst, 2002; González *et al.*, 2007).

Los halos de inhibición observados en nuestro estudio frente a *S. Enteritidis* y un aislado de *E. coli* oscilaron entre los 10 y los 21 mm. De igual manera, Pérez *et al.* (2011) reportaron halos de inhibición al enfrentar una mezcla de EC frente a *E. coli*. Otros trabajos han demostrado, igualmente, actividad antimicrobiana de aislados del género *Lactobacillus* frente a *E. coli* (Asahara *et al.*, 2001; Oyetayo *et al.*, 2003; Nowroozi *et al.*, 2004). Chuayana (2003) describió la acción bacteriostática de un aislado de *Lactobacillus casei* frente a *E. coli* y *Salmonella Typhi*. Laurencio *et al.* (2005) reportaron halos de inhibición significativos frente a *E. coli* al evaluar una mezcla de EC compuesta

por diferentes BAL y su sobrenadante, previamente neutralizado a pH 7 mediante la adición de NaOH 0,5 N y tratado con pronasa E (Merck) al 1 % con el fin de eliminar la acción asociada al pH ácido y a bacteriocinas.

Podemos destacar que la capacidad de las BAL para inhibir enterobacterias es de gran importancia dada la relevancia clínica que estas bacterias tienen en la producción animal. Durante las primeras semanas de vida de las aves criadas en sistemas intensivos en Cuba, el principal agente causal de las enfermedades diarreicas es *E. coli*. *Salmonella enterica* juega, igualmente, un papel relevante como causa de mortalidad y de enteritis. Además, en muchas ocasiones estas y otras enterobacterias participan como agentes etiológicos de infecciones secundarias a otros procesos. Así, aproximadamente en el 70 % de las micosis respiratorias diagnosticadas en pollitos se detectan, simultáneamente, infecciones por enterobacterias (García *et al.*, 2005; Sánchez, 2010).

En nuestro trabajo se incluyó, para la valoración de la actividad antimicrobiana, un aislado de *E. coli* β -hemolítico. El crecimiento de este aislado solo fue inhibido por 1 de cada cuatro aislados de BAL valorados (26 %). Resultados similares han sido reportados por De Martinis *et al.* (2001).

Finalmente, el 21,3 % de los aislados de BAL valorados presentaron halos de inhibición frente a *Cl. perfringens*. Diversos trabajos han reportado resultados similares (Castro Albornoz & Valbuena Colmenares, 2009). Se ha descrito la utilidad de las mezclas de EC frente a *Cl. perfringens*, un microorganismo patógeno asociado a procesos de enteritis necrótica (Hofacre *et al.*, 2000; Kaldhusdal *et al.*, 2001) y se ha demostrado que algunos aislados de BAL son capaces de producir bacteriocinas como la nisina, la pediocina-A, la pediocina AcH, la pediocina-VTT, la reuterina o la termofilina, con capacidad para inhibir la multiplicación de *Cl. perfringens*.

Como ya hemos indicado, los mecanismos mediante los cuales las BAL pueden ejercer efecto de inhibición sobre otros microorganismos son muy variados. En el presente trabajo no se han evaluado estos mecanismos de acción por lo que simplemente podemos especular acerca de las diferentes

opciones descritas. Collazos (2008) evaluó la capacidad de inhibición de una colección de BAL procedentes de cerdos mediante el empleo del método "agar spot test" (Zamora, 2003), el mismo que hemos utilizado en nuestro estudio, frente a *S. Typhimurium* y *S. Rissen*. Sus resultados permitieron concluir que una parte importante del efecto inhibitorio era consecuencia de la producción de ácidos orgánicos, puesto que los halos observados fueron notablemente mayores cuando se emplearon concentraciones más elevadas de glucosa en el medio de cultivo, glucosa al 2 % frente al 0,2 %, condición que favorece la producción de elevadas concentraciones de ácidos. Este mismo resultado fue reportado por Casey *et al.* (2004) al valorar el efecto antimicrobiano de aislados de *L. murinus* y *L. salivarius* de origen porcino.

Por el contrario, Boris *et al.* (2001) refieren que algunas cepas pueden presentar comportamientos diferentes y mostrar halos de inhibición superiores en los medios con baja concentración de glucosa. Este hecho ha sido descrito, por ejemplo, en aislados de *L. delbrueckii* y permite suponer que, en este caso, el efecto de inhibición podría ser consecuencia de mecanismos diferentes a la producción de ácidos orgánicos. Aunque no se llevaron a cabo pruebas que permitan probarlo, entre estos mecanismos podría encontrarse la producción de bacteriocinas.

En este mismo sentido, otros investigadores han utilizado una técnica de doble capa (Montville & Winkowski, 1997) para determinar la acción antimicrobiana de BAL aisladas de productos lácteos frente a *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *E. coli* o *S. aureus*, eliminando la glucosa de la formulación de los medios empleados, con el fin de evitar la producción de ácido láctico. Un 24,6 % de los aislados de BAL valorados mostraron capacidad para inhibir la multiplicación, con halos de inhibición que variaron entre 1 y 8 mm. Cabe suponer que el mecanismo de inhibición no estuvo asociado a la producción de ácidos sino a la acción de una bacteriocina u otro metabolito antimicrobiano producido por las BAL.

A continuación vamos a revisar los principales mecanismos de acción propuestos como posible explicación a la actividad antimicrobiana de los aislados de BAL.

Producción de bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos producidos por un gran número de bacterias y con capacidad para actuar contra otros microorganismos, generalmente microorganismos no deseados o microorganismos patógenos (Papagianni, 2003; Joerger, 2003; Katikou *et al.*, 2005; Motta & Brandelli, 2008). Por esta razón, las bacteriocinas tienen diversas aplicaciones como la biopreservación o extensión de la vida útil, la acción antimicrobiana clínica y el control de la fermentación por parte de la microbiota (Marcos Balciunas *et al.*, 2013). La producción de bacteriocinas ocurre de forma natural, durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, guardando relación directa con la biomasa producida (Vázquez *et al.*, 2009).

Se piensa que el 99 % de las bacterias pueden producir, cuando menos, una bacteriocina (Yin *et al.*, 2004). La única razón por la que en la mayoría de los casos estas bacteriocinas no se han aislado e identificado es la falta de estudios (Gordon & O'Brien, 2006). Así, por ejemplo, las halobacterias, miembros del dominio *Archaea*, producen su propio tipo de bacteriocinas, denominadas halocinas (Joerger, 2003). Existen muy numerosas bacteriocinas y cada una tiene espectros de inhibición particulares (Ennahar *et al.*, 2000; Cintas *et al.*, 2001; Joerger, 2003; Fernández, 2005; Grande *et al.*, 2006).

Diferentes investigadores han propuesto que las bacteriocinas, con frecuencia, actúan frente a las bacterias más estrechamente relacionadas (Eijsink *et al.*, 1998; Cotter *et al.*, 1998; Svetoch *et al.*, 2008). Sin embargo, estudios recientes confirman que también pueden tener actividad inhibitoria frente a otras especies bacterianas, hongos y algunos parásitos más distantes (Eijsink *et al.*, 1998; González *et al.*, 2004; Cotter *et al.*, 2005; Svetoch *et al.*, 2008).

Las BAL destacan por su capacidad para producir bacteriocinas (Ruíz-Larrea *et al.*, 2007) y son, por ello, propuestas como posible alternativa en el tratamiento de infecciones bacterianas, tanto tópicas como sistémicas, por microorganismos resistentes a la mayor parte de los antibióticos conocidos. A su vez, el empleo de estas BAL productoras de péptidos con actividad antimicrobiana puede contribuir a limitar el desarrollo de resistencias a antimicrobianos (Jamuna & Jeevaratran, 2004; Savadogo *et al.*, 2006).

Las bacteriocinas producidas por estas bacterias son las que encierran un mayor interés ya que las BAL tienen el estatus de QPS (qualified presumption of safety) o de microorganismos GRAS. Son consideradas como microorganismos seguros para la salud, ya que tanto ellas como sus metabolitos han sido consumidos en alimentos fermentados por innumerables generaciones sin que, hasta la fecha, se hayan descrito efectos adversos en la población asociados a este consumo (Joerger, 2003; Ogunbanwo *et al.*, 2003; Drider *et al.*, 2006; Milette *et al.*, 2008). Entre las bacteriocinas producidas por las BAL podemos destacar el acidofilucine A (Toba *et al.*, 1991a), la reuterina (Toba *et al.*, 1991b), la gasicina A (Toba *et al.*, 1991c), la plantacina S (Jiménez-Díaz *et al.*, 1995), la helveticina J (Joerger & Klaenhammer, 1986) o la lactacina B (Barefoot & Klaenhammer, 1983), entre otras. Según Cristóbal Delgado (2008) se han identificado más de 40 bacteriocinas, producidas por especies homofermentativas obligadas de BAL (*L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. amylovorus*, *L. helveticus*), por heterofermentativas facultativas (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. curvatus* y *L. sake*) y por heterofermentativas obligadas (*L. fermentum*). Este mismo investigador ha señalado a *Lactobacillus plantarum* como la especie de BAL con mayor capacidad como productora de bacteriocinas, lo cual explica su habilidad para controlar otros microorganismos, incluyendo microorganismos patógenos. Una de las bacteriocinas producidas por aislados de *L. plantarum* obtenidos de productos lácteos es la plantaricina C que produce la muerte de células sensibles actuando nivel de la membrana citoplasmática. Las plantaricinas S y T producidas por aislados de *L. plantarum* obtenidos de aceitunas verdes

fermentadas son activas contra varias bacterias Gram positivas incluyendo bacterias del género *Clostridium* y propionibacterias.

Bradley *et al.* (2005) evaluaron la actividad de una bacteriocina producida por *L. plantarum* frente a diferentes microorganismos patógenos comprobando que inhibe el crecimiento de *S. aureus*, *E. coli*, *L. innocua* y *Pseudomonas aeruginosa*. En forma similar, se ha reportado la actividad de la bacteriocina producida por la cepa *L. plantarum* F12 contra *L. monocytogenes* (Sifour *et al.*, 2012) y de la producida por la cepa TN627 contra *S. aureus* y *S. enterica* (Bejar *et al.*, 2011).

La reuterina, producida por aislados de *L. reuteri*, inhibe el crecimiento de bacterias Gram negativas y Gram positivas así como de levaduras, hongos y protozoos (Talarico *et al.*, 1988). En concentraciones cercanas a los 30 µg/mL ha demostrado su utilidad *in vitro* como antimicrobiano frente a patógenos entéricos como *Salmonella* y *Campylobacter* (Edens, 2003) aunque se necesitan alrededor de cuatro a cinco veces esta concentración de reuterina para eliminar bacterias patógenas en el intestino (Casas *et al.*, 1998).

Otro ejemplo de bacteriocina es la ABP118, descrita por Dunne *et al.* (1999) y producida por *L. salivarius* UCC118. Se ha descrito que tiene una potente actividad antimicrobiana contra bacterias de los géneros *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *E. coli* y *L. monocytogenes*. Según reportaron Flynn *et al.* (2002), los genes de *L. salivarius* codifican péptidos estructurales responsables de la actividad antimicrobiana de la bacteriocina ABP118. Además existe un gen, *abpIM*, que proporciona a los aislados de *L. salivarius* UCC118 resistencia frente a la acción de sus propias bacteriocinas. Se han identificado, igualmente, tres genes, *abpIP*, *abpK* y *ABPR*, reguladores de la producción de bacteriocinas y otros dos, *ABPT* y *ABPD*, como responsables de la secreción del producto antimicrobiano funcional. Diferentes investigadores han reportado la capacidad productora de bacteriocinas de *L. salivarius* aislados de ciego de pollos frente a *Campylobacter* (Messaoudi *et al.*, 2011) y frente a *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* (Lima & Andreatti, 2005).

Según Rojas Muñoz (2010), la producción de algunas bacteriocinas puede favorecerse por ciertas condiciones de crecimiento y así, por ejemplo, las condiciones de temperatura o el pH pueden modificar su producción. Estas condiciones son específicas para cada organismo productor de bacteriocinas. También la composición del medio de crecimiento afecta a la producción de estas sustancias. En general, los medios complejos que contienen una fuente rica en nitrógeno favorecen la producción de bacteriocinas. Por el contrario, Monroy *et al.* (2009) han reportado que el Tween 80, un tensioactivo, interfiere en la purificación de estas sustancias y disminuye la actividad antimicrobiana de pediodicina A y lactocina S. Según Alquicira Páez (2006), la glucosa es mejor fuente de carbono que la sacarosa o la fructosa para la producción de bacteriocinas como la nisina o la pediocina. La adición de fosfato de amonio y de potasio suprime la producción de nisina en medios sintéticos. También se observó que algunos aniones como el fosfato y cationes como el magnesio y el calcio afectan la producción de bacteriocinas, aunque esto depende, en gran medida, de la cepa productora.

La mayoría de los estudios relativos al mecanismo de acción de las bacteriocinas producidas por las BAL contra patógenos (Chikindas *et al.*, 1993; Klaenhammer, 1993; Bruno & Montville, 1993; Muriana, 1996; González, 2003; Ruiz-Larrea *et al.*, 2007; Vázquez *et al.*, 2009, Monroy *et al.*, 2009 y Nithya *et al.*, 2012), coinciden que señalar la formación de poros en la membrana citoplásmica de células sensibles como el principal mecanismo de acción. Se destruye la integridad de la membrana citoplasmática de los microorganismos sensibles a través de la formación de poros, lo que provoca la salida de compuestos pequeños, iones potasio y ATP, entre otras moléculas. Esta pérdida origina, a su vez, una pérdida de potencial de membrana, el consumo de las reservas energéticas celulares y, consecuentemente, el descenso en la síntesis de ADN, ARN y proteínas, originando finalmente la inhibición o muerte celular.

Vázquez *et al.* (2009) estudiaron el efecto de las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus curvatus* LTH1174 frente a *E. coli* y *Listeria* en un modelo dinámico del estómago y el intestino y comprobaron que eran

inactivadas por las enzimas digestivas. Adicionalmente se han descrito otras bacteriocinas, sensibles a enzimas no proteolíticas como la leuconocina S y que se inactivan por la acción de enzimas amilasas.

Producción de ácidos

Además de la producción de bacteriocinas, entre los mecanismos de acción de las BAL frente a otros microorganismos destaca la producción de ácidos orgánicos, principalmente de ácido láctico o ácido acético. Estos ácidos inhiben el crecimiento de otros microorganismos a través de una disminución del pH (Kandler & Weiss, 1992; Ouwehand, 1993; Garrity *et al.*, 2004; Mendoza, 2001; Lastras 2009; Mohankumar, 2011). Según Ouwehand (1993) y Sánchez (2003), el ácido acético es más efectivo frente a *L. monocytogenes* y *Bacillus cereus* que el ácido láctico. Además, el ácido acético tiene una actividad sinérgica con el ácido láctico; el pH del medio disminuye por la acción del ácido láctico y este hecho aumenta la toxicidad del ácido acético. Un ejemplo práctico de este efecto sinérgico se ha demostrado en el caso de *S. Typhimurium*, al valorar el efecto sobre su crecimiento de la exposición a una combinación de ambos ácidos.

Según estudios llevados a cabo por Jaramillo (2010), los probióticos más empleados son las bacterias capaces de producir elevadas concentraciones de ácido láctico como *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. animalis*, *Streptococcus salivarius* subespecie *thermophilus* o *Saccharomyces boulardii*. Por otra parte, Yang (2000) refiere que los niveles y tipos de ácidos orgánicos producidos dependen de la especie del microorganismo productor, de la composición del medio de cultivo y de las condiciones de crecimiento.

Neal-McKinney *et al.* (2012) demostraron que los aislados de *Lactobacillus plantarum* producen ácido láctico a concentraciones suficientes para inhibir, *in vitro*, la multiplicación de microorganismos patógenos como *Campylobacter jejuni* mediante la ruptura de la membrana del microorganismo. En este mismo sentido, Alakomi *et al.* (2000) comprobaron que las moléculas de ácido láctico pueden actuar sobre la membrana externa de los patógenos

Gram-negativos, incrementando su permeabilidad y, consecuentemente, incrementando la sensibilidad de estos microorganismos a diferentes sustancias antimicrobianas.

Rondón (2009) reportó que el incremento de la concentración de ácidos grasos de cadena corta y del ácido láctico en el ciego se asocia a una disminución en el recuento de coliformes en el contenido intestinal de los pollos. Los ácidos grasos de cadena corta incluyen al ácido acético, propiónico y butírico y son generados como resultado de la fermentación por parte de las bacterias de la microbiota, fundamentalmente a nivel del colon. El butirato es una muy importante fuente energética para las células del epitelio intestinal, estimulando su crecimiento y diferenciación así como la absorción de sales y agua y la motilidad intestinal (Cunning, 1981). El incremento de la concentración de estos ácidos grasos de cadena corta en el intestino favorece la proliferación y colonización de este hábitat por parte de las BAL al tiempo que dificulta la de otros microorganismos competidores.

En el presente estudio no se han evaluado los mecanismos por los cuales las BAL valoradas son capaces de inhibir la multiplicación de otros microorganismos. Sin embargo, el hecho de que el diámetro del halo de inhibición fuera relativamente grande para la gran mayoría de los aislados, nos permite sospechar de un importante efecto de la producción de ácidos sobre la inhibición observada.

Producción de peróxidos

Otros compuestos producidos por las BAL para llevar a cabo su actividad inhibitoria frente a otros microorganismos incluyen al peróxido de hidrógeno, que inhibe a las bacterias patógenas a consecuencia de su potente efecto oxidante, mediante la peroxidación de los lípidos de la membrana y la destrucción de la estructura básica de componentes celulares esenciales como lípidos, proteínas y ADN (Price & Lee, 1970; Jangho *et al.*, 2008).

De acuerdo a diferentes investigadores (Adams & Most, 1998; Yang, 2000), el peróxido de hidrógeno es producido en presencia de oxígeno por las BAL, a través de la acción de las enzimas flavoproteína oxidasa o NADH peroxidasa. Las fermentaciones con producción de ácido láctico son esencialmente reacciones anaeróbicas por lo que la formación de peróxido de hidrógeno estará limitada en función de la cantidad de oxígeno disuelto en el sustrato al iniciarse la fermentación.

Su efecto antimicrobiano se debe a la oxidación de los grupos sulfhidrilo, causando la desnaturalización de enzimas, y de la peroxidación de las membranas lipídicas, hecho que aumenta su permeabilidad. El peróxido de hidrógeno, además, puede ser un precursor para la producción de radicales libres que dañan el ADN.

Propiedad de adherencia

Aunque no fue evaluada en el presente estudio, la capacidad para adherirse a las células del epitelio intestinal es un importante requisito de las BAL que se seleccionan para ser empleadas con fines probióticos (Savage, 1992) y puede participar en el efecto de inhibición de otros microorganismos. La colonización intestinal es necesaria para que los efectos beneficiosos de los probióticos en el hospedador puedan perdurar en el tiempo. Sin embargo, algunos autores señalan que, aunque esta capacidad de adhesión es un factor importante, no es en absoluto imprescindible o esencial para que el probiótico ejerza sus efectos beneficiosos en el hospedador (Tannock, 1998). En este sentido, los microorganismos que se encuentran en tránsito en el lumen intestinal pueden ejercer también efectos positivos sobre la salud del hospedador desde la luz intestinal. En este caso, tienen una importancia fundamental los tiempos largos de tránsito intestinal.

Los mecanismos que desencadenan los procesos de adherencia de las BAL parecen ser diversos (Granato *et al.*, 1999; Roos & Jonsson, 2002; Pridmore *et al.*, 2004); pueden estar implicados exopolisacáridos de superficie, fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas, proteínas como las lectinas presentes en las fimbrias o los ácidos lipoteicoicos de la superficie celular.

La adhesión a la superficie intestinal, frecuentemente, se estudia *in vitro* usando líneas celulares intestinales de origen humano. Así, el mucus intestinal y las líneas celulares HTB29 y CacoB2 son los soportes más empleados en la actualidad para evaluar *in vitro* la capacidad de adhesión de cepas potencialmente probióticas (Greene & Klaenhammer, 1994; Tuomola & Salminen, 1998; Ouwehand *et al.*, 1999a). De acuerdo a Lasa *et al.* (2005), además de la adhesión, juega un importante papel la capacidad de persistencia de las bacterias en el tracto intestinal. En este sentido es importante la formación de biofilms, comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos adheridos a una superficie abiótica o a un tejido biótico (Fakhry *et al.*, 2009). El primer paso para la formación de esta estructura en el intestino es la adhesión de las bacterias a las células epiteliales intestinales, lo cual les confiere una serie de ventajas en el lugar de acción. La matriz extracelular donde quedan embebidas les brinda protección frente a condiciones hostiles del entorno y aumenta su capacidad de supervivencia. Como consecuencia, el tiempo de permanencia en el intestino es mayor y se prolongan los efectos beneficiosos (Lebeer *et al.*, 2007),

La adherencia de las bacterias al epitelio del tracto digestivo involucra diferentes mecanismos, como la presencia de adhesinas. Estas son proteínas ubicadas en la superficie de las células bacterianas con capacidad para unirse a los carbohidratos que se encuentran en el glicocalix de las células epiteliales (Savage, 1992). Estos carbohidratos funcionan como sitios receptores o sitios de anclaje para las bacterias. Diversos autores señalan que las BAL pueden bloquear los puntos de adhesión o puntos de unión de los microorganismos patógenos en la superficie de las células epiteliales, mediante un mecanismo de inhibición competitiva (Goldin *et al.*, 1992; Fujiwara *et al.*, 1997). Esto favorece que las bacterias probióticas puedan consumir más eficientemente los nutrientes presentes en el intestino, evitando que sean utilizados por otros microorganismos (Pérez Conesa, 2003).

Por otro lado, Gusils *et al.* (2003) destacan mientras que las bacterias Gram-negativas como *E. coli* utilizan fundamentalmente fimbrias para adherirse a las células dianas, la adherencia de los lactobacilos está asociada

a sustancias extracelulares que contienen polisacáridos, proteínas, lípidos y ácidos lipoicos, las cuales, en su conjunto, poseen una alta hidrofobicidad. Fuller (1989) y Jonsson *et al.* (2001) demostraron, *in vitro*, que la presencia de mucina estimula la propiedad de aglutinación de diferentes cepas de *L. reuteri*, observando que la capa de mucina que recubre el intestino es el sitio donde se produce, en un alto nivel, la adhesión de las bacterias. En contraposición, pueden existir en el tracto digestivo microorganismos productores de enzimas glicosidasas y glicosulfatasas con capacidad para degradar la mucina (Variyam & Hoskins, 1981; Deplancke *et al.*, 2002).

En estudios *in vivo* realizados por Ma *et al.* (2004) se describió el efecto de cepas de *Lactobacillus* aisladas del intestino de pollos en la adherencia de aislados de *Salmonella* y *E. coli* a la mucosa intestinal. Los resultados mostraron que las células de *Lactobacillus* presentaban una capacidad de adhesión a la mucosa superior a la de estas cepas patógenas, por lo que impidieron la adherencia de estas últimas al mucus intestinal en cualquier región del intestino.

Modificación de la respuesta inmune

Varios investigadores han referido la influencia de las BAL sobre la respuesta inmune de los hospedadores como otro mecanismo de actividad inhibitoria frente a microorganismos patógenos (Marteau *et al.*, 1997). En este sentido, se ha observado que ciertas cepas probióticas, además de provocar un incremento en la producción de citoquinas tanto *in vivo* como *in vitro*, inducen un aumento en la capacidad fagocítica de las células inmunitarias (Arunachalam *et al.*, 2000). Asimismo, en el ámbito de la inmunidad humoral, se ha descrito que algunas bacterias probióticas provocan un incremento en su actividad; favorecen la producción de anticuerpos, especialmente del tipo IgA en el lumen intestinal (Cagigas Reid, 2002; Edens, 2003; Revollo *et al.*, 2006).

Los efectos inmunomoduladores de las BAL están relacionados con la capacidad de dichas bacterias para interactuar con receptores linfocitarios responsables de la inmunidad innata y con subpoblaciones de linfocitos para favorecer la síntesis de citoquinas reguladoras.

De acuerdo a Guarner & Malagelada (2003), algunos componentes de las paredes celulares de las BAL como los peptidoglicanos y los lipopolisacáridos tienen un importante papel en la activación del sistema inmunitario (Hamman *et al.*, 1998). Además, la colonización microbiana del tracto digestivo por las BAL afecta a la composición del tejido linfoide asociado al intestino, incrementando los linfocitos intraepiteliales y las células productoras de inmunoglobulinas en los folículos y en la lámina propia. Nagafuchi *et al.* (1999) demostraron que las propiedades inmunomoduladoras de cepas de BAL y su patrón de comportamiento dependen de la dosis bacteriana empleada así como de las especies bacterianas involucradas.

La modificación de la microbiota intestinal mediante la administración de probióticos influencia el sistema inmune de diversas maneras. Se ha descrito que regula positivamente la inmunidad celular y que aumenta la producción de anticuerpos, la interacción entre células T y células dendríticas y la señal de receptores Toll-like. Muchos de estos efectos han sido observados en el intestino de pollos desafiados experimentalmente con patógenos entéricos (Lee *et al.*, 2010). Así, se ha demostrado que los pollos tratados con probióticos producen mayor cantidad de anticuerpos frente a un determinado antígeno, cumpliendo un importante rol como adyuvantes. A modo de ejemplo, los títulos de anticuerpos tras la vacunación contra el virus de la enfermedad de Newcastle y contra *Eimeria* son más elevados en los pollos que recibían tratamiento con un probiótico que en sus controles.

Otros trabajos han permitido demostrar que la expresión de citoquinas en pollos es alterada en respuesta a una dieta que contiene probióticos (Christensen *et al.*, 2002; Lammers *et al.*, 2003; Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004; Lebman & Edmiston, 1999). Se ha comprobado que los lactobacilos inducen la expresión de citocinas Th2 como IL-4 e IL-10. A través de la estimulación de la

producción de citoquinas, los probióticos intervienen en la inducción y regulación de la respuesta del sistema inmunitario (Maassen *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2002; Lammers *et al.*, 2003).

2.4.4.- Disminución de pH del medio

La capacidad de los 23 aislados de BAL seleccionados, procedentes de heces, duodeno, íleon y ciego de gallos de pluma de León y de perdices, para disminuir el pH del medio en 24 horas de incubación fue evaluado en un ensayo *in vitro*, partiendo de unas condiciones de pH de 6,5.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 11. Todos los aislados lograron disminuir el pH hasta 4,5 encontrándose los valores más bajos de pH para los aislados: 17, 45, 48, 71, 72, 75, 78, 83, 84 y 95.

Tabla 11. pH determinado a las 24 horas de incubación para cada uno de los aislados de bacterias del ácido láctico valorados (pH inicial del medio de cultivo 6,5).

Aislado	pH (tras 24 h de incubación)
3	4,4
7	4,5
11	4,6
17	4,1
19	4,5
23	4,4
29	4,5
39	4,3
45	4,0
48	4,1
66	4,5
67	4,2
70	4,3
71	4,0
72	4,0
75	4,0
77	4,2
78	4,0
83	4,0
84	4,0
94	4,4
95	4,0
96	4,3

Valores de pH superiores a los obtenidos por nosotros han sido reportados por Rondón *et al.* (2008) al evaluar la disminución del pH inducida por cepas de *Lactobacillus* spp. aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos broiler. De un total de 75 cepas valoradas, solo 42 disminuyeron el pH del medio a valores inferiores a 5,5 en 24 horas.

Muy diversos trabajos han demostrado la capacidad de las BAL, tanto homo como hetero-fermentativas, para producir ácidos orgánicos como el ácido láctico, acético, butírico y propiónico (van der Wielen *et al.*, 2000; Forestier *et al.*, 2001; Nazef *et al.*, 2008). Estos ácidos provocan la disminución del pH en el intestino y previenen la colonización por otras bacterias. Los ácidos orgánicos que producen las BAL actúan sobre las bacterias sensibles al penetrar sus paredes, siendo necesario para que se produzca su efecto que la molécula de ácido se encuentre en forma no disociada. Una vez que estos ácidos traspasan esta barrera, se disocian en sus dos componentes, el anión, que modifica el material genético de la célula, y el catión, que acidifica el citoplasma y somete a la célula a un alto desgaste energético para neutralizarlo (Adams, 2000).

De acuerdo a Samaniego & Sosa (2002), los lactobacilos crecen bien en medios ligeramente ácidos, con un pH de 6,4-4,5, estando el pH óptimo en el rango entre 5,5 y 6,2. En la mayoría de los casos, su multiplicación cesa a valores de pH entre 3,6 y 4, en dependencia de especies y cepas, disminuyendo notablemente en medios neutros o ligeramente alcalinos. En ocasiones, los lactobacilos son capaces de disminuir el pH del sustrato donde se encuentran por debajo de un valor de 4,0, aunque es importante conocer que no todas las especies toleran este pH. La disminución del pH del medio causada por los aislados de BAL se asocia generalmente a la producción de ácido láctico como resultado de la fermentación de carbohidratos simples como la glucosa y la lactosa (Ten Brink *et al.*, 1987; Walstra *et al.*, 2001; Holzapfel *et al.*, 2001; Barbosa *et al.*, 2005). La generación de un bajo pH evita o disminuye considerablemente el crecimiento de casi todos los otros microorganismos competidores, exceptuando el de otras bacterias lácticas y el de las levaduras. Podemos destacar que se ha reportado que *Lactobacillus plantarum* dispone

de una capacidad excepcional para general bajos valores de pH en el medio (McDonald *et al.*, 1990).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en lo que respecta a la disminución del pH del medio, se seleccionaron 9 aislados de BAL para continuar con las pruebas de tolerancia a las condiciones del medio del tracto digestivo.

2.4.5.-Tolerancia a condiciones de pH ácido

La capacidad de las bacterias para crecer y sobrevivir en un nicho determinado depende de las condiciones biológicas y físico-químicas del ecosistema en particular. Por tanto la capacidad de resistencia a un pH bajo, al jugo intestinal y a las sales biliares tiene gran importancia en la supervivencia y multiplicación de las BAL en el tracto gastrointestinal. Por esta razón se deben tener en cuenta estas características a la hora de seleccionar cepas de BAL con fines probióticos. El objetivo de la prueba de la tolerancia de los aislados a condiciones de pH ácido fue estimar, *in vitro*, el comportamiento de las BAL en las condiciones ácidas del estómago. De acuerdo a diferentes trabajos, los lactobacilos son microorganismos capaces de sobrevivir en condiciones de acidez similares a las existentes en el estómago de los animales y el hombre (Holt *et al.*, 1994; Levean & Bouix, 2000).

Numerosos trabajos han señalado que la resistencia a bajos valores de pH es de gran importancia y un requisito relevante a tener en cuenta en la evaluación de potenciales cepas probióticas (Floch *et al.*, 1972; Tannock *et al.*, 1989; Dunne, 2001; Tsai *et al.*, 2005). De acuerdo a Prescott *et al.* (2002), el pH del estómago, con valores de 2 o 3, constituye una de las principales barreras para muchos microorganismos que transitan el tracto gastrointestinal.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 12. Se valoró la viabilidad a tres valores de pH: 2,5, 2,0 y 1,5, en un total de 9 aislados de BAL. Ninguno fue capaz de sobrevivir tras la exposición a medios con pH 1,5. Sin embargo, todos los aislados fueron capaz de mantenerse viables o incluso multiplicarse tras la exposición a valores de pH de 2,5 y 2,0.

Tabla 12. Bacterias viables (log UFC/mL) tras diferentes tiempos de exposición a pH ácido.

Aislado	Control			pH= 2,5			pH= 2,0			pH=1,5		
	H0	H2	H6	H0	H2	H6	H0	H2	H6	H0	H2	H6
3	6,2	7,1	7,4	6,5	6,0	6,8	5,7	5,3	5,0	-	-	-
17	6,5	6,7	7,0	6,0	5,3	6,0	6,2	5,8	5,8	-	-	-
39	7,0	7,3	7,4	6,8	6,0	6,2	6,1	6,0	6,7	-	-	-
48	7,1	7,1	7,8	7,2	6,5	6,3	7,4	7,0	6,5	-	-	-
71	6,7	6,0	7,6	7,5	5,6	6,2	6,0	5,7	5,8	-	-	-
75	7,8	6,4	7,5	6,6	5,8	7,0	6,5	6,0	6,2	-	-	-
83	8,3	7,9	6,5	7,4	6,1	7,5	5,5	5,0	5,9	-	-	-
94	7,8	5,3	7,6	7,1	7,4	7,7	7,1	6,7	6,5	-	-	-
95	8,5	7,4	8,2	8,0	7,6	7,1	6,8	7,0	7,4	-	-	-

En la tabla 13 se muestra el porcentaje de resistencia de los aislados para los valores de pH 2,5 y pH 2,0 y tras una exposición de 6 horas. Los mayores valores del porcentaje de resistencia para el pH 2,5 los alcanzaron los aislados 3, 94, 17 y 48. En el caso de la resistencia a pH 2,0 los aislados con mejor comportamiento fueron los identificados como 39 y 48.

Tabla 13. Porcentaje de resistencia tras 6 horas de exposición a medios con pH 2,0 y pH 2,5 para cada uno de los aislados de bacterias del ácido láctico valorados.

Aislado	% R _{pH2,5}	% R _{pH2,0}
3	109,6	80,0
17	92,0	89,2
39	88,5	95,7
48	90,9	91,5
71	88,7	86,5
75	89,7	79,4
83	90,3	71,0
94	98,7	83,3
95	83,0	87,0

$$\% R_{pH2,5} = \text{UFC/ml}_{MRS\ pH2,5} * 100 / \text{UFC/ml}_{MRS\ pH6,2}$$

$$\% R_{pH2,0} = \text{UFC/ml}_{MRS\ pH2,0} * 100 / \text{UFC/ml}_{MRS\ pH6,2}$$

En función de estos resultados se decidió incluir todos los aislados BAL valorados para la siguiente etapa de selección puesto que todos ellos cumplieron con el criterio de supervivencia para un pH de 2,5. Aunque se ha descrito que el jugo gástrico de pollos puede llegar a valores de pH más bajos, entre 0,5-2,0 (Ehrman *et al.*, 2002), los tiempos de permanencia en este órgano no son, en principio, muy prolongados. En condiciones normales, el tiempo de tránsito gastrointestinal en aves, aunque varía según el individuo y diferentes factores internos y externos, se estima entre 2 y 4 horas (Macfarlane & Dillon, 2007).

Cabe destacar que los resultados encontrados en nuestro estudio son, en general, similares a los reportados en estudios previos (Hood & Zottola 1988; Lankaputra & Shah, 1995; Gupta *et al.*, 1996; Prasad *et al.*, 1998). De forma general, se reconoce que las BAL toleran bien concentraciones relativamente altas de ácidos y valores bajos de pH. Algunas de ellas pueden

multiplicarse a valores de pH 3,0, otras a valores de entre pH 6,0 y pH 9,0, pero la mayoría crece a valores de pH 4 y 4,5 (Jay, 2000).

Bao *et al.* (2010) valoraron 11 aislados de *L. fermentum* con alta tolerancia a la acidez gástrica y reportaron un porcentaje de supervivencia del 80 % tras 3 horas de incubación en un medio a pH 2,5. En el mismo sentido, Rodríguez *et al.* (2008) describieron que algunas cepas de *Lactobacillus acidophilus* y de *Lactobacillus casei* toleran condiciones de pH 2,0 y 2,5 mientras que Cueto-Vigil *et al.* (2010) encontraron un 54,7 % de aislados de BAL capaces de sobrevivir tras su exposición a medios de pH 2,0, siendo un aislado de *L. fermentum* el que mostró mayor porcentaje de supervivencia (77,7 %) tras dos horas de exposición.

También en consonancia con nuestros resultados, Alvarado Rivas & Díaz Rivero (2009) describieron resistencia a pH 3 en cepas de *L. plantarum*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. brevis* o *L. pentosus*, aunque señalaron que esta resistencia era, en general, variable. La resistencia más elevada fue mostrada por una cepa de *L. plantarum* (93,41 %) y la más baja por otra cepa de *L. plantarum*, con un porcentaje de supervivencia del 0,35 %. Igualmente, Garriga *et al.* (1998) demostraron la resistencia de aislados de *L. salivarius* de origen aviar a condiciones de pH 3 mientras que Canway *et al.* (1987) reportaron que un aislado de *L. acidophilus* NCFM disminuye cuatro unidades logarítmicas cuando se incubaba en buffer fosfato a pH 3,0. Rondón *et al.* (2008) comprobaron que la disminución del pH hasta 4 no causó ningún efecto negativo en una colección de aislados de *L. salivarius*, lo cual confirma que esta bacteria tiene la capacidad de crecer a pH bajo y en presencia de altas concentraciones de ácidos.

En contraposición a nuestros resultados, Musikassang *et al.* (2009) estudiaron 548 cepas de BAL aisladas de pollos de engorde y comprobaron que solo 6 de ellas conseguían sobrevivir y multiplicarse cuando se exponían a valores de pH de 2,5. Los valores de supervivencia mostrados por los aislados resistentes a las condiciones ácidas oscilaron entre el 27,2 % y el 43,7 %, valores significativamente a los encontrados en nuestro trabajo.

Lara & Burgos (2012) evaluaron *in vitro* la resistencia a diferentes valores de pH (3, 4, 5, 6 y 7) de aislados de *Lactobacillus sp.*, *Bacillus sp.* y de levaduras recuperadas a partir de muestras de heces de pollos. Aunque la mayoría de los aislados se mantuvieron viables tras 24 horas de exposición a un medio de pH 4, solo 24 cepas, 3 de *Sacharomyces*, 7 de *Bacillus sp* y 14 de *Lactobacillus spp.*, fueron resistentes a pH 3.

Una menor resistencia a las condiciones ácidas ha sido descrita en el caso de los aislados de *Bacillus subtilis*. Milián (2009) describió la inhibición del crecimiento a medida que bajaba el pH del medio, demostrando que estas cepas son sensibles a la disminución del pH, efecto que provoca el cese del crecimiento y la formación de endosporas.

En general, se ha descrito que las bacterias del género *Lactobacillus* son más resistentes a las condiciones ácidas que otras BAL (Madigan *et al.*, 2004). Esta resistencia les permite seguir creciendo durante las fermentaciones lácticas naturales, aun cuando el pH haya caído por debajo de valores que impiden la multiplicación de otras bacterias lácticas. Así, aunque su pH óptimo de crecimiento oscila entre 5,5-6,2, son capaces de multiplicarse a valores sensiblemente más bajos (Klander, 1992; Madigan *et al.*, 2004). Los mecanismos que determinan esta capacidad son variados, incluso entre los miembros de una misma especie del género *Lactobacillus*. En algún caso, se ha descrito la existencia de mecanismos celulares que les permiten mantener el pH intracelular cercano a la neutralidad, tales como bombas de extracción de protones (Piard & Desmazeaud, 1991); se han descrito proteínas especializadas que catalizan el intercambio de cationes monovalentes (Na^+ , K^+ o H^+) a través de las membranas, regulando las concentraciones de cationes y el pH a nivel del citoplasma y los orgánulos (Mitsui *et al.*, 2005; Ohgaki *et al.*, 2005). Otro de los posibles mecanismos de regulación pudiera ser a través de la enzima ATPasa, localizada en la membrana citoplasmática que puede crear un gradiente electroquímico de protones que conduce al transporte secundario de solutos y que está implicado en el mantenimiento del pH cercano a la neutralidad (Viegas *et al.*, 1998; Sychrova *et al.*, 1999).

En el caso de las bacterias del género *Bacillus*, la tolerancia al bajo pH se ha asociado a la presencia de endosporas que contienen el complejo calcio-ácido dipicolínico-peptidoglicano (Jiraphocakul *et al.*, 1990) y que confieren resistencia a situaciones adversas del medio como las de pH, temperatura, radiaciones, desecación, déficit nutricional, altas presiones o agentes químicos (Madigan *et al.*, 2004).

2.4.6- Tolerancia a sales biliares

La acción enzimática y el pH del estómago no son los únicos desafíos que tienen que enfrentar las BAL para poder alcanzar el intestino, siendo las sales biliares uno de los obstáculos más importantes. Es por ello que la tolerancia a estas sales biliares se considera un requisito importante para valorar las opciones de supervivencia y colonización de las BAL y, consecuentemente, para su selección con fines probióticos (Floch *et al.*, 1972; Tannock *et al.*, 1989; Klaenhammer & Kleeman, 1981; Bezkorovainy, 2001; Dunne, 2001; Tsai *et al.*, 2005).

En la Tabla 14 se muestran los resultados de viabilidad, expresados en log UFC/mL obtenidos tras la exposición durante 4 horas de los 9 aislados de BAL seleccionados anteriormente a un medio suplementado al 0,45 % con sales biliares. Como puede observarse, salvo los aislados 71 y 94 que no fueron capaces de multiplicarse ni en el medio control ni en el medio suplementado con sales biliares, el resto fueron capaces de sobrevivir en presencia de una concentración del 0,45 % de sales biliares.

Tabla 14. Bacterias viables (log UFC/mL) tras diferentes tiempos de exposición a sales biliares.

Aislado	Control			0,45 % Sales Biliares		
	H0	H2	H4	H0	H2	H4
3	8,2	7,6	7,8	8,0	7,7	6,1
17	6,5	7,2	6,5	6,0	5,5	4,0
39	7,3	7,8	8,0	7,0	6,2	5,3
48	8,1	8,0	7,3	7,8	6,6	6,0
71	-	-	-	-	-	-
75	6,9	6,0	6,0	6,3	5,8	5,0
83	7,5	6,1	6,1	6,6	6,0	5,2
94	-	-	-	-	-	-
95	7,4	7,0	7,0	6,5	6,1	5,9

En la tabla 15 se muestra el porcentaje de supervivencia de los aislados de BAL tras su exposición durante 4 horas a un medio con un 0,45 % de sales biliares, observándose que excepto los aislados 71 y 94 anteriormente mencionados, el resto mostró valores de supervivencia superiores al 50 %.

Tabla 15. Porcentaje de resistencia tras la exposición durante 4 horas a una concentración de sales biliares del 0,45 %.

Aislado	% de supervivencia
3	74,39
17	61,53
39	72,60
48	74,07
71	-
75	72,46
83	69,33
94	-
95	79,72

El fracaso de algunos probióticos comerciales se ha atribuido a su escasa resistencia a la acción de las sales biliares que limita su viabilidad en el tránsito por el tracto digestivo (Fernández *et al.*, 2003). Sin embargo, la existencia de muy limitada información acerca de la concentración de estas sales en el intestino de los diferentes animales domésticos hace que no existan unos criterios claros que puedan emplearse para la selección de bacterias con fines probióticos en lo que respecta a este particular (Havenaary & Husis In't Veld, 1992).

En el hombre, Gilliland *et al.* (1984) han descrito una concentración media de sales biliares en el tracto gastrointestinal del 0,3 % (p/v). Por ello, en la evaluación de la resistencia a sales biliares, estos autores partieron de una concentración mínima de 0,3 %, valorando concentraciones crecientes, con el fin de determinar no solo la capacidad de resistencia sino también la posible existencia de actividad hidrolítica sobre las sales biliares, tal y como ha sido descrito para algunas cepas de *L. acidophilus* de origen humano (Corzo & Gilliland, 1999).

La mayoría de las cepas evaluadas en nuestro trabajo mostraron una cierta resistencia a la presencia de una concentración de sales biliares del 0,45 % durante 4 horas. Resultados similares han sido reportados por Rondón *et al.* (2008), Vinderola & Reinhermer (2003) o Pennacchia *et al.* (2004). De acuerdo a Prasad *et al.* (1998), las diferencias en la tolerancia al tránsito gastrointestinal de las BAL pueden deberse a las diferencias existentes en la estructura de la pared celular de las distintas especies y géneros bacterianos. Además, algunos trabajos han demostrado que las BAL de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus* son capaces de producir la enzima sal biliar hidrolasa (SBH), que cataliza la hidrólisis de las sales biliares conjugadas con glicina y taurina (Tanaka *et al.*, 1999; Ahn *et al.*, 2003; Liong & Shah, 2005). Este proceso de desconjugación de las sales biliares podría ser relevante en la resistencia al efecto de las mismas y podría ocurrir en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, ya que la actividad de la SBH se incrementa al disminuir el pH por la producción de gran cantidad de ácidos orgánicos (Corzo & Gilliland, 1999).

Reque *et al.* (2000) describieron, igualmente, la tolerancia a las sales biliares de algunas cepas de *Lactobacillus* aisladas del ciego de aves. Cabe destacar que una cepa de *L. plantarum* sobrevivió a concentraciones de bilis de entre el 3 y el 10 %. Ehrmann *et al.* (2002) verificaron, igualmente, esta resistencia en cepas de *L. salivarius* y *L. animalis* aisladas de patos.

Casey *et al.* (2004) demostraron diferencias en la tolerancia a sales biliares en función de la especie y/o aislado. Comprobaron que los aislados de *L. murinus* y *L. salivarius* se multiplicaban solamente en presencia de bajas concentraciones de sales biliares (0,3 % p/v). Por el contrario, las cepas de *L. delbrueckii* presentaron mayor resistencia y crecieron en medios con un 0,5 % (p/v) de sales biliares y la resistencia más elevada fue observada para aislados de *L. animalis* y *L. reuteri* que sobrevivieron en medios con una concentración del 1 %. Una particular resistencia de los aislados de *L. reuteri* había sido indicada por otros estudios (Du Toit *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2012; De Angelis *et al.*, 2006).

Las sales biliares tienen una potente actividad antimicrobiana debido a su capacidad para disolver las membranas celulares. Entre los mecanismos que pueden reducir los efectos de las sales biliares hemos mencionado ya la producción de enzimas hidrolíticas. Estas actividades enzimáticas han sido descritas en diferentes especies de bacterias que forman parte de la microbiota intestinal (Tanaka *et al.*, 1999) y, particularmente, en bacterias del género *Lactobacillus*.

Mantilla & Burgos (2012) evaluaron la tolerancia a sales biliares de aislados de los géneros *Sacharomyces*, *Bacillus* y *Lactobacillus* y comprobaron que eran capaces de sobrevivir a concentraciones de sales biliares de entre 0,05 % (p/v) y 0,3 % (p/v). Ortiz *et al.* (1997) describieron que las levaduras tipo *S. cerevisiae* toleran concentraciones de sales biliares como consecuencia de la presencia de proteínas integrales de membrana unidas a ATP, denominadas proteínas ABC, que son responsables de la translocación de las sales biliares, pudiendo transportar eficientemente ácidos biliares conjugados. Otro posible mecanismo de resistencia es la acumulación de polioles y glicerol, para regular la presión osmótica de la célula.

2.4.7- Identificación molecular de las bacterias ácido lácticas seleccionadas

Para la identificación de los aislados se emplearon técnicas moleculares que se fundamentan en la identificación de diferencias en la secuencia de los nucleótidos (Forney *et al.*, 2004). La diana empleada para la identificación fue la región intergénica 16S-23S.

Se ha propuesto que la identificación de la microbiota normal de los animales para su posible utilización como probióticos puede realizarse mediante técnicas morfológicas y bioquímicas tradicionales (McCartney, 2002). Sin embargo, la comparación de secuencias de la región que codifica para el ARNr 16S es de gran interés y utilidad para la identificación de bacterias aisladas de diversas fuentes (McCartney, 2002). Su utilización se ha incrementado notablemente en los años más recientes debido la existencia de numerosas bases de datos que cuentan con las correspondientes secuencias.

Aunque han descrito diferencias entre la identificación genotípica y fenotípica de aislados de BAL (Brashears *et al.*, 2003; Casey *et al.*, 2004) y se ha sugerido que la combinación de ambos métodos es necesaria para alcanzar una identificación correcta (Brashears *et al.*, 2003), en la actualidad se han impuesto las metodologías que basan la identificación de estos microorganismos en el estudio de su genoma.

Además de las técnicas basadas en la amplificación por PCR y secuenciación, otras técnicas moleculares que pueden ser empleadas para la identificación de las BAL incluyen la determinación del perfil plasmídico y o el RAPD (random amplified polymorphic DNA). Este último método permite la comparación de diferencias intra e interespecíficas en los aislados. Fue utilizado inicialmente para obtener patrones genéticos o "fingerprints" en aislados de *Staphylococcus* (Williams *et al.*, 1990) pero ha sido empleado, igualmente, para diferenciar BAL (Vogel *et al.*, 1996).

Los resultados de la identificación de los 9 aislados de BAL que fueron sometidos a todas las pruebas anteriores se muestran en la Tabla 16.

Como cabía esperar, se confirmó que todos los aislados seleccionados pertenecían al grupo de las BAL. Tres de ellos fueron identificadas como *Lactobacillus reuteri*, procedentes de muestras de heces, duodeno y ciego de gallos de pluma de León (aislados 3, 39 y 48).

Un aislado, recuperado igualmente de heces de un gallo de pluma de León e identificado como aislado 17, fue clasificado como *Enterococcus durans*.

Un aislado procedente del duodeno de un gallo de pluma de León fue identificado como *Lactobacillus mucosae* (aislado 75).

El aislado 95, procedente del ciego de una perdiz, fue identificado como *Lactobacillus salivarius*. La identificación en todos estos casos mencionados se alcanzó con una homología del 99 %.

Otros tres aislados (aislados 71, 83 y 94) solo pudieron ser identificados a nivel de género (*Lactobacillus* sp.) puesto que solo alcanzaron una homología con las secuencias recogidas en GenBank inferior al 95 %.

Cabe señalar que todas estas bacterias ácido lácticas han sido descritas y registradas como probióticos y que se han utilizado en la alimentación tanto humana como animal.

Tabla 16. Identificación molecular de los aislados de bacterias del ácido láctico seleccionados en función de sus potenciales propiedades probióticas.

Aislado	Origen	Identificación	Porcentaje de homología
3	Heces de gallos pluma de León	<i>Lactobacillus reuteri</i>	99
17	Heces de gallos pluma de León	<i>Enterococcus durans</i>	99
39	Duodeno de gallos pluma de León	<i>Lactobacillus reuteri</i>	99
48	Ciegos de gallos pluma de León	<i>Lactobacillus reuteri</i>	99
71	Ciegos de gallos pluma de León	<i>Lactobacillus</i> sp.	99
75	Duodeno de perdiz	<i>Lactobacillus mucosae</i>	95
83	Ciego de perdiz	<i>Lactobacillus</i> sp.	95
94	Ciego de perdiz	<i>Lactobacillus</i> sp.	95
95	Ciego de perdiz	<i>Lactobacillus salivarius</i>	99

Resultados similares a los nuestros han sido mostrados por otros trabajos previos (Chang *et al.*, 2001; Roos & Jonsson, 2002; Rodríguez *et al.*, 2003; Collazos, 2003). En todos ellos se reporta la identificación molecular de un número considerable de aislados de *L. reuteri* entre los seleccionados con fines probióticos a partir de BAL de origen digestivo en ganado porcino. Igualmente, se han identificado, también a partir de muestras de origen porcino, otras especies de *Lactobacillus* como *L. salivarius* (Nemcova *et al.*, 1997;

Robredo *et al.*, 1997), *L. murinus* (Casey *et al.*, 2004), *L. ruminis* (Al Jassim, 2003), *L. delbrueckii* (Konstantinov *et al.*, 2006) y *L. animalis* (Du Toit *et al.*, 2001).

En este mismo sentido, Shiva & Jara, (2013) identificaron, empleando técnicas moleculares, entre 19 aislados de BAL, más de un 50 % como *L. reuteri*, el 32 % como *L. plantarum*, el 10 % como *L. vaginalis* y el 5 % como *L. salivarius*.

Finalmente, cabe destacar que en la bibliografía revisada no aparecen antecedentes acerca de la identificación de aislados de heces, duodeno, íleon y ciegos ni de gallos de pluma de León ni de perdices, por lo cual nuestros resultados pueden ser un punto de partida para continuar realizando estudios al respecto con vistas a lograr una caracterización de bacterias procedentes de estas especies con fines probióticos.

En la tabla 17 se muestra un resumen del comportamiento de las 9 BAL que fueron evaluadas en el presente estudio incluyendo su capacidad de disminución y tolerancia al pH del medio, tolerancia a sales biliares, su actividad antibiótica y su actividad frente a microorganismos patógenos. Para cada uno de los parámetros valorados los resultados fueron clasificados como muy adecuados (***), adecuados (**) o aceptables (*).

En base al global de todos estos resultados, se propuso como componentes para un potencial probiótico para aves una mezcla compuesta por: *Lactobacillus reuteri* (cepa 48), *Lactobacillus mucosae* (cepa 75) y *Lactobacillus salivarius* (cepa 95).

Tabla 17. Resumen del comportamiento de las bacterias del ácido láctico seleccionadas.

Aislado	Origen	Identificación	Dism. pH	Tolerancia a pH ácido		Tolerancia a sales biliares	Resistencia antibiótica	Resistencia a patógenos
				2,0	2,5			
3	Heces GPL	<i>L. reuteri</i>	**	***	***	***	***	***
17	Heces GPL	<i>Enterococcus durans</i>	***	***	***	***	***	***
39	Duodeno GPL	<i>L. reuteri</i>	**	***	***	***	***	***
48	Ciegos GPL	<i>L. reuteri</i>	***	***	***	***	***	***
71	Ciego perdiz	<i>Lactobacillus</i> sp.	***	***	***	-	***	***
75	Duodeno perdiz	<i>Lactobacillus mucosae</i>	***	***	***	***	***	***
83	Ciego perdiz	<i>Lactobacillus</i> sp.	***	***	***	***	***	***
94	Ciego perdiz	<i>Lactobacillus</i> sp.	**	***	***	-	***	***
95	Ciego perdiz	<i>L. salivarius</i>	***	***	***	***	***	***

*Aceptable: Disminución de pH > 4,5 ; Tolerancia a pH ácido: % R_{pH 2,5} = 50 % % R_{pH 2,0} = 50 % ; Tolerancia a sales biliares: % RSB=50 % ; Resistencia antibiótica: no pasan todos los criterios de la EFSA para los 9 antibióticos valorados ; Actividad frente a patógenos: inhiben a 3 patógenos.

**Adecuado: Disminución de pH < 4,5 ; Tolerancia a pH ácido: % R_{pH 2,5} = 60 % % R_{pH 2,0} = 60 % ; Tolerancia a sales biliares: % RSB=60 % ; Resistencia antibiótica: pasan todos los criterios de la EFSA para los 9 antibióticos valorados ; Resistencia a patógenos: inhiben a 4 patógenos.

***Muy adecuado: Disminución de pH (4,0-4,1) ; Tolerancia a pH ácido: % R_{pH 2,5} < 60 % % R_{pH 2,0} > 60 % ; Tolerancia a sales biliares: % RSB=70 % ; Resistencia antibiótica: pasan todos los criterios de la EFSA para los 9 antibióticos valorados ; Resistencia a patógenos: inhiben a 5 patógenos.

CAPITULO 3

**Valoración *in vivo* de la acetamida furánica monobromada y de un
probiótico de origen aviar frente a la infección por *Salmonella enterica* en
broilers**

3.1.- INTRODUCCIÓN

Los alimentos de origen animal son fuente muy importante de proteínas y energía para el hombre, especialmente en países en vías de desarrollo. El crecimiento sostenido de la población mundial que, según los datos de la FAO, alcanzará los 9.000 millones en el año 2050 se produce, principalmente, en estos países en vías de desarrollo por lo que es fundamental lograr un incremento paralelo en la producción de alimentos. En este sentido, la producción de alimentos de origen animal de calidad y con garantías sanitarias es un objetivo prioritario.

Dentro de estos alimentos de origen animal, la carne de pollo ocupa un lugar destacado siendo, junto con los huevos, la mejor fuente de proteína de calidad para millones de personas en el mundo (FAO, 2013). Además de proteínas, la carne de pollo proporciona vitaminas y minerales, es muy saludable, con bajo contenido en grasas, y económica. En lo que respecta a su producción, cabe destacar que la conversión alimenticia o índice de conversión, kilogramos de pienso consumidos por un animal para ganar un kilogramo de peso vivo, alcanza valores muy adecuados y que las infraestructuras e instalaciones necesarias para la producción de pollos de engorde son económicas y de rápida implantación. Otras ventajas adicionales asociadas a la producción de carne de pollo es la posibilidad de producir estas aves en sistemas familiares, empleando en muchas ocasiones desechos para su alimentación, o el hecho de que no existe ninguna restricción o tabú en lo que respecta a su consumo en diferentes culturas.

En este contexto, la productividad de las explotaciones avícolas en los países en desarrollo es un aspecto muy relevante y que está en clara dependencia de su situación sanitaria. Existe una relación directa entre el principal parámetro productivo en las explotaciones de pollos de engorde, el índice de conversión, y las diversas enfermedades que pueden afectar a estos animales (FAO, 2013). Entre estas enfermedades podemos destacar las infecciones por bacterias del género *Salmonella*.

Las aves pueden ser infectadas por una gran variedad de serotipos de *Salmonella* (Sánchez, 2010; Barrow *et al.*, 2012). Las infecciones por salmonelas adaptadas al hospedador aviar, biovariedades Gallinarum y Pullorum del serotipo Gallinarum, causan enfermedades específicas, la tifosis y la pullorosis respectivamente, mientras que las infecciones por otros serotipos no específicamente adaptados a las aves pueden asociarse o no a enfermedad clínica. Dentro de este segundo grupo, podemos destacar que las infecciones por los serotipos Typhimurium y Enteritidis se encuentran entre las más frecuentes y que se asocian, generalmente, a infecciones sistémicas que se acompañan de signos clínicos, pudiendo causar la muerte de un número significativo de individuos. De forma general, la presencia de signos clínicos asociados a la infección por salmonelas no específicamente adaptadas al hospedador aviar es más frecuente en los pollos de menos de 2 semanas de edad observándose de forma excepcional en animales de más de 4 semanas de vida (Lister & Barrow, 2008). Estos signos clínicos son inespecíficos e incluyen depresión, apatía, alas caídas o diarrea, entre otros. Los valores de morbilidad y mortalidad son muy variables aunque habitualmente no se supera el 10 % de bajas en los grupos afectados.

Además del impacto económico asociado a pérdidas en la producción, las infecciones por salmonela en avicultura son de gran relevancia puesto que la carne de pollo puede ser fuente de infección en los brotes de toxiinfección alimentaria por *Salmonella* en el hombre (Poppe, 2000; Luful Kabir, 2010; Barrow & Freitas, 2011).

Mientras que en los países desarrollados, las infecciones por bacterias del género *Salmonella* en las explotaciones avícolas son particularmente importantes como problema de salud pública, por el papel de la carne de pollo y de los huevos como origen de brotes en el hombre, en los países en desarrollo ambos aspectos de la infección, como problema de salud pública y como problema que limita la rentabilidad de las explotaciones, son relevantes.

Con el fin de disminuir la morbilidad y la mortalidad asociada a las infecciones por salmonela en explotaciones avícolas se han empleado

antibióticos y como vacunas (Lillehoj *et al.*, 2000; Vandeplass *et al.*, 2010). También la selección genética de líneas de aves con mayor capacidad de respuesta inmunitaria puede tener utilidad en la profilaxis de esta infección. Más recientemente se han introducido o valorado nuevas opciones de control que incluyen el empleo de probióticos (Pascual *et al.*, 1999; Téllez *et al.*, 2001), mezclas de exclusión competitiva (EC) (Blankenship *et al.*, 1993; Stern *et al.*, 2001), prebióticos (Bailey *et al.*, 1991; Spring *et al.*, 2000; Fernandez *et al.*, 2002; Filho *et al.*, 2003), bacteriófagos (Atterbury *et al.*, 2007; Filho *et al.*, 2007) o algunos nuevos productos con actividad antimicrobiana y de origen natural (Venkitanarayanan *et al.*, 2013).

Entre los antibióticos que han sido empleados para el control de la salmonelosis en explotaciones de aves se encuentran la amoxicilina, tetraciclinas, sulfamidas potenciadas, espectinomicina, enrofloxacina y otras fluoroquinolonas (Lister & Barrow, 2008). La resistencia antimicrobiana es un fenómeno muy común entre las bacterias del género *Salmonella*, por lo que la realización de estudios de sensibilidad antes de iniciar la terapia antibiótica es fundamental. Sin embargo, es importante conocer que, aun empleando el antibiótico adecuado, el tratamiento no permite la eliminación completa de las infecciones por salmonelas de los colectivos animales ya que siempre existe un cierto número de individuos que desarrolla estados de portador. Los animales portadores mantienen la infección durante periodos prolongados de tiempo, sin presentar signos clínicos y pueden eliminar salmonelas al medio. Además, la utilización de antibióticos en el control de la salmonelosis aviar lleva asociado el desarrollo de resistencias a antimicrobianos que tienen particular relevancia al poder alcanzar al hombre.

En lo que respecta al empleo de vacunas, podemos destacar que, por lo general, se atribuye una mayor protección a las vacunas vivas atenuadas que a las vacunas inactivadas (Febewee *et al.*, 2001). Aunque existen algunos antígenos comunes, la inmunidad es, como mínimo, específica de serogrupo. Así, la vacunación frente a un serotipo concreto proporcionará protección frente a la infección por ese mismo serotipo y un cierto grado de protección cruzada frente a las infecciones por otros serotipos incluidos en el mismo serogrupo. Se

han empleado, de forma generalizada y durante años, vacunas para el control de la infección por las biovariedades Gallinarum y Pullorum y más recientemente, se han introducido vacunas para el control de las infecciones por *S. Enteritidis* y *S. Typhimuirum*.

Diversos autores, han propuesto que la receptividad a la infección por bacterias del género *Salmonella* puede ser modificada, especialmente en el caso de los pollos más jóvenes, mediante la actuación sobre la microbiota intestinal. Se ha demostrado que los pollos recién nacidos son más receptivos a la infección por *Salmonella* que los animales algo más mayores y esta resistencia se ha asociado al establecimiento de una microbiota adecuada, capaz de elevar la concentración de ácidos grasos volátiles en el intestino (Barnes *et al.*, 1979; Scheneitz & Mead, 2000). Diversos trabajos han evaluado, durante los últimos 20-25 años, el efecto de la administración de mezclas de EC o de productos probióticos en la infección por *Salmonella* en pollos de primera edad (Pascual *et al.*, 1999; Blankenship *et al.*, 1993; Stern *et al.*, 2001; Téllez *et al.*, 2001; Filho *et al.*, 2003). Kerr *et al.* (2013) llevaron a cabo, recientemente, un meta-análisis para determinar la eficacia de diferentes productos de EC en el control de infecciones por bacterias del género *Salmonella*. Analizaron más de 200 publicaciones y emplearon, finalmente, datos obtenidos a lo largo de más de 150 estudios que valoraban, en total, 14 productos de EC. Se demostró que la mayoría de estos productos eran capaces de reducir la colonización por *Salmonella* tras ser administrados a pollos broiler en las primeras 24 horas de vida.

3.2.- OBJETIVOS

El objetivo del presente estudio ha sido la valoración *in vivo* de la actividad frente a *Salmonella* de la acetamida furánica monobromada y de un producto probiótico constituido por aislados de bacterias del ácido láctico (BAL) de origen aviar, obtenidas de gallos de pluma de León y de perdices, utilizando un modelo de infección experimental con *Salmonella enterica* subsp. *enterica* servovar Enteritidis en pollos broiler.

Este objetivo general se desarrolló a través de los siguientes objetivos específicos:

- Determinación del efecto de ambos tratamientos en el aislamiento bacteriológico de *Salmonella* a partir de muestras de diferentes órganos tomadas tras el sacrificio de animales a los 7, 14 y 21 días del desafío con S. Enteritidis.
- Determinación del efecto de ambos tratamientos en el cuadro clínico mostrado por los animales en los 21 días siguientes al desafío con S. Enteritidis.
- Determinación del efecto de ambos tratamientos en el cuadro lesional e histopatológico a partir de la valoración macro y microscópica de muestras de diferentes órganos tomadas tras el sacrificio de animales a los 7, 14 y 21 días del desafío con S. Enteritidis.
- Determinación del efecto de ambos tratamientos en diferentes indicadores productivos determinados a lo largo del seguimiento de los animales durante los 21 primeros días de vida.

3.3.- MATERIALES Y METODOS

3.3.1.- Animales, instalaciones y manejo

El experimento se realizó en una única sala localizada en las instalaciones del Hospital Clínico-Veterinario de la Universidad de León. Al inicio del período experimental, la temperatura en dicha sala fue de 30°C, disminuyendo de forma progresiva a lo largo del período de seguimiento hasta un valor próximo a 21°C al final del mismo. La humedad relativa en la sala se mantuvo alrededor del 60-70 %.

Se utilizaron 75 pollitos de cebo, de 1 día de edad y de la línea Ross 308, incluyendo hembras y machos. Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos experimentales, de 25 pollitos cada uno. Cada uno de estos grupos se alojó en un contenedor de material plástico, con unas dimensiones de 97 cm de largo, 120 cm de ancho y 74 cm de alto, sin que existiera posibilidad de contacto directo con los animales de los otros dos grupos.

La crianza se desarrolló en condiciones similares a las de una explotación intensiva. Cada contenedor disponía de cama de paja, de un comedero tipo canal para pollitos, metálico y de 40 cm y de un bebedero de tipo campana, con una capacidad de cinco litros. Durante todo el experimento, los animales dispusieron de agua y pienso *ad libitum*. El pienso no contenía antibióticos (con excepción de salicomicina sódica como aditivo anticoccidial) y, con anterioridad a su administración, se comprobó mediante cultivo bacteriológico, la ausencia de *Salmonella* en muestras de 25 g. Además, los animales recibieron 23 horas de iluminación diarias durante los 24 días que se prolongó el estudio.

Antes de la entrada de los animales, la sala, incluyendo los tres contenedores, se limpió y se desinfectó empleando una combinación de formaldehído (Panreac, 50 mL/m³) y permanganato potásico (Panreac,

35 g/m³). La ausencia de *Salmonella* en las instalaciones tras la limpieza y desinfección fue comprobada mediante cultivo bacteriológico, recogiendo muestras de superficie mediante el empleo de gasas empapadas en agua de peptona.

La Figura 1 muestra las condiciones de alojamiento de los animales durante el experimento.



Figura 1. Instalaciones donde se alojaron los animales durante el estudio.

Durante el experimento se mantuvo un estricto control del movimiento de personas en la sala; solo se permitió el acceso a personal autorizado, empleando ropa y calzado específico y desinfectándose éste siempre a la entrada y a la salida de la sala.

La composición del pienso empleado en los tres grupos se muestra en la Tabla 1. Se trató de un pienso comercial para pollos camperos (Coren) y, como hemos mencionado, se administró a voluntad (Tabla 1).

Tabla 1. Composición del pienso comercial (Coren) empleado para la alimentación de los pollos durante el experimento.

Componentes	Cantidad (U/M)
Proteína bruta	18,5
Ceniza bruta	6,1
Fósforo	0,54
Lisina	0,96
Fibra bruta	3,0
Calcio	1,0
Sodio	0,19
Metionina	045
Aceites y grasas brutas	3,80
Aditivos (Por kg)	
Vitamina E672 (Vitamina A)	8800 UI
Vitamina E672 (Vitamina D ₃)	3200 UI
Vitamina 3A700 (Vitamina E) Alfa tocoferol.	20 UI
Oligoelementos (Por kg)	
Hierro (Sulfato ferroso, monohidrato)	40,0 mg
E ₄ Cobre (Sulfato cúprico, pentahidrato)	9,6 mg
E ₈ Selenio (Selenito sódico)	0,20 g
E ₆ Zinc (Sulfato de zinc, monohidrato)	72,0 mg
E ₅ Manganeseo (Sulfato manganeseo, monohidrato)	80,0 mg
E ₂ Yodo (Yoduro potásico)	1,5 mg
Hierro (Óxido férrico)	483 mg
Aminoácidos	
EC _{3.3.2.2} (L-Lisina)	0,6
3C3 (Análogo, hidroximetionina)	0,15
EC _{3.3.1} (L-Treonina)	0,02
Digestivos (Por kg)	
4a1600 Fitasa	500 (FTU)
Colorantes (Por kg)	
E161h (Zeaxantina)	0,13 mg
E161gr (Cantaxantina)	0,60 mg
E161b (Luteína)	1,13 mg
Coccidioestáticos (Por kg)	
5 1 766 (Salinomicina de sodio)	120 mg
Sacox 120	60 mg
Antioxidante (Por kg)	
E 324 Etoxiquina	50 mg
Aglomerantes (Por kg)	
E 562 Sepiolita	5621,60 mg

3.3.2.- Diseño experimental

Inmediatamente tras su llegada a las instalaciones, los 75 pollitos fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos experimentales, de 25 animales cada uno.

- **Grupo 1 (control positivo).** Desafiados en el día 4 de vida mediante la administración por vía oral, de una dosis de 0,5 mL por pollito de un cultivo en medio líquido de un aislado de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (1×10^6 UFC/mL).
- **Grupo 2 (grupo acetamida furánica monobromada).** Desafiados de forma idéntica al grupo 1 (administración por vía oral de 0,5 mL por pollito de un cultivo en medio líquido del mismo aislado del serovar Enteritidis) y a la misma edad (4 días de vida) y que recibieron, igualmente por vía oral, acetamida furánica monobromada, a dosis de 0,5 mL/pollito de una solución con una concentración de 50 mg/mL, en los días 1, 2 y 3 postinfección (días 5, 6 y 7 de vida).
- **Grupo 3 (grupo probiótico).** Recibieron, por vía oral, en los días 1, 2 y 3 de vida una mezcla probiótica constituida por tres aislados del género *Lactobacillus*, *L. reuteri*, *L. mucosae* y *L. salivarius*, a una dosis de 0,5 mL/pollito de una suspensión con una concentración de 1×10^9 UFC/mL. En el día 4 de vida, los animales de este grupo fueron desafiados de forma idéntica a los grupos 1 y 2, mediante la administración por vía oral de una dosis de 0,5 mL por pollito de un cultivo (1×10^6 UFC/mL) de *S. Enteritidis*.

Diariamente, los tres grupos experimentales fueron valorados con respecto a la presentación de signos clínicos y de bajas y se determinó el consumo de alimento mediante el pesado del pienso administrado y del pienso remanente tras 24 horas. Además, todos los animales fueron pesados, de forma individual, a su llegada a las instalaciones, en el primer día de vida, así

como en los días 7, 14 y 21 de vida, empleando para ello una balanza KERN/FKB (max. 8 kg). La relación entre el pienso consumido y la ganancia de peso semanal permitió estimar el índice de conversión para cada uno de los tres grupos experimentales en la primera, segunda y tercera semana de vida.

Se sacrificaron 7 animales de cada uno de los grupos experimentales en los días 7 y 14 postinfección (días 11 y 18 de vida de los pollitos) y el resto, 11 animales por grupo, fueron sacrificados en el día 21 postinfección, a los 25 días de vida. El sacrificio se realizó mediante dislocación cervical, un método aceptado para el sacrificio de aves de corta edad (Close *et al.*, 1996). En los días 7 y 14 postinfección, del total de 7 pollitos sacrificados por grupo, 5 fueron empleados para el aislamiento de *Salmonella* de diferentes órganos (estudio microbiológico) mientras que otros dos fueron remitidos al Servicio de Anatomía Patológica de la Universidad de León con el fin de evaluar las lesiones en diferentes órganos (estudio histopatológico). En el día 21 postinfección se sacrificaron los pollitos restantes en cada grupo experimental, destinándose 3 animales al estudio histopatológico y el resto al estudio microbiológico.

3.3.3.- Preparación del inóculo para el desafío experimental

El aislado empleado para el desafío de los animales fue una cepa de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis procedente de explotaciones de aves con problemas clínicos de salmonelosis de Cuba y mantenido en congelación a -80°C.

Este aislado se sembró en placas de agar TSA (Triptona Soya Agar) (Merck) a 37°C y en aerobiosis, resuspendiéndose las colonias obtenidas tras 24 horas de incubación en 3 mL de caldo nutritivo (Merk). Con el fin de obtener un cultivo en crecimiento exponencial, esta suspensión se empleó para inocular un frasco con 100 mL de caldo nutritivo (Merk), incubando a 37°C, en aerobiosis y en agitación durante 1 hora y media. La concentración bacteriana en el cultivo obtenido se determinó mediante recuento en cámara de Neubauer, siendo de 4×10^6 UFC/mL.

Para la infección de los 75 pollitos, partiendo de un volumen inicial de 100 mL de inóculo, se administró a cada animal una dosis única de 0,5 mL, directamente con una jeringuilla en la boca, en el día 4 de vida.

3.3.4.- Preparación de la acetamida furánica monobromada

La acetamida furánica monobromada se obtuvo mediante la metodología descrita por Almeida (1994), en el Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad de las Villas (Cuba), con un grado de pureza del 97 %.

Se preparó una solución madre, disolviendo 500 mg del producto en 500 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) y completando con suero fisiológico hasta un volumen total de 1 mL. A partir de la solución madre se preparó una dilución 1:10 en solución isotónica, para obtener una solución final con una concentración de 50 mg/mL. Cada uno de los 25 pollitos del grupo experimental 2 recibió, en los días postinfección 1, 2 y 3 (días de vida 5, 6 y 7), una dosis de 0,5 mL de la solución final que se administró directamente con una jeringuilla en la boca.

3.3.5.- Preparación de la mezcla probiótica

La mezcla probiótica se preparó a partir de la combinación de tres aislados de *Lactobacillus*, *L. reuteri*, *L. mucosae* y *L. salivarius*, procedentes del tracto digestivo (heces, contenido intestinal y mucosa) de gallos de pluma de León y de perdices que fueron seleccionados en base a sus potenciales características probióticas. Los tres aislados seleccionados cumplieron, además, los criterios de selección propuestos por la EFSA en lo que respecta a la sensibilidad antimicrobiana (EFSA, 2012).

Las cepas, mantenidas a -80°C, fueron descongeladas y sembradas en placas de agar MRS (Merk), incubándose a 39°C y en condiciones de anaerobiosis durante 48 horas en agitación (90 rpm). Las colonias obtenidas fueron resuspendidas en tubos que contenían 5 mL de caldo nutritivo, incubándose nuevamente a 39°C y en condiciones de anaerobiosis durante 18 horas y en agitación.

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la mezcla de las tres

cepas, en un frasco estéril y con una relación 1:1:1 (volumen:volumen), mezclando 5 mL de cada cultivo y obteniendo un volumen total de 15 mL. Con el fin de estimar la concentración incorporada de cada uno de los aislados se realizó un recuento en cámara de Neubauer de cada uno de los tres cultivos. Los valores obtenidos fueron de $1,05 \times 10^9$ UFC/mL para el cultivo de *L. reuteri*, de $9,88 \times 10^9$ UFC/mL para el cultivo de *L. mucosae* y de $2,1 \times 10^9$ UFC/mL para el cultivo de *L. salivarius*.

La mezcla probiótica obtenida se administró a todos los animales del grupo experimental 3, a una dosis de 0,5 mL por pollito y por vía oral, directamente con una jeringuilla en la boca, durante los días 1, 2 y 3 de vida de los animales.

3.3.6.- Aislamiento e identificación de *Salmonella*

Para el estudio microbiológico, tras el sacrificio de los animales, se llevó a cabo la necropsia y se recogieron el bazo, corazón, hígado, riñón e intestino de cada animal. Cada uno de estos órganos se procesó de forma separada. Para ello, se depositó en un frasco estéril conteniendo 20 mL de agua de peptona (Figura 2) y se cortó, empleando unas tijeras estériles, en fragmentos de pequeño tamaño. El aislamiento se llevó a cabo siguiendo la norma EN-ISO 6579:2002/Amd 1: 2007 para la detección de *Salmonella* spp. en heces y en muestras ambientales de la producción animal primaria que consta de tres etapas: preenriquecimiento, enriquecimiento selectivo y cultivo en medio selectivo y diferencial.

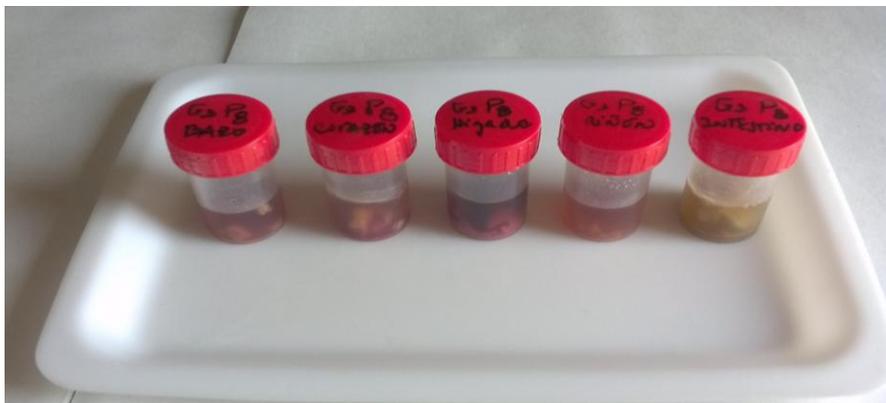


Figura 2. Recolección de muestras de órganos para la realización del

aislamiento microbiológico de *Salmonella*.

En la etapa de preenriquecimiento, la suspensión inicial de cada órgano en agua de peptona fue incubada durante 20 horas a 37°C. A continuación, se llevó a cabo una etapa de enriquecimiento selectivo transfiriendo 0,1 mL del agua de peptona sobre tres puntos o spots en una placa de medio semisólido Rappaport-Vassiliadis (MSRV) (Merck), incubando a 41°C durante 24 y 48 horas. Las placas que mostraron zonas o halos de migración fueron sembradas, recogiendo material del borde de los halos de migración y transfiriéndolo a placas de dos medios selectivos y diferenciales: placas de agar Xilosa-Lisina-Deoxicolato (XLD) (Merk) y placas de agar verde brillante (BGA) (Merk). Estas placas se incubaron durante 24 horas a 37°C, reconociéndose los positivos por la presencia de colonias características en estos medios: colonias con el centro negro debido a la producción de sulfídrico (SH₂) en el caso del agar XLD y colonias opacas de color rosa en el caso del agar BGA.

Con el fin de confirmar los aislamientos, las colonias sospechosas fueron sembradas en agar triptona soja (TSA) (Merk) y confirmadas mediante las pruebas bioquímicas del indol y mediante un test comercial (MUCAP[®] test, Biolife). Finalmente, una cierta proporción de los aislados recuperados fueron serotipados siguiendo el esquema Kauffmann-White y empleando antisueros comerciales (Statens Serum Institut).

3.3.7.- Estudio histopatológico

Para el estudio histopatológico, se sacrificaron, por dislocación cervical, 2 animales por grupo en los días 7 y 14 postinfección y 3 animales por grupo en el día 21 postinfección. Los cadáveres se mantuvieron refrigerados a 0°C desde el sacrificio hasta la realización de la necropsia, entre 4 y 8 horas postmortem, llevándose a cabo inmediatamente la toma de muestras de órganos y tejidos.

Se tomaron muestras de hígado (dos de cada lóbulo), intestino (dos de duodeno, tres de yeyuno, dos de ileon y dos de cada ciego, una en la zona

media y otra de la parte de unión con el colon), pulmón (sección trasversal completa de uno de los pulmones), corazón (sección trasversal completa incluyendo ambos ventrículos), riñón (sección trasversal del lóbulo craneal de ambos riñones) y encéfalo (sección longitudinal de uno de los hemisferios que incluía el encéfalo completo). También se recogieron muestras del bazo, bolsa de Fabricio, páncreas, tráquea, laringe, fosas nasales, músculo esquelético y piel.

Todas las muestras fueron incluídas en formalina al 10 % tamponada para su fijación. Posteriormente fueron incluídas en parafina (inclusor giratorio Myr), realizándose los bloques en una estación Myr AP280. Se obtuvieron secciones de 3 µm en un microtomo de rotación Shandon Finesse.

Las secciones fueron teñidas, en su gran mayoría, con la tinción de hematoxilina y eosina (HE) y, en algunas seleccionadas, con la tinción de Gram para secciones histológicas. Las preparaciones fueron observadas con un microscopio Nikon Eclipse E400 y las microfotografías se realizaron en el fotomicroscopio.

Se realizó una semicuantificación de las lesiones observadas, de forma conjunta para los animales del mismo día de sacrificio y del mismo grupo experimental, detallando en cada órgano afectado la lesión según la clasificación propuesta en la Tabla 2. En dependencia de la extensión y la gravedad, las lesiones se clasificaron como 0, +, ++, +++.

**Tabla 2. Clasificación semicuantitativa de las lesiones observadas en los
diferentes órganos.**

Órganos	0	+	++	+++
Intestino	Sin lesión	Presencia de infiltrado celular escaso y focal o ausencia del mismo en lámina propia, junto con necrosis aisladas de células epiteliales en vellosidades y criptas.	Lesiones más extensas, con necrosis de alguna cripta e infiltrado celular difuso de escaso a moderado en lámina propia.	Lesiones difusas con numerosas células epiteliales necróticas, así como necrosis de criptas completas e infiltrado celular difuso moderado a intenso en lámina propia.
Hígado	Sin lesión	Presencia de 1 a 3 focos generalmente con menos de 10-15 células, sin otras alteraciones.	Presencia de 3 a 8 focos con o sin necrosis aisladas de hepatocitos perifocales.	Presencia de 6 ó más focos con presencia de necrosis aisladas y células periportales, siendo además en esta lesión donde se observaban focos con necrosis central.
Pulmón	Sin lesión	Presencia de pequeños infiltrados celulares focales y localizadas exclusivamente en lámina propia bronquial.	Presencia difusa de escasa a moderada de células solo en lámina propia bronquial.	Presencia de intenso infiltrado celular en lámina propia y peribronquial, extendiéndose hasta el parabronquio e intersticio alveolar.
Miocardio	Sin lesión	Presencia de 1-3 focos de miocarditis focal purulenta,	Presencia de 4-10 focos de miocarditis focal purulenta,	
Bazo y bolsa de Fabricio	Sin lesión	Presencia de depleción linfoide escasa, casi normal, sin cariorexis y lisis evidente.	Presencia de depleción linfoide moderada a intensa sin cariorexis o siendo esta esporádica.	Presencia de depleción linfoide intensa con numerosas células en cariorexis.
Riñón	Sin lesión	Presencia de tubulonefrosis muy focal.	Presencia de tubulonefrosis multifocal.	Presencia de nefrosis más numerosas acompañadas de nefritis intersticial purulenta multifocal.
Encéfalo	Sin lesión	Presencia de algún manguito y alguna neurona afectada	Presencia de manguitos en varias localizaciones (nunca en número total superior a 8) y neuronas degeneradas en varias localizaciones.	

En el caso de observarse diferencias evidentes dentro del mismo grupo de animales y el mismo día experimental, éstas se detallaron en observaciones junto con otras particularidades.

3.3.8.- Análisis estadístico

Toda la información recogida durante el seguimiento (resultados de bacteriología, pesos y consumos de pienso) fue introducida en una hoja de cálculo (Excell) y utilizada para estimar el resto de parámetros (ganancia de peso, consumo semanal de pienso e índice de conversión). La ganancia de peso semanal se estimó, para cada pollito, a partir de la diferencia entre los pesos al final y al inicio del periodo considerado. La estimación del índice de conversión se llevó a cabo para cada grupo experimental y en los días 7, 14 y 21 de edad, como el cociente entre el consumo de pienso determinado para el grupo en el periodo de tiempo considerado y la ganancia de peso media en los pollitos durante ese mismo periodo de tiempo.

La comparación de la proporción de resultados bacteriológicos positivos en función del grupo experimental, del día de muestreo o del órgano valorado se llevó a cabo mediante el test de Chi^2 para un nivel de significación del 95 % ($p \leq 0,05$). En caso de encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre dos proporciones se estimó la fuerza de la asociación mediante la determinación del riesgo relativo (RR) y su intervalo de confianza 95 %.

Para la comparación de los valores medios determinados entre los diferentes grupos experimentales para las variables cuantitativas (pesos o ganancias) se llevó a cabo, en una primera etapa, el test de Barlett con el fin de conocer la homogeneidad de las varianzas. Cuando el test de Barlett determinó que las varianzas eran homogéneas ($p > 0,05$), se empleó el test de ANOVA para la comparación, estimándose el estadístico F y su probabilidad asociada. En caso contrario, si el test de Barlett determinó que las varianzas no eran homogéneas ($p \leq 0,05$), se empleó un test no paramétrico para valorar la asociación, el test de Kruskal-Wallis, determinando el estadístico H y su probabilidad asociada. En ambos casos, las diferencias se consideraron como estadísticamente significativas si $p \leq 0,05$.

Todo el análisis estadístico se llevó a cabo empleando el paquete Epi Info™ 7.1.4, un programa de distribución libre desarrollado por el Center for Diseases Control de EE.UU.

3.4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1.- Aislamiento bacteriológico

El aislamiento de *Salmonella* a partir de los diferentes órganos se llevó a cabo siguiendo la norma estandarizada ISO 6579. Esta norma estaba inicialmente diseñada para la detección de *Salmonella* en alimentos y piensos, pero fue modificada en el año 2007 con el fin de adaptarla a la identificación de *Salmonella* en muestras de heces y en muestras ambientales de la producción animal. Consta de tres etapas bien diferenciadas; en un primer momento se lleva a cabo un pre-enriquecimiento en agua de peptona, con el fin de facilitar la recuperación de las bacterias dañadas o con viabilidad comprometida, lo cual incrementa la sensibilidad del método (Mojojiman, 2004). El agua de peptona ha sido ampliamente utilizada en los protocolos de detección de *Salmonella* en alimentos con muy buenos resultados. La peptona es una fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales mientras que el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y los fosfatos forman un sistema tampón que regula el pH del medio, favoreciendo la viabilidad de los microorganismos (Edel & Kampelmacher, 1973). El empleo de este pre-enriquecimiento es particularmente importante en muestras procedentes de animales asintomáticos, en muestras ambientales o de piensos, en los que el grado de contaminación bacteriana no es muy elevado (Sánchez, 2010).

Seguidamente, se llevó a cabo un enriquecimiento en un medio selectivo, empleándose con este fin el medio semisólido Rappaport-Vassiliadis e incubando durante 24 y 48 horas. Aquellos aislados que dieron un resultado negativo o dudoso a las 24 horas, fueron incubados hasta las 48 horas. Este medio semisólido es más rico en nutrientes que el caldo Rappaport-Vassiliadis que se empleaba anteriormente en el enriquecimiento selectivo de *Salmonella* y tiene mayor capacidad tampón y una menor concentración de cloruro de magnesio. Su presentación en forma de agar semisólido permite el crecimiento y migración de la gran mayoría de los serotipos de *Salmonella*, ya que poseen

flagelos (con la excepción de los serotipos inmóviles, biovariedades Gallinarum y Pullorum de *S. Gallinarum*) y la diferenciación de otros microorganismos no flagelados con capacidad para multiplicarse en este medio (Voogt *et al.*, 2001).

La Figura 3 muestra una placa de medio semisólido Rappaport-Vassiliadis con el característico halo de migración.

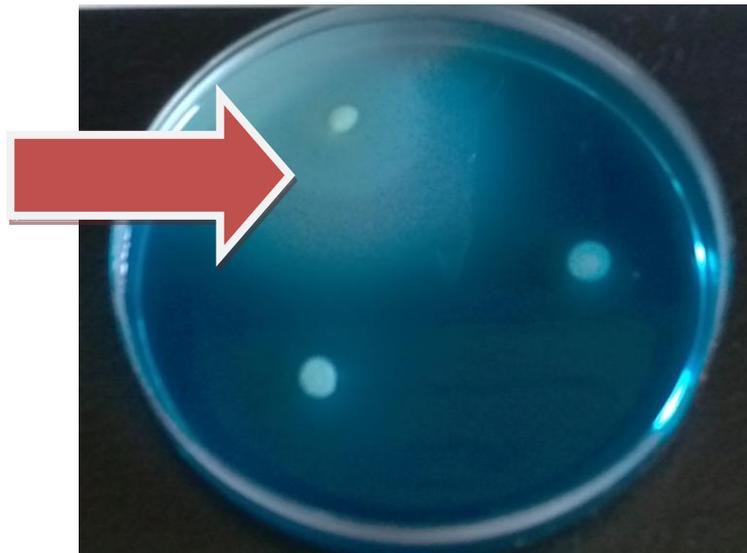


Figura 3. Halo de migración asociado al crecimiento de *Salmonella enterica* tras 24 horas de incubación en medio semisólido Rappaport-Vassiliadis (MSRV).

Otros medios que pueden ser empleados para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella* incluyen el caldo Muller-Kauffman con tetrionato sódico, medios con selenito F, con selenito cisteína o con verde brillante. Algunos estudios han propuesto que el caldo Rappaport-Vassiliadis es más sensible que otros como el Muller-Kauffman tetrionato (Bager & Petersen, 1991).

La tercera etapa del aislamiento incluyó el cultivo en dos medios selectivos y diferenciales. Entre los medios más empleados en esta etapa se encuentran el agar Rambach, el agar de identificación de *Salmonella* (KM-ID), el agar Hekto-Enteric, el agar xilosa-lisina-tergitol 4 (XLT4), el agar verde

brillante o nuevos medios cromogénicos como el agar "brilliance". En nuestro caso empleamos el medio XLD, donde las colonias de *Salmonella* se caracterizan por su color negro, asociado a la producción de sulfídrico, y el agar verde brillante (BGA), donde aparecen de color rosa (Figura 4). Estos dos medios han sido señalados por Caffer & Terragno (2001) como medios altamente selectivos para la identificación y aislamiento de *Salmonella enterica*.

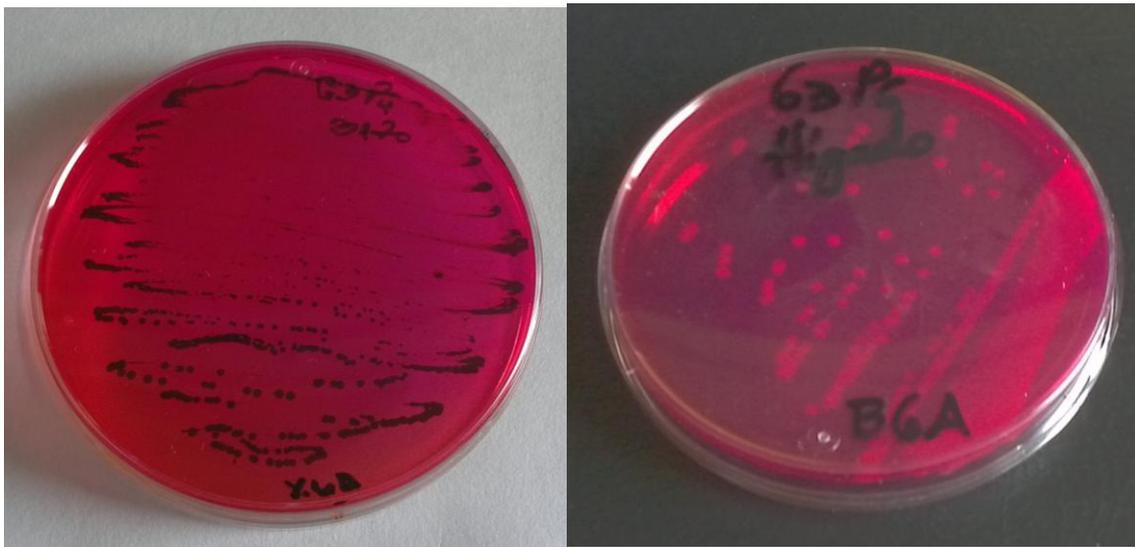


Figura 4. Características colonias de *Salmonella enterica* en medio XLD, de color negro (izquierda), y en medio agar verde brillante, de color rosa (derecha).

La confirmación de las colonias sospechosas se llevó a cabo mediante la prueba del indol, indol negativas, y la prueba de la 4-metilumbeliferona caprilato fluorescente (Mucap® test Biocheck) (Figura 5). Aunque algunos autores (Weill *et al.*, 2004; Ko *et al.*, 2005; Poppe *et al.*, 2005) han descrito que en algunas ocasiones pueden ser necesarias pruebas bioquímicas adicionales para identificar algunas variantes particulares, como por ejemplo la prueba del D-tartrato para la diferenciación de *S. Paratyphi B* var. Java de *S. Paratyphi B*, en el presente estudio se trataba de animales desafiados con una cepa bien conocida del serovar Enteritidis por lo que no se consideró necesario la realización de pruebas bioquímicas adicionales.



Figura 5. Confirmación mediante la prueba de la 4-metilumbeliferona caprilato fluorescente o prueba de Mucap (presencia de fluorescencia).

En total, se procesaron 265 muestras de órganos para el aislamiento de *Salmonella* siguiendo el procedimiento descrito en la norma EN-ISO 6579:2002/Amd 1: 2007. Se observaron halos de migración en medio semisólido MSR/V en un total 181 muestras (68,3 %), todas ellas a las 24 horas de incubación. Se observaron 164 colonias sospechosas en medio XLD (61,9 %) y un valor ligeramente inferior, 160, en medio BGA (60,4 %). Mediante las pruebas bioquímicas se confirmó que se trataba de *Salmonella enterica* en un total de 164 muestras (61,9 %). Finalmente, en una selección de los aislados recuperados se llevó a cabo el serotipado, confirmándose, en todos los casos, las salmonelas aisladas como pertenecientes al serovar Enteritidis.

Estos resultados corroboran la utilidad de la metodología empleada para la detección de aislados de *Salmonella* móviles en pollos así como el éxito del desafío realizado con un aislado de *S. Enteritidis* de origen aviar recuperado en explotaciones de Cuba. La capacidad de este serovar para producir infecciones sistémicas está ampliamente descrita (Ruiz *et al.*, 2008; Gast *et al.*, 2013).

Atendiendo a los diferentes órganos utilizados para el aislamiento de *Salmonella* podemos señalar que la proporción de positivos fue del 45,3 %, 81,1 %, 81,1 %, 47,2 % y 54,7 % para el corazón, bazo, hígado, riñón y contenido del ciego, respectivamente. En coincidencia con nuestros resultados, Chacana & Tersolo (2003) o, más recientemente, Gast *et al.* (2013) han descrito que los órganos de elección para el aislamiento de *S. Enteritidis* son el hígado, el bazo y el contenido del ciego. Otros trabajos, indican que en ocasiones, en las infecciones septicémicas por bacterias del género *Salmonella*, la proporción de resultados positivos es más elevada en órganos internos, diferentes del tracto digestivo, puesto que la excrección fecal se ve limitada o disminuida en ciertos periodos de la enfermedad (Sánchez, 2010). Por el contrario, en el caso de infecciones crónicas por el serovar Gallinarum, los órganos de preferencia para realizar el aislamiento de *Salmonella* son los ovarios, los testículos o incluso el contenido de articulaciones afectadas.

3.4.2.- Resultados bacteriológicos, cuadro clínico y lesional e índices productivos en el grupo control

Un total de 25 pollitos fueron desafiados en el día 4 de vida con una dosis de 2×10^6 UFC de un aislado de origen cubano de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis y sirvieron como grupo control. La infección fue monitorizada con el fin de caracterizar el modelo experimental así como para servir de referencia para la comparación con los grupos de tratamiento. Uno de los animales de este grupo murió durante el procedimiento de inoculación por vía oral por lo que el total de individuos monitorizados del grupo control fue de 24.

Para el seguimiento bacteriológico de la infección se sacrificaron 5 animales en los días 7 y 14 postdesafío, respectivamente, y 7 animales en el día 21 postdesafío. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Aislamiento bacteriológico de *Salmonella* en diferentes órganos tras el sacrificio a los 7, 14 y 21 días postinfección de pollitos desafiados en el día 4 de vida con un aislado de *S. Enteritidis*.

	Día 7 postinfección		Día 14 postinfección		Día 21 postinfección		TOTAL	
	Número positivos	(%)	Número positivos	(%)	Número positivos	(%)	Número positivos	(%)
Corazón	3	60 %	3	60 %	2	28,6 %	8	47 %
Bazo	5	100 %	5	100 %	7	100 %	17	100 %
Hígado	5	100 %	5	100 %	7	100 %	17	100 %
Riñón	4	80 %	4	80 %	2	28,6 %	10	58,8 %
Intestino	4	80 %	4	80 %	3	42,8 %	11	64,7 %
TOTAL	21	84 %	21	84 %	21	60 %	63	74,1 %

No existió mortalidad asociada a la infección. Los signos clínicos observados en los animales del grupo control a lo largo del seguimiento fueron limitados. Únicamente mostraron diarrea a partir del día 7 postinfección, siendo evidente un empastamiento en la región anal en una cierta proporción de los pollitos (aprox. 20 %) hasta el final del seguimiento en el día 21 postinfección (día 25 de vida). Estos resultados son similares a los descritos previamente en infecciones experimentales por bacterias del género *Salmonella* en pollitos de corta edad por otros autores (Borie & Sánchez, 1998; Chacana & Tersolo, 2003; Huerta *et al.*, 2005; Ruano, 2009; Sánchez, 2010).

En lo que respecta a las lesiones, 2 animales de este grupo fueron sacrificados en el día 7 postinfección, otros 2 animales en el día 14 y 3 animales en el día 21 postinfección. A la necropsia, de forma general, no se apreciaron lesiones macroscópicas destacables en los animales del grupo control. El estudio microscópico permitió la observación de lesiones histológicas que variaron en intensidad y extensión en función del día de sacrificio.

Tanto en los animales del grupo control como en los de los otros dos grupos experimentales, los órganos en los que se siempre se observaron lesiones fueron el hígado, el intestino delgado (yeyuno e íleon), el intestino grueso (ciego y colon) y el pulmón. Se apreciaron lesiones de forma más inconstante en miocardio, encéfalo, bolsa de Fabricio, bazo y riñón mientras que no se detectaron lesiones microscópicas en el resto de los tejidos y órganos estudiados.

La Tabla 4 muestra la caracterización semicuantitativa de las lesiones detectadas en los diferentes días de sacrificio y en los diferentes órganos en los animales del grupo control. Como se ha indicó en el apartado de Material y Métodos, estas lesiones se clasificaron como 0, +, ++ o +++ en dependencia de su extensión y gravedad.

Tabla 4. Valoración semicuantitativa de las lesiones microscópicas observadas en los diferentes días postinfección y en los diferentes órganos en los pollitos del grupo experimental control desafiados en el día 4 de vida con un aislado de *S. Enteritidis*.

Órganos	Días postinfección		
	7	14	21
Intestino	++	++	+ a ++ (*)
Hígado	+++	++	++
Pulmón	0 y +++ (*)	+++	++
Miocardio	0	0	+
Bazo	+	0	0
Bolsa de Fabricio	0	0	+
Riñón	0	0	+
Encéfalo	0	0	+

La descripción de la clasificación semicuantitativa aparece en la Tabla 2.

* ver descripción de las diferencias detectadas en el texto

Cabe destacar la ausencia de lesión en el pulmón de un animal a los 7 días postinfección que contrasta con las lesiones graves observadas en este mismo órgano en el otro pollito sacrificado en ese mismo día. Las lesiones observadas tanto en hígado como en intestino fueron muy similares en los días 7 y 14 postinfección. A los 21 días postinfección, las lesiones intestinales variaron en intensidad entre los tres animales sacrificados así como entre las diferentes secciones estudiadas, tanto en el intestino delgado como en el intestino grueso. No obstante, con mayor o menor intensidad, todos los tramos intestinales de todos los animales presentaron lesiones.

En lo que respecta a las lesiones intestinales, podemos señalar que fueron las más constantes y graves en todos los animales estudiados, constituyendo enteritis moderadas a graves (++ o +++), compatibles con enfermedad clínica o subclínica. A los 7 días postinfección, se observó en el grupo control enteritis necrótica activa, de subaguda a crónica, tanto en intestino delgado como en intestino grueso. Esta enteritis necrótica y proliferativa, formada por un infiltrado de células inflamatorias con macrófagos y heterófilos mayoritariamente y algunos linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia, presentó diferente grado de intensidad, desde leve y focal, afectando a algunas vellosidades, a muy intenso y difuso, provocando la separación entre criptas y el incremento de grosor de vellosidades. También se observó una hiperplasia de células epiteliales de las criptas calificada como enteritis proliferativa grave (Figura 6).

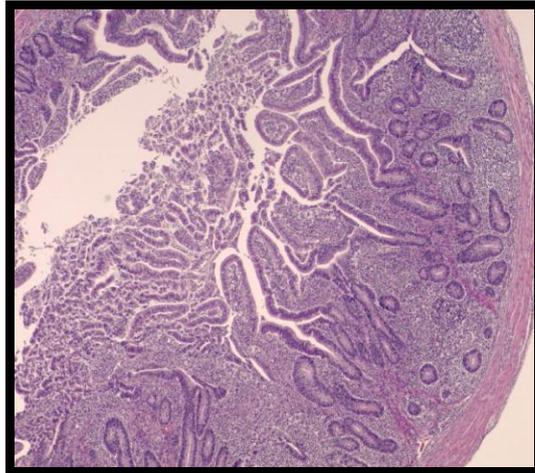


Figura 6. Enteritis proliferativa difusa en tonsila cecal de moderada a grave (7 días postinfección) (HE 40X).

Además se pudo demostrar la presencia de degeneración y necrosis (picnosis nuclear, cariorexis y lisis) de las células epiteliales de las vellosidades intestinales, siendo más intensa y afectando a un número mayor de células en las criptas. Estas últimas, en algunos animales, llegaron a desaparecer por necrosis completa de las mismas. En estos casos, se apreciaron bacilos Gram negativos en las lesiones, compatibles con *Salmonella* spp.

De igual manera a los 7 días postinfección en los pollitos de este grupo control y en el pulmón se observó bronquitis y neumonía peribronquial, caracterizada por la presencia de infiltrado celular, formado principalmente por macrófagos, acompañados de linfocitos y heterófilos, localizados en la lámina propia y en la submucosa bronquial y extendiéndose, en algunos casos, a la periferia del bronquio, formando un anillo o manguito peribronquial (Figura 7), así como hasta el parabronquio próximo. La lesión en parabronquios y en tabiques alveolares (intersticio) se limitó a los casos más graves y a las zonas peribronquiales, observándose también infiltrados celulares periarteriales. En estos casos la lesión llegaba a afectar a una proporción de entre el 25 % y el 40 % de la superficie de la sección pulmonar, pudiendo considerarse como bronconeumonías moderadas a graves. No se apreciaron lesiones del epitelio ni alteraciones en la luz alveolar en ningún caso.

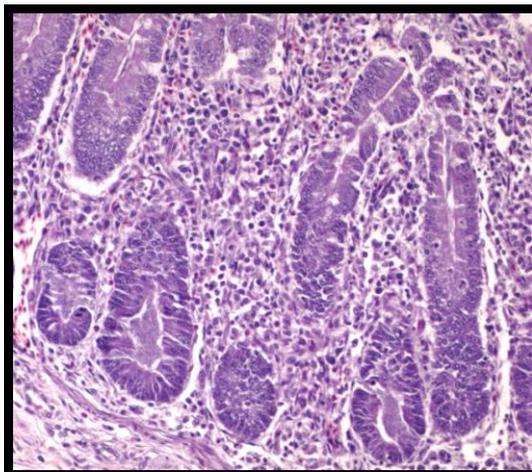


Figura 7. Infiltrado de células inflamatorias en la lámina propia y peribronquial del pulmón sin apenas lesión en epitelio (HE 200X).

Finalmente se evaluaron parámetros productivos en los animales del grupo control (Tabla 5). Para ello se anotó de forma diaria el consumo de pienso en el lote y los pollitos fueron pesados en los días 1, 7, 14 y 21 de vida.

Tabla 5: Peso, ganancia de peso, consumo de pienso e índice de conversión estimado a los 1, 7, 14 y 21 días de vida en los pollitos desafiados a los 4 días de edad con un aislado de *S. Enteritidis*.

	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21
	Media (DE)			
Promedio peso/pollito (g)	38,78 (0,56)	141,49 (0,68)	338,74 (0,52)	642,99 (0,41)
Ganancia media semanal peso/pollito (g)		102,69 (0,92)	197,47 (0,82)	304,26 (0,53)
Consumo estimado semanal pienso/pollito (g)		135,5	327,8	547,0
Índice de conversión semanal		1,32	1,66	1,80

La estimación del índice de conversión se llevó a cabo para la primera,

segunda y tercer semanas de vida de los pollitos, dividiendo el total de pienso consumido durante la semana por el grupo de pollitos por la ganancia de peso en ese mismo periodo de tiempo.

De forma general y como cabría esperar, el rendimiento productivo alcanzado fue inferior a los objetivos definidos por Aviagen para los pollos de engorde de la línea Ross 308 (Aviagen, 2012) que se muestran en la Tabla 6. De acuerdo a estos criterios, el peso medio en el primer día de vida sería de 42 g, a los 7 días de vida de 185 g, a los 14 días de 473 g y de 916 g a los 21 días, datos sensiblemente superiores a los observados en nuestro grupo control. Sin embargo, es evidente que estas referencias no pueden compararse de forma directa con los datos obtenidos por nosotros puesto que las condiciones de cría estuvieron condicionadas por las instalaciones y por la realización del desafío experimental.

Tabla 6: Objetivos de rendimiento (peso, ganancia de peso y consumo de pienso) para pollos de engorde de la línea Ross 308 (Avigen, 2012).

	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21
Promedio peso/pollito (g)	42	185	473	916
Ganancia media semanal peso/pollito (g)		115	265	420
Consumo estimado semanal pienso/pollito (g)		166	538	1.182

Para que se pueda producir una infección bacteriana es necesario que el microorganismo implicado alcance un ambiente adecuado, en el cual pueda llevar a cabo la colonización y multiplicación. La enfermedad infecciosa se producirá cuando este microorganismo exprese sus factores de virulencia y sea capaz de producir lesiones en el hospedador (Polotsky *et al.*, 1994; Madigan *et al.*, 2004). Este proceso supone una interacción hospedador-microorganismo que incluye diferentes fases incluyendo adherencia, invasión, colonización y

crecimiento, toxicidad y daño tisular.

Las bacterias del género *Salmonella* generalmente penetran a través del tracto gastrointestinal, se adhieren a la mucosa y luego se multiplican invadiendo los tejidos de las aves (Snoey'ebos, 1989). Las endotoxinas juegan un papel importante en su patogenicidad y pueden ser responsables de lesiones de necrosis hepáticas asociadas a cepas altamente patógenas. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el cuadro clínico asociado a la infección por *Salmonella* en pollos broiler depende en gran medida del aislado, de su serotipo o incluso del fagotipo (Borie & Sánchez, 1998). De forma general, se asume que estas enterobacterias pueden producir retraso del crecimiento y mortalidad. En el caso de las aves reproductoras, el cuadro clínico asociado es generalmente subclínico.

En nuestro modelo experimental la aparición de los primeros síntomas se produjo a los 7 días del desafío, en coincidencia con observaciones previas que describen un periodo de incubación de entre 4 y 6 días en las infecciones por *Salmonella* en pollos (May, 1988; Chacana & Tersolo, 2003). Estos signos clínicos fueron muy limitados, observándose únicamente diarrea, que apareció en el día 7 postinfección y que provocó el empastamiento de la cloaca en una cierta proporción de los animales. Este resultado es similar a lo reportado por Back (2012), quien no detectó signos clínicos relevantes en la gran mayoría de los pollitos infectados por *S. Enteritidis*.

Por el contrario, existe un cierto número de experiencias que describen un impacto clínico más severo, generalmente empleando los serovares adaptados al hospedador aviar. Así, el índice de mortalidad asociado a la tifosis y pullorosis en pollos y pavos varía entre el 1 y el 100 %. Revollo (2012) describe que las aves afectadas de pullorosis muestran signos clínicos variables e inespecíficos, incluyendo depresión, tendencia a aglomerarse, dificultad respiratoria, pérdida o disminución del apetito y presencia de excretas blancas que se adhieren a las plumas alrededor de la cloaca. Además, en las presentaciones subagudas de la pullorosis pueden aparecer problemas en las articulaciones, especialmente cuando se trata de aves en crecimiento,

resultando en desarrollo insuficiente.

La mortalidad asociada a las infecciones experimentales por *Salmonella* en pollitos de corta edad es, igualmente, muy variable. Springer (1990) reportó un 10 % de mortalidad mientras que para Barrow (1990) esta mortalidad puede alcanzar cifras elevadas, entre el 88 y el 96 % de los pollitos. Aparte de otros factores como la edad de los animales en el momento del desafío, su estado inmunitario, sexo, raza o línea genética, las características del aislado empleado para el desafío experimental, incluyendo el serovar, modifican en gran medida la presentación clínica y la evolución de la infección.

En el caso particular de las infecciones por aislados del serovar Enteritidis, podemos destacar que Sader *et al.* (1969) describieron la aparición de bajas en pollitos desafiados con una dosis similar a la empleada por nosotros, 10^6 UFC, y administrada por vía oral entre los 2 y los 12 días de vida. Sin embargo, y en coincidencia con nuestras observaciones, otros trabajos reportan que las infecciones por salmonelas del serovar Enteritidis producen un escaso número de bajas en las granjas de pollos y que la gran mayoría de los animales infectados no muestran sintomatología aparente (EFSA, 2013). De hecho, esta presentación subclínica facilita la participación de las aves como fuentes de infección para los casos de salmonelosis en el hombre.

De acuerdo a Barrow (1991) y Gast (1994), la infección por *S. Enteritidis* en las aves puede provocar serios problemas tanto en las gallinas ponedoras como en pollos de engorde si la infección ocurre a edad temprana. Según Wray & Wray (2000), esta infección puede asociarse a mortalidad y disminución de la eficiencia productiva aunque destacan de forma particular la capacidad para desarrollar estados de portador asintomático. Estos estados de portador pueden extenderse por un periodo variable de tiempo o durante toda la vida de los animales (Tersolo, 2012). Un aspecto relevante en el desarrollo de estados de portador es la capacidad de las bacterias del género *Salmonella* para permanecer viables dentro de los macrófagos u otras células del sistema retículo-endotelial.

En contraste con el muy limitado impacto clínico, en nuestro estudio se

aislaron salmonelas de una proporción muy importante de los órganos internos evaluados (corazón, hígado, bazo, riñón y contenido intestinal) en los pollitos sacrificados. Estos resultados demuestran la capacidad del aislado y de la dosis empleados para causar una infección sistémica en pollitos de corta edad. En este sentido, podemos señalar que diferentes trabajos han demostrado un resultado microbiológico similar tras el desafío con aislados de *Salmonella* empleando dosis similares a la utilizada en el presente estudio (Desmidt *et al.*, 1997; Sánchez & Cardona, 2003).

En el mismo sentido, las lesiones observadas en los pollitos sacrificados en los días 7, 14 y 21 postinfección demostraron la existencia de una infección sistémica, con lesiones de importancia localizadas en el intestino delgado y grueso así como en otros órganos como el hígado y el pulmón. Estas lesiones alcanzaron un grado más grave en el intestino de varios animales.

Como cabía esperal, de forma general, las lesiones observadas fueron menores a las descritas por otros autores en infecciones por salmonelas adaptadas al hospedador aviar, biovares Pullorum y Gallinarum de *S. Gallinarum*. No se observaron lesiones macroscópicas como las descritas en casos naturales de estas infecciones en hígado, corazón o pulmón. Por el contrario, el tipo y localización de las lesiones microscópicas fue similar a lo descrito en estudios previos relativos a infecciones naturales por *S. Gallinarum* con curso subagudo o crónico (Chacana, 2003; Shivaprasad, 2003; Tersolo, 2003). Otras lesiones asociadas a las infecciones por *S. Gallinarum* incluyen lesiones en el ciego, que puede agrandarse y mostrar un contenido caseoso y sólido (núcleos cecales) (Tersolo, 2008; Sánchez, 2010). Es posible observar nódulos o focos blancos necróticos en el hígado, bazo, pulmones, corazón, páncreas, molleja y, en ocasiones, en el ciego; algunos de estos nódulos pueden asemejarse a tumores. Las articulaciones pueden estar inflamadas y contener un fluido cremoso y viscoso. Además, en la pullorosis se observan congestión hepática y pulmonar, además de áreas necróticas de color blanco grisáceo en los pulmones (Gordon, 1964; Snoeyenbos, 1972). De acuerdo a Sánchez (2010), las lesiones más importantes en infecciones por la biovariedad Pullorum pueden incluir pericarditis, miocarditis, hígado, bazo y

riñones agrandados y congestionados y tarsos inflamados con contenido articular fluído-viscoso y amarillento. En casos hiperagudos se puede observar que las aves mueren súbitamente sin lesiones aparentes (Revolledo, 2012).

En el caso concreto de infecciones por *S. Enteritidis* en pollos y en gallinas se ha descrito la diseminación sistémica a partir de la colonización primaria intestinal tras desafíos experimentales empleando la vía oral, observándose focos necróticos con heterófilos en la mucosa del intestino, en el hígado, bazo y oviducto (Hall, 1964; Hoop & Popischil, 1993; Gast, 2003), lesiones similares a las observadas en el presente estudio. De acuerdo a Ruiz *et al.* (2008), el desafío experimental con una dosis de 1×10^8 y 1×10^9 UFC de *Salmonella* Enteritidis (FT 13a) no se asoció a cambios patológicos aparentes en órganos como el pulmón y el corazón. De forma general, las lesiones asociadas a la infección por *S. Enterica* en el presente estudio fueron algo superiores a las descritas previamente, especialmente en el intestino en el que los pollitos de nuestro estudio llegaron a presentar enteritis difusa y grave en varios casos.

En lo que respecta a los rendimientos productivos, debemos señalar que dependen, en gran medida, de las condiciones ambientales y del manejo así como del aporte de una dieta adecuada y ajustada. Para obtener el máximo potencial de los pollos de engorde resulta muy importante el alcanzar un valor adecuado del peso vivo a los siete días de edad ya que durante estos primeros siete días, el 80 % de la energía disponible es utilizada para el crecimiento y tan sólo el 20 % se emplea en el mantenimiento (Wahlstrom, 2013). Es por ello que se estimó la ganancia de peso e índice de conversión a día 7 de vida.

A pesar de la presencia de diarrea en una proporción moderada de los animales, los pollitos mantuvieron, a lo largo del experimento, una razonable ganancia de peso y consumo de pienso. No se dispuso de un grupo control no desafiado que pudiera servir como referencia para nuestro grupo control y que permitiera estimar el impacto en los parámetros productivos de la infección. El único dato que puede ser empleado con fines de comparación son las referencias definidas como óptimas para esta línea genética de pollos por

Avigen (2012). La desviación del peso de los pollitos respecto a este óptimo fue del 5,7 % al día 1 de vida, del 23,1 % en el día 7, del 28,3 % en el día 14 de vida y del 29 % en el día 21. En este mismo sentido, existen publicaciones que reportan una disminución del peso corporal, entre el 13 y el 19 %, en las aves infectadas por bacterias del género *Salmonella*, aun cuando no exista enfermedad clínica ni mortalidad asociada (Dhillon *et al.*, 1998; Parimal *et al.*, 2001).

Como resumen y de forma general, podemos destacar que el impacto clínico, lesional y productivo de las infecciones por bacterias del género *Salmonella* en aves es muy variable, estando en dependencia de numerosos factores entre los que se encuentran factores del propio aislado como la serovariedad, su virulencia o la dosis, factores del hospedador como la edad, raza, estirpe genética o el estado inmunológico y factores del medio como el manejo, bioseguridad o condiciones climáticas. La virulencia de la cepa tiene una gran importancia y está en función, a su vez, de diferentes factores como las características de la pared celular, de la membrana celular, presencia de enterotoxinas, citotoxinas, flagelos, fimbrias o pilis, entre otros determinantes de virulencia.

A continuación se revisan algunos factores, los más estudiados, que modifican el efecto clínico, lesional o productivo de las infecciones por *Salmonella* en aves.

Serovariedad de la cepa

En el presente estudio se empleó para la infección un aislado del serovar Enteritidis recuperado de explotaciones con problemas asociados a salmonelosis clínica en una explotación aviar de Cuba. Se trata de un serovar no adaptado al hospedador aviar, capaz de infectar a muy diferentes hospedadores. De acuerdo a Tersolo (2012), la receptividad a la infección por *S. Enteritidis* es más elevada en los roedores y en el hombre. Los rumiantes y los équidos tienen una sensibilidad intermedia mientras que las aves, carnívoros y porcinos son menos receptivos. Este hecho da lugar a que estas especies animales, sean, con más frecuencia, identificadas como portadores,

incrementado las opciones de poder ser fuente de infección para el hombre a través del consumo de alimentos de origen animal. En este sentido podemos destacar que este serotipo es el más frecuentemente aislado en el hombre, en alimentos y en el ambiente así como en algunas especies animales como las aves (Snoeyenbos, 1994; Humphrey, 2004; Tersolo, 2012). En Europa, este serotipo es el más frecuentemente implicado en los casos de salmonelosis en el hombre, asociándose generalmente al consumo de huevos o de carne de pollo contaminados (WHO, 2000).

Los serotipos Enteritidis y Typhimurium estaban, originalmente, adaptados de forma específica a los roedores habiendo evolucionado para aumentar su rango de hospedadores (Tersolo, 2012). El estudio comparado del genoma del serovar Enteritidis y del genoma del serovar Gallinarum, específicamente adaptado al hospedador aviar, ha demostrado la existencia de una importante relación (Thomson *et al.*, 2008), Ambas serovariedades comparten genes que sugieren la existencia de un ancestro común. Además, ambas pertenecen al serogrupo D1, lo que indica que tienen una estructura similar del lipopolisacárido de la pared. Son parte de una misma línea clonal, con similares mecanismos de multiplicación intracelular, y poseen la fimbria SEF14, involucrada en la colonización del aparato reproductor, y por tanto de gran importancia en lo que respecta a la capacidad para colonizar los huevos. Así pues, existe una estrecha relación entre ambos serovares y está probado que la serovariedad Enteritidis dispone de algunos de los factores de virulencia característicos de *S. Gallinarum*.

La patogenicidad de aislados de *S. Enteritidis* en pollos broiler ha sido demostrada en numerosos estudios. Sin embargo, cabe destacar que su efecto clínico, lesional o productivo está en dependencia de la cepa empleada (Mellin, 1989; Dhillon *et al.*, 1999; Akhtar *et al.*, 2011). En consonancia con nuestros resultados, por lo general, el cuadro clínico asociado a la infección por este serotipo no es muy relevante, observándose principalmente diarrea a pesar de que la capacidad de invasión es elevada, aislándose salmonelas a partir de muy diferentes órganos y tejidos (Desmidt *et al.*, 1997). La mortalidad se observa, en la mayoría de los casos, cuando se inoculan animales de corta

edad, como es nuestro caso, pero en un bajo porcentaje de animales, entre el 0 y el 10 % (Desmidt *et al.*, 1997; Akhtar *et al.*, 2011), y tan solo durante la primera semana postinfección, aunque en algunos casos se han descrito mortalidades superiores al 70 % tras la infección con este serovar en pollitos libres de patógenos específicos (SPF) de un día de edad (Osman *et al.*, 2010).

En contraposición al serovar Enteritidis, las infecciones causadas por *S. Gallinarum* se asocian a un cuadro clínico severo, con mortalidades superiores al 40 % en pollitos recién nacidos (Flores & Sánchez, 2010). La muerte ocurre habitualmente entre el séptimo y el vigésimo día de vida y se observan inapetencia, debilidad, alas caídas, plumas erizadas y diarreas de color blancuzco.

Dosis infectiva

La dosis constituye, sin duda, un factor que modifica el curso clínico de la infección por *Salmonella*. Sin embargo, la mayoría de los trabajos que incluyen un desafío experimental con bacterias de este género, incluida la presente investigación, emplean dosis similares, entre 10^5 y 10^9 UFC (Humphrey, 2004).

En relación a la dosis, también es relevante la edad de los animales ya que la resistencia de los pollos aumenta rápidamente con la edad, de forma que cuando alcanzan los 7-10 días de vida no suelen mostrar cuadro clínico y lesional o éste es muy leve (Humphrey, 2004). De acuerdo a Porter (1972), en la etapa entre los 4 y los 21 días de edad la protección contra las infecciones bacterianas intestinales es totalmente dependiente del equilibrio de la flora, de ahí la importancia de trabajar para mantener dicho balance.

Podemos destacar que Ruiz *et al.* (2008) describen, al igual que en nuestro estudio, un bajo impacto clínico tras la infección de pollitos en los primeros días de vida con una única dosis de 1×10^8 o 1×10^9 UFC de *S. Enteritidis*, significativamente más elevada que la empleada por nosotros.

Edad

En nuestro trabajo, los pollitos fueron desafiados con *S. Enteritidis* a los 4 días de edad, monitorizándose durante 21 días tras el desafío. Se ha descrito que los pollos de menor edad son más receptivos a la infección y que existe una correlación directa entre la edad de los animales y la dosis a utilizar para lograr la infección (Cooper *et al.*, 1994).

Podemos señalar que se han descrito resultados similares a los nuestros en infecciones llevadas a cabo en el día 1 y 3 de vida de los pollitos (Cooper *et al.*, 1994).

Raza

La raza o estirpe genética es otro factor que puede influir sobre la presentación de cuadros clínicos y lesionales de salmonelosis en aves. Así, por ejemplo, los pollos de la variedad Leghorn blanca son, por lo general, más resistentes que los de razas pesadas. En base a los valores de mortalidad, se ha descrito que los pollitos de las variedades Sussex claro y Leghorn blanca (línea W) son más resistentes a la infección por *S. Typhimuirum* que los de otras variedades (Bumstead & Barrow, 1984; Barrow *et al.*, 1987). En este mismo sentido, Aire (1973) demostró que las gallinas nigerianas son más resistentes a la infección por bacterias del género *Salmonella*, atribuyéndose esta resistencia al rápido desarrollo de la bolsa de Fabricio en estos animales.

Los animales utilizados en nuestro desafío experimental fueron de la línea Ross 308 que se caracteriza por tener una excelente velocidad de crecimiento, una magnífica conversión de peso y una buena resistencia a las enfermedades (Gutiérrez *et al.*, 2007). Fueron empleados por ser una de las líneas más importantes en la producción de pollos broiler a nivel mundial. Además, han sido utilizados en numerosas investigaciones relativas al control de salmonelosis en pollos. Sin embargo, no podemos descartar que el limitado impacto clínico observado tras el desafío en nuestra investigación pudiera estar asociado a la elevada resistencia a las enfermedades de los pollos de esta estirpe.

Dieta

Se ha descrito que la dieta puede modificar el impacto clínico de las infecciones por *Salmonella*, siendo inferior la mortalidad cuando los pollos son mantenidos con dietas de bajo nivel proteico. El contenido en proteína bruta de la dieta empleada en nuestro estudio fue inferior al 20 %, un valor ligeramente menor al habitualmente utilizado en los piensos de iniciación para pollos de carne. Este factor podría explicar, al menos parcialmente, el menor impacto clínico de la infección observado en nuestro estudio.

3.4.3.- Resultados bacteriológicos, cuadro clínico y lesional e índices productivos en el grupo tratado con acetamida furánica monobromada

Un total de 25 pollitos fueron tratados, por vía oral, con una dosis de 25 mg (0,5 mL de una solución de 50 mg/mL) de acetamida monofuránica bromada en los tres días posteriores a su desafío, en el día 4 de vida, con una dosis de 2×10^6 UFC de un aislado de origen cubano de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis. El objetivo fue determinar la posible utilidad de este compuesto en el control de las infecciones por *Salmonella* en pollos para lo cual se compararon los resultados relativos al aislamiento microbiológico, los signos clínicos y lesiones y los parámetros productivos obtenidos por este grupo experimental, grupo 2, y por el grupo control, grupo 1.

Al igual que en el caso del grupo control, para el seguimiento bacteriológico de la infección se sacrificaron 5 animales en los días 7 y 14 postdesafío. En el día 21 postdesafío se sacrificaron 8 pollitos para el estudio microbiológico. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7: Aislamiento bacteriológico de *Salmonella* en diferentes órganos a los 7, 14 y 21 días postinfección tras el desafío en el día 4 de vida con un aislado de *S. Enteritidis* y el tratamiento con acetamida furánica monobromada los días 1, 2 y 3 postinfección.

	Día 7 postinfección		Día 14 postinfección		Día 21 postinfección		TOTAL	
	Número positivos	(%)	Número positivos	(%)	Número positivos	(%)	Número positivos	(%)
Corazón	2	40 %	3	60 %	3	42,8 %	8	44,4 %
Bazo	4	80 %	4	80 %	4	57,1 %	12	66,7 %
Hígado	4	80 %	4	80 %	3	42,8 %	11	61,1 %
Riñón	3	60 %	2	40 %	2	28,6 %	7	38,9 %
Intestino	3	60 %	2	40 %	2	28,6 %	7	38,9 %
TOTAL	16	64 %	14	56 %	14	35 %	44	48,9 %

La comparación de la proporción de aislamientos positivos con respecto a los detectados en el grupo control demostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas. Así, la proporción global de resultados positivos fue del 60 para los controles y del 48,9 % para los animales tratados con acetamida furánica monobromada ($\text{Chi}^2= 11,71$; $p < 0,001$). El riesgo de obtener un resultado positivo, estimado mediante el riesgo relativo, fue 1,52 veces mayor en las muestras procedentes de animales del grupo control en comparación con las de los animales que recibieron la acetamida furánica monobromada (IC 95 %: 1,19-1,94).

El análisis de la proporción de resultados positivos en los diferentes días permitió comprobar que las diferencias en el día 7 postinfección, 84 % de muestras positivas en los controles frente a 64 % en el grupo experimental 1, no alcanzaban la significación estadística, aunque estaban próximas a ésta ($\text{Chi}^2= 2,60$; $p= 0,107$). En el día 14 postinfección, la proporción de muestras con resultado positivo fue del 84 % entre los controles y del 56 % entre los pollitos tratados con acetamida furánica monobromada, alcanzando las

diferencias observadas la significación estadística ($\text{Chi}^2= 4,67$; $p= 0,031$). Igualmente, en el día 21 postinfección, la proporción observada de positivos en el grupo control, 60 %, fue más elevada que en el grupo que recibió la acetamida, 35 % ($\text{Chi}^2= 4,69$; $p= 0,030$). Así, el riesgo de obtener muestras positivas, estimado a través del riesgo relativo, fue más elevado en los animales del grupo control a los días 14 postinfección ($\text{RR}=1,38$; $\text{IC95 \%}: 0,95-2,0$) y a los 21 días postinfección ($\text{RR}=1,71$; $\text{IC95 \%}: 1,04-2,83$).

Igualmente se llevó a cabo un análisis atendiendo a los resultados obtenidos mediante el procesamiento de las muestras procedentes de diferentes órganos. La proporción de aislamientos obtenidos a partir de las muestras de corazón fue similar para ambos grupos, 47 % para el grupo control y 44,4 % para el grupo experimental que recibió acetamida furánica monobromada, sin que existieron diferencias significativas ($\text{Chi}^2= 0,02$; $p= 0,877$). Por el contrario, el aislamiento a partir de muestras de bazo e hígado fue más frecuente en los animales del grupo control (100 % de muestras positivas para ambos órganos) en comparación con el grupo tratado con acetamida furánica monobromada (66,7 % y 61,1 %, respectivamente) ($\text{Chi}^2= 6,84$; $p= 0,009$ y $\text{Chi}^2= 8,26$; $p= 0,004$). Para el riñón y el intestino, la frecuencia del aislamiento fue ligeramente más elevada en el grupo control (58,8 % y 64,7 % respectivamente para cada uno de estos dos órganos) en comparación con los animales del grupo que fue tratado con la acetamida furánica monobromada (38,9 % de resultados positivos para ambos órganos), aunque las diferencias observadas no alcanzaron la significación estadística ($\text{Chi}^2= 1,39$; $p= 0,238$ y $\text{Chi}^2= 2,33$; $p= 0,127$).

Los signos clínicos observados en los animales que recibieron tratamiento con la acetamida furánica monobromada tras el desafío experimental con un aislado de *S. Enteritidis* fueron similares a los del grupo control, con diarrea y empastamiento en la región anal evidentes en, aproximadamente, el 20 % de los animales del lote y a partir del día 7 postinfección. Sin embargo, cabe destacar que este signo clínico comenzó a disminuir a partir del día 14 postinfección. Así, la recuperación de los animales de este grupo fue anterior a la de los controles y la diarrea ya no se observó a

partir del día 15 postinfección. Al igual que ocurrió en el grupo control, no se produjeron bajas asociadas a la infección en el grupo tratado con la acetamida furánica monobromada.

Como ya hemos indicado, a la necropsia no se observaron lesiones macroscópicas. La información semicuantitativa de las lesiones observadas en los animales del grupo tratado con acetamida furánica monobromada se muestra en la Tabla 8. Las lesiones observadas a nivel intestinal en los días 7 y 14 postinfección mostraron variabilidad entre las diferentes secciones estudiadas en todos los animales, oscilando entre + y ++. Además, en este grupo se observó la existencia de una lesión intensa en la bolsa de Fabricio a los 21 días postinfección en dos de los tres animales estudiados (+ en el otro), no habiéndose observado lesiones en este órgano en los días 7 y 14 postinfección. No se han incluido microfotografías correspondientes a este grupo experimental por no encontrarse lesiones destacables.

Tabla 8. Valoración semicuantitativa de las lesiones microscópicas observadas en los diferentes días postinfección y en los diferentes órganos en los pollitos desafiados a los 4 días de edad con un aislado de *S. Enteritidis* y que recibieron acetamida furánica monobromada en los días 1, 2 y 3 postinfección.

Órganos	Días postinfección		
	7	14	21
Intestino	+/(++)	+(++)	++
Hígado	+	+	+
Pulmón	0	0	++
Miocardio	+	0	+
Bazo	+	0	++
Bolsa de Fabricio	0	0	+++
Riñón	0	0	+
Encéfalo	0	+	+

Como puede observarse en la tabla, las lesiones en este grupo fueron más leves que las del grupo control, particularmente en los tres órganos diana principales, intestino, hígado y pulmón.

Con el fin de cuantificar las lesiones y comparar los resultados entre el grupo experimental 2, tratado con acetamida furánica monobromada, y el grupo control se realizaron dos conversiones numéricas. En el primer caso, se le otorgó un valor numérico entre 0 y 3 a cada valoración semicuantitativa según el siguiente criterio: 0= 0, += 1, ++= 2 y +++= 3, considerando para cada órgano la máxima calificación en caso de discrepancia entre animales o secciones (criterio A). La multiplicación entre el número de observaciones calificadas como 0, +, ++ o +++ y la valoración numérica asignada proporcionó un valor numérico global para cada grupo experimental (puntuación total). Los resultados obtenidos empleando este criterio para la cuantificación de las lesiones para el total de los órganos estudiados y para los tres principales órganos afectados, intestino, hígado y pulmón, se muestran en las Tablas 9 y 10.

Una segunda valoración cuantitativa otorgó un valor numérico entre 0 y 5, con el siguiente criterio: 0= 0, += 1, ++= 3 y +++= 5 (criterio B). Igualmente, en caso de discrepancia entre individuos o secciones se tomó la máxima calificación de las lesiones obtenidas. Las Tablas 11 y 12 muestran los resultados obtenidos empleando este criterio para todos los órganos (Tabla 11) y para el intestino, hígado y pulmón (Tabla 12).

Tabla 9: Valoración cuantitativa (criterio A) de las lesiones observadas en todos los órganos estudiados en los animales del grupo control y del grupo experimental 2 (tratados con acetamida furánica monobromada).

Grupo experimental	Nº de observaciones (valoración cuantitativa)				Total de puntos
	0	+	++	+++	
Grupo control	10 (0)	5 (5)	6 (12)	3 (9)	26
Grupo 2	9 (0)	9 (9)	5 (10)	1 (3)	22

Grupo experimental 2: tratado con acetamida furánica monobromada en los días 1, 2 y 3 postinfección.

Tabla 10: Valoración cuantitativa (criterio A) de las lesiones observadas en intestino, hígado y pulmón en los animales del grupo control y del grupo experimental 2 (tratados con acetamida furánica monobromada).

Grupo experimental	Nº de observaciones (valoración cuantitativa)				Total de puntos
	0	+	++	+++	
Grupo control	0 (0)	0 (0)	6 (12)	3 (9)	21
Grupo 2	2 (0)	3 (3)	4 (8)	0 (0)	11

Grupo experimental 2: tratado con acetamida furánica monobromada en los días 1, 2 y 3 postinfección.

Tabla 11: Valoración cuantitativa (criterio B) de las lesiones observadas en todos los órganos estudiados en los animales del grupo control y del grupo experimental 2 (tratados con acetamida furánica monobromada).

Grupo experimental	Nº de observaciones (valoración cuantitativa)				Total de puntos
	0	+	++	+++	
Grupo control	10 (0)	5 (5)	6 (18)	3 (15)	38
Grupo 2	2 (0)	9 (9)	5 (15)	1 (5)	29

Grupo experimental 2: tratado con acetamida furánica monobromada en los días 1, 2 y 3 postinfección.

Tabla 12: Valoración cuantitativa (criterio B) de las lesiones observadas

en intestino, hígado y pulmón en los animales del grupo control y del grupo experimental 2 (tratados con acetamida furánica monobromada).

Grupo experimental	Nº de observaciones (valoración cuantitativa)				Total de puntos
	0	+	++	+++	
Grupo control	0 (0)	0 (0)	6 (18)	3 (15)	33
Grupo 2	2 (0)	3 (3)	4 (12)	0 (0)	29

Grupo experimental 2: tratado con acetamida furánica monobromada en los días 1, 2 y 3 postinfección.

Ambos sistemas de puntuación demostraron que las lesiones eran más intensas en los animales del grupo control que en los animales tratados con acetamida furánica monobromada. Este resultado se mantuvo de forma constante, tanto cuando se consideraron todos los órganos estudiados como si únicamente se cuantificaron las lesiones observadas en intestino, hígado y pulmón.

Finalmente, se evaluaron los parámetros productivos en el grupo experimental 2, que recibió tratamiento con la acetamida furánica monobromada en los días 1, 2 y 3 postinfección (Tabla 13).

Tabla 13: Peso, ganancia de peso, consumo de pienso e índice de conversión estimado a los 7, 14 y 21 días de vida en los pollitos desafiados a los 4 días de edad con un aislado de S. Enteritidis y que recibieron acetamida furánica monobromada en los días 1, 2 y 3 postinfección.

	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21
	Media (DE)			
Promedio peso/pollito (g)	39,18 (0,48)	150,88 (0,38)	358,01 (0,25)	667,72 (0,44)
Ganancia media semanal peso/pollito (g)		111,70 (0,67)	207,15 (0,48)	309,71 (0,58)
Consumo estimado semanal pienso/pollito (g)		136,2	330,0	546,0
Índice de conversión semanal		1,22	1,59	1,76

A pesar de que la asignación de los animales se realizó al azar en los tres grupos experimentales, el análisis estadístico demostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los pesos de los pollitos en el día 0 entre los grupos experimentales 1 y 2 ($F= 7,26$; $p= 0,010$). El peso medio inicial fue algo más elevado en el grupo que recibió tratamiento con acetamida furánica monobromada (39,2 g; DE 0,48) que en los controles (38,8 g; DE 0,56).

El peso a los 7 días fue, como media, de 150,9 g (DE 0,38) en los pollitos del grupo experimental 2. Este valor fue significativamente superior ($H= 36,1$; $p< 0,001$) al alcanzado por los pollitos del grupo control (141,5 g; DE 0,68). Esta tendencia se mantuvo en el día 14 de vida, con un peso medio de 358 g (DE 0,15) en los pollitos tratados con acetamida furánica monobromada en comparación con los controles (338,7 g; DE 0,52) y en el día 21 de vida, peso medio de 667,7 g (DE 0,44) para los pollitos que recibieron el tratamiento frente a 642,9 g (DE 0,41) en los controles. Estas diferencias

alcanzaron la significación estadística para ambos días ($H= 25,6$; $p< 0,001$ y $H= 15,8$; $p< 0,001$, respectivamente para los pesos a los 14 y 21 días de vida).

Teniendo en cuenta la existencia de diferencias significativas en los pesos al día 0 que podrían afectar al resto de los pesos medidos, se compararon las ganancias medias de peso semanal entre los dos grupos experimentales. Entre los días 0 y 7 de vida, la ganancia media de peso de los pollitos fue de 111,7 g (DE 0,67) entre los animales que recibieron la acetamida furánica monobromada y de 102,7 (DE 0,92) entre los animales del grupo control. La comparación mediante ANOVA demostró que las diferencias observadas eran estadísticamente significativas ($F= 1.548,6$; $p< 0,001$). Este mismo resultado se obtuvo cuando se compararon las ganancias medias de peso en la segunda y la tercera semana de vida ($H= 25,5$; $p< 0,001$ y $H= 15,8$; $p< 0,001$), aunque cabe destacar que las diferencias más importantes se observaron en la segunda semana (día 7 a día 14), con 9,68 g más de ganancia por pollito, y en la primera semana (día 0 a día 7), con 9,01 g más de ganancia por pollito, siendo menores en la tercera semana de seguimiento, con una diferencia de ganancia de peso entre los dos grupos experimentales de 5,45 g.

En lo que respecta al consumo de pienso semanal y por pollito a lo largo del periodo de seguimiento, podemos destacar que los valores medidos para el grupo de animales que recibieron el tratamiento con acetamida furánica monobromada fueron muy similares a los consumos medidos en el grupo control. Así, durante la primera semana, las diferencias no alcanzaron 1 g, estando a favor de los animales del grupo tratado. Alcazaron 2,2 g por pollito durante la segunda semana de vida, a favor de los animales tratados, mientras que en la tercera semana de vida, el consumo de pienso medido en los controles fue 1 g más elevado en el grupo control que en los pollitos que recibieron la acetamida furánica monobromada.

Finalmente, se estimó el índice de conversión para cada una de las tres semanas de seguimiento. No se puede llevar a cabo un análisis estadístico de este dato porque solo se dispone de una única observación para cada grupo

pero podemos destacar que los datos medidos en el grupo que recibió acetamida indicaron un mejor aprovechamiento del pienso consumido por estos animales en las tres semanas en comparación con los controles. El índice de conversión en la primera semana fue de 1,22 en los tratados frente a 1,32 en los controles; en la segunda semana, fue 1,59 frente a 1,66 y en la tercera semana, alcanzó 1,76 en el grupo experimental 2 frente a 1,8 en los controles.

De forma general, el análisis de los datos obtenidos en el grupo experimental 2 que recibió tratamiento por vía oral con acetamida furánica monobromada en los tres días inmediatamente posteriores al desafío con un aislado de *S. Enterica* permite concluir la eficacia de este producto. Los pollitos tratados presentaron una menor proporción de aislamientos bacteriológicos positivos durante el seguimiento, acortaron el tiempo de diarrea en casi una semana con respecto a los controles (6 días), presentaron menor intensidad y extensión de las lesiones en los órganos evaluados, tuvieron mayor peso en todos los muestreos, mayor ganancia de peso y mejores parámetros de consumo de pienso e índice de conversión.

La acción bactericida de la acetamida furánica monobromada frente a enterobacterias y otros microorganismos ha sido reportada previamente (Azahares *et al.*, 1992; Almeida, 1994; Gómez, 2002; Estrada *et al.*, 2007). Igualmente, la valoración de la actividad antimicrobiana *in vitro* de esta molécula realizada por nosotros demostró su capacidad para inhibir el crecimiento de diferentes aislados de *Salmonella enterica*, incluyendo aislados del serotipo Enteritidis. Así mismo, Almeida (1994) determinó que la acetamida furánica monobromada es muy poco tóxica, elemento que unido a sus propiedades antimicrobianas constituyen un punto de partida importante para su utilización como fármaco frente a enfermedades de las aves (Gómez, 2002).

Teniendo en cuenta las dificultades asociadas al empleo de antibióticos en el control de las infecciones por *Salmonella* en producción animal, consecuencia del desarrollo de estados de portador así como de resistencias transferibles, los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que la acetamida furánica monobromada podría ser una opción adecuada para el

tratamiento. En lo que respecta al desarrollo de estados de portador, podemos señalar que aunque en nuestro diseño experimental no se incluyeron tiempos de seguimiento prolongados que permitieran su valoración, el hecho de que el tratamiento con acetamida disminuya la proporción de resultados positivos obtenidos en las muestras de bazo e hígado, órganos con relevancia en el mantenimiento de los estados de portador, podría sugerir su capacidad para disminuir la proporción de estos animales portadores. En lo que respecta al desarrollo de resistencias, son necesarios nuevos estudios con el fin de determinar el mecanismo de acción de esta molécula.

Existe un interés creciente en la búsqueda de nuevas moléculas, particularmente moléculas de origen natural derivadas de plantas, que puedan ser de utilidad para el control de las infecciones por salmonela en las aves (Venkitanarayanan *et al.*, 2013). Una de las moléculas que ha sido estudiada con este fin es el ácido caprílico, un ácido graso de cadena media presente en el aceite de coco, en el aceite de palma así como en la leche de rumiantes. Se ha descrito que este ácido es capaz de reducir de forma significativa el recuento de *S. Enteritidis* en el contenido del ciego de las aves sin afectar a la población de bacterias anaerobias en esta localización (Vasudevan *et al.*, 2005; Skrivanová *et al.*, 2009; Venkitanarayanan, 2013). Igualmente, Van Immerseel *et al.* (2004a) demostraron que este ácido reduce la colonización intestinal y de diferentes órganos por *Salmonella* en pollitos. En ensayos experimentales se ha comprobado que la administración de ácido caproico a dosis del 0,7-1 % en el pienso que reciben los pollitos entre el día 1 y el día 18 de vida tras una infección experimental disminuye las poblaciones de *S. Enteritidis* en ciego, cloaca, hígado, bazo, intestino o buche sin modificar la flora endógena del ciego. Además, limita las lesiones en algunos órganos, particularmente en ciego y en hígado, sin modificar el consumo de pienso ni los parámetros productivos (Kollanoor-Johny *et al.*, 2009). El mecanismo de acción propuesto para esta molécula estaría relacionado con la supresión de la expresión de genes implicados en la invasión por parte de bacterias del género *Salmonella* como los genes *hilA*, *hilD* o *fimA* (Van Immerseel *et al.*, 2004a; Boyen *et al.*, 2008; Kollanoor-Johny *et al.*, 2012a).

Otras moléculas evaluadas por su actividad frente a *Salmonella* incluyen los aceites esenciales, empleados de forma tradicional para preservar alimentos y aportar aromas. Entre éstas, destacan el cinamaldehído, componente principal y responsable del sabor y olor de la canela, el eugenol, derivado fenólico constituyente del aceite de clavo, y el timol y el carvacrol, fenoles monoterpénoides presentes en el orégano, tomillo, mejorana y otras plantas. La comparación de la actividad frente a *Salmonella* de estos compuestos empleando un modelo *in vitro* de ciego aviar demostró que todos ellos tenían actividad aunque ésta fue más elevada para el cinamaldehído (Kollanoor-Johny *et al.*, 2010). En experimentos *in vivo* se pudo demostrar, igualmente, que la adición a la dieta de cinamaldehído al 0,5-0,75 % o de eugenol al 0,75-1 % a pollitos entre el día 1 y el día 20 de vida reduce de forma significativa los recuentos de *S. Enteritidis* en el contenido del ciego a los 10 días del desafío experimental, sin modificar el pH del medio ni alterar los recuentos de otros microorganismos en este contenido (Kollanoor-Johny *et al.*, 2012b). Un resultado similar se demostró en pollos broiler de mayor edad (Kollanoor-Johny *et al.*, 2012c). En lo que respecta al mecanismo de acción de estas moléculas se considera que coexisten diferentes mecanismos simultáneamente. Dado que estos extractos de plantas incluyen varias moléculas en su composición, su actividad antimicrobiana es consecuencia de diferentes mecanismos y, consecuentemente, se postula que es muy difícil que las bacterias puedan desarrollar mecanismos de resistencia. Se considera que al menos parte de la actividad antimicrobiana está ligada a la capacidad de estos compuestos para alterar las membranas celulares, haciéndolas más permeables y permitiendo la salida de iones y de componentes celulares (Venkitanarayanan *et al.*, 2013). Además, inhiben la actividad de muy diferentes enzimas bacterianas (Wendakoon & Sakaguchi, 1995; Venkitanarayanan *et al.*, 2013) y en el caso del cinamaldehído, además de este efecto, se ha descrito que su actividad bactericida está ligada a la inhibición de captación y producción de glucosa (Gill & Holley, 2006; Venkitanarayanan *et al.*, 2013).

También se ha descrito la actividad frente a *Salmonella* de una molécula, propiltiosulfonato de propilo (PTSO), derivada del ajo (Peinado *et al.*, 2012). La adición de PTSO a la dieta de pollos broiler a una concentración de 45 y 90 mg por kg de pienso no modificó el consumo de pienso, mejoró las condiciones del tracto digestivo (longitud de las vellosidades y grosor de la mucosa) y los parámetros productivos como el índice de conversión al tiempo que redujo los recuentos de *Salmonella* y de otras enterobacterias como *E. coli* en el contenido del colon.

Aunque son necesarios más estudios para conocer su mecanismo de acción y estudiar su farmacocinética y farmacodinámica, los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren la utilidad de la acetamida furánica monobromada para el control de las infecciones por bacterias del género *Salmonella* en aves.

3.4.4. Resultados bacteriológicos, cuadro clínico y lesional e índices productivos en el grupo tratado con una mezcla probiótica de origen aviar

El tercer grupo experimental estuvo constituido, al igual que los dos anteriores, por 25 pollitos que fueron monitorizados entre el día 0 y el día 25 de vida. Estos animales recibieron, en los días 1, 2 y 3 de vida, por vía oral, una mezcla probiótica con 5×10^8 UFC de tres especies de *Lactobacillus*, *L. reuteri*, *L. mucosae* y *L. salivarius*. Estos tres aislados eran de origen aviar y habían sido seleccionados previamente en función de sus potenciales propiedades probióticas, incluyendo entre éstas la actividad antimicrobiana frente a aislados de *Salmonella enterica*. Además, los animales de este grupo experimental fueron desafiados, al igual que los de los otros dos grupos, en el día 4 de vida mediante la administración, por vía oral, de una dosis de 0,5 mL por pollito de un cultivo conteniendo 1×10^6 UFC/mL de *S. Enteritidis*.

Los resultados obtenidos tras el procesado por técnicas de microbiología de los órganos recuperados tras el sacrificio de 5 animales en los días 7 y 14 postinfección así como de 8 animales en el día 21 postinfección se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14: Aislamiento bacteriológico de *Salmonella* en diferentes órganos a los 7, 14 y 21 días postinfección tras el desafío en el día 4 de vida con un aislado de *S. Enteritidis* y el tratamiento con una mezcla probiótica por vía oral en los días 1, 2 y 3 de vida.

	Día 7 postinfección		Día 14 postinfección		Día 21 postinfección		TOTAL	
	Número positivos	(%)	Número positivos	(%)	Número positivos	(%)	Número positivos	(%)
Corazón	3	60 %	3	60 %	2	28,6 %	8	44,4 %
Bazo	5	100 %	5	100 %	4	57,1 %	14	77,8 %
Hígado	5	100 %	5	100 %	5	71,4 %	15	83,3 %
Riñón	3	60 %	3	60 %	2	28,6 %	8	44,4 %
Intestino	4	80 %	4	80 %	3	42,8 %	11	61,1 %
TOTAL	20	80 %	20	80 %	16	40 %	56	62,2 %

La proporción de muestras positivas global obtenida en los pollitos del grupo experimental 3 fue del 62,2 %. Este valor fue superior al determinado en los animales que recibieron el tratamiento con la acetamida furánica monobromada, 48,5 %, pero inferior al medido en los animales del grupo control 74,1 %. Las diferencias observadas no alcanzaron la significación estadística, aunque estuvieron próximas a ésta. Así, cuando se comparó el resultado obtenido en los animales que recibieron la mezcla probiótica con el de los controles se obtuvo un valor para el estadístico χ^2 de 2,84 ($p= 0,092$) mientras que la comparación con los resultados del grupo que recibió acetamida furánica monobromada proporcionó un valor de $\chi^2= 3,24$ ($p= 0,072$).

Cuando se comparó la proporción de muestras positivas obtenidas en los diferentes días de muestreo entre el grupo control y el grupo tratado con probiótico se pudo comprobar que los resultados eran similares en el día 7 postinfección, con un 84 % de resultados positivos en los pollitos del grupo control frente al 80 % en los tratados con la mezcla probiótica ($\text{Chi}^2= 0,13$; $p= 0,713$). Estas proporciones se mantuvieron exactamente iguales en el día 14 postinfección, sin que de nuevo se pudieran demostrar diferencias significativas entre ambos grupos. En el día 21 postinfección, el 60 % de las muestras recogidas en los pollitos control fueron positivas frente al 40 % en los pollitos tratados con probiótico. El análisis estadístico indicó que estas diferencias estaban próximas a la significación estadística ($\text{Chi}^2= 2,99$; $p= 0,084$).

Este mismo análisis se realizó para comparar los resultados bacteriológicos a los diferentes tiempos entre el grupo tratado con acetamida furánica monobromada y el grupo tratado con probiótico. La proporción de muestras positivas en el día 7 postinfección fue del 64 % en los pollitos tratados con acetamida frente al 80 % observado tras el tratamiento con la mezcla probiótica. Estas diferencias no alcanzaron la significación estadística ($\text{Chi}^2= 1,59$; $p= 0,208$). Las diferencias observadas fueron más importantes en el día 14 postinfección, con un 56 % y 80 % de muestras positivas para los grupos de acetamida y probiótico, respectivamente. Las diferencias, en este día 14, estuvieron muy próximas a la significación estadística ($\text{Chi}^2= 3,31$; $p= 0,069$). Finalmente, en el día 21, los resultados de ambos grupos fueron similares, con un 35 % y 40 % de muestras positivas, respectivamente, para el grupo tratado con acetamida y el grupo tratado con probiótico ($\text{Chi}^2= 2,33$; $p=0,629$).

Atendiendo a los diferentes órganos valorados, las proporciones de resultados positivos obtenidas en los controles y en los pollitos tratados con la mezcla probiótica fueron similares en corazón (47 % y 44,4 %, respectivamente), riñón (58,8 % y 44,4 %, respectivamente) e intestino (64,7 % y 61,1 %, respectivamente), sin que existieran diferencias estadísticamente significativas.

Por el contrario, la proporción de aislamientos a partir de muestras de bazo fue significativamente superior en los controles en comparación con los tratados con probiótico (100 % frente a 66,7 %) ($\text{Chi}^2= 4,27$; $p= 0,039$). En este mismo sentido, el aislamiento a partir de hígado fue posible en el 100 % de las muestras de los controles y en el 83,3 % de las de los pollitos tratados con probiótico. Estas diferencias estuvieron próximas a la significación estadística ($\text{Chi}^2= 3,09$; $p= 0,078$).

No existieron diferencias estadísticamente significativas en la proporción de resultados positivos obtenidos a partir de los diferentes órganos en los pollitos tratados con la mezcla probiótica y los pollitos que recibieron tratamiento con acetamida furánica monobromada.

De forma similar a lo ocurrido en los otros dos grupos experimentales, no existieron bajas asociadas a la infección en el grupo tratado con la acetamida furánica monobromada. Los signos clínicos observados en los pollitos que recibieron la mezcla probiótica en los tres días anteriores al desafío experimental con un aislado de *S. Enteritidis* fueron similares a los observados en los otros dos grupos, control y tratado con acetamida furánica monobromada. Una proporción aproximada del 20 % de los animales de este grupo mostraron diarrea y empastamiento de la región anal a partir del día 7 postinfección. Estos signos clínicos se mantuvieron de forma constante hasta el día 18 postinfección. En consecuencia, el cuadro clínico en los animales de este grupo experimental estuvo presente durante 11 días frente a 14 días en el grupo control y 8 días en el grupo tratado con acetamida.

Tampoco existieron lesiones macroscópicas en los animales que recibieron la mezcla probiótica en los tres días siguientes al desafío con *S. Enteritidis*. Microscópicamente, se observaron lesiones tal y como se muestra en la Tabla 15. Las lesiones observadas en el intestino a los 7 días postinfección en este grupo variaron entre las diferentes secciones estudiadas en todos los animales, oscilando entre ++ y +++, aunque predominaron las calificadas como +++. Además, cabe destacar la intensidad de la lesión a nivel renal en todos los animales evaluados en el día 21 postinfección (Tabla 15).

Tabla 15. Valoración semicuantitativa de las lesiones microscópicas observadas en los diferentes días postinfección y en los diferentes órganos en los pollitos que recibieron una mezcla probiótica en los días 1, 2 y 3 de vida y fueron desafiados en el día 4 con un aislado de *S. Enteritidis*.

Órganos	Días postinfección		
	7	14	21
Intestino	+++	++	+++
Hígado	+++	++	++
Pulmón	+	++	+
Miocardio	++	+	+
Bazo	0	++	+
Bolsa de Fabricio	0	0	+
Riñón	0	++	+++
Encéfalo	++	+	+

A los 7 días postinfección se pudo constatar la presencia de degeneración y necrosis (picnosis nuclear, cariorexis y lisis) de células epiteliales de las vellosidades intestinales, siendo más intensa y afectando a un número mayor de células en las criptas. Estas últimas, en algunos animales, desaparecieron a consecuencia de una necrosis completa (Figura 8). Asociados a estas lesiones se observaron bacilos Gram-, compatibles con *Salmonella* spp. En las muestras de íleon y de tonsila cecal con tejido linfoide local, las lesiones siempre fueron más intensas en la mucosa asociada o adyacente al tejido linfoide que en las zonas sin tejido linfoide de la misma sección. En el duodeno solo se apreciaron lesiones de forma esporádica y en pocos animales consistentes, exclusivamente, en necrosis de células epiteliales de las criptas.

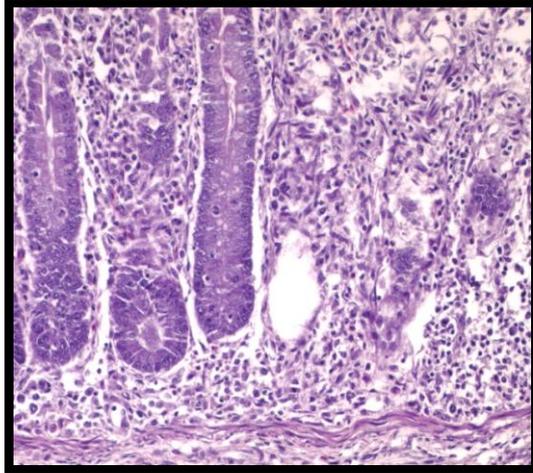


Figura 8. Enteritis proliferativa y necrosis con desaparición de las criptas (HE 200X).

Por otra parte también se observó, a los 7 días postinfección, la presencia de miocarditis focal purulenta, con pequeños focos de infiltrados intersticiales (miliares y submiliares) de células, con predominio de macrófagos y con presencia de algún heterófilo, linfocito y células plasmáticas, sin llegar a alterar las fibras musculares (Figura 9). No se observaron mayor número de los mismos en ninguno de los animales estudiados.

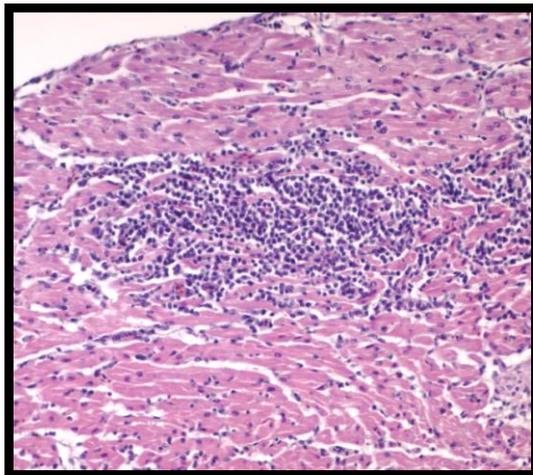


Figura 9. Miocarditis focal en ventrículo izquierdo con presencia de células inflamatorias y alteraciones de las fibras del miocardio.

En el hígado se observó, a los 14 días postinfección, la presencia de hepatitis multifocal purulenta, caracterizada por la presencia de pequeños focos en el parénquima hepático, miliares a submiliares, formados principalmente por heterófilos acompañados, en menor cantidad, por macrófagos y linfocitos, en número de 10 a 100 células, y con presencia de degeneración, cariorexis y lisis de hepatocitos de la periferia de alguno de estos focos (Figura 10). En algunos casos también se observó necrosis central y, mediante la técnica de Gram, se demostró la presencia de pequeños bacilos Gram-, compatibles con *Salmonella* spp., en el seno de la necrosis. El número de focos osciló entre 1 y 20 en las dos secciones estudiadas. Además, en algunos animales se observaron, en los espacios porta, células inflamatorias localizadas subendotelialmente en vena porta, alterando su pared y con presencia en la luz de abundantes leucocitos y coagulación intravascular (inicio de trombosis) así como pequeños agregados periportales de las mismas células presentes en los focos del parénquima (Figura 11).

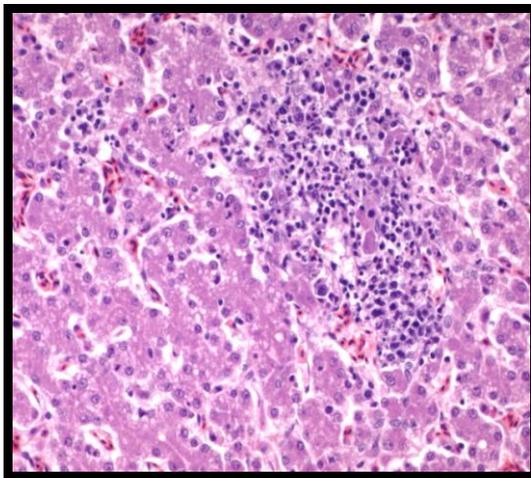


Figura 10

Figura 10. Foco de células inflamatorias en el seno del parénquima hepático con focos de necrosis (HE 200X).

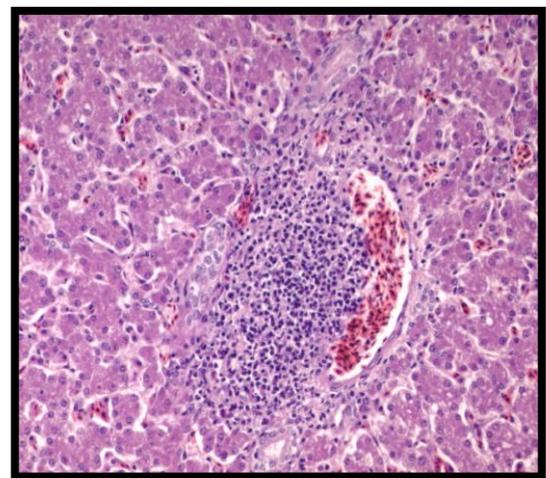


Figura 11

Figura 11. Hígado con foco de células inflamatorias en espacio porta provocando destrucción de la pared de la vena y presencia de células inflamatorias en la luz, cariorexis en el seno del foco (HE 200X).

Tanto en el bazo como en la bolsa de Fabricio se observó la presencia de depleción linfoide en zona centrofolicular, de leve a moderada, con o sin presencia de cariorexis y lisis (necrosis) de dichas células. Las alteraciones de estos órganos se observaron principalmente en los pollitos sacrificados en el día 21 postinfección.

En el riñón se observó tubulonefrosis multifocal de túbulos contorneados proximales, con picnosis y cariorexis de células epiteliales, observándose en los más afectados una nefritis intersticial focal constituida, principalmente, por macrófagos y heterófilos.

También se pudo demostrar la presencia de encefalitis purulenta focal y leve. Se observó degeneración de neuronas, principalmente en cortical, y de células de Purkinje en cerebelo, caracterizada por picnosis y retracción de núcleos y citoplasma, así como la presencia de pequeños manguitos perivasculares formados por linfocitos, macrófagos y heterófilos. La lesión encefálica se observó solo en algunos animales siendo siempre leve y focal.

De forma general, se observó una mayor gravedad de las lesiones y la afectación de un mayor número de localizaciones entre los animales del grupo experimental 3. Al igual que para el grupo experimental tratado con acetamida furánica monobromada, se llevó a cabo una cuantificación de estas lesiones empleando dos conversiones numéricas, con una valoración entre 0 y 3 (criterio A) y con una valoración entre 0 y 5 (criterio B). Los resultados obtenidos con esta valoración para el total de los órganos estudiados y para los tres principales órganos afectados se muestran en las Tablas 16 a 19. Con el fin de facilitar la comparación entre los diferentes grupos experimentales, se incluyen en las tablas los resultados de los tres grupos, control, grupo experimental 1 que recibió tratamiento con acetamida furánica monobromada y grupo experimental 2 que recibió la mezcla probiótica por vía oral.

Tabla 16: Valoración cuantitativa (criterio A) de las lesiones observadas en todos los órganos estudiados en los tres grupos experimentales.

Grupo experimental	Nº de observaciones (valoración cuantitativa)				Total de puntos
	0	+	++	+++	
Grupo control	10 (0)	5 (5)	6 (12)	3 (9)	26
Grupo 2	9 (0)	9 (9)	5 (10)	1 (3)	22
Grupo 3	4 (0)	8 (8)	8 (16)	4 (12)	36

Grupo experimental 2: tratado con acetamida furánica monobromada en los días 1, 2 y 3 postinfección. Grupo experimental 3: tratado con la mezcla probiótica en los días 1, 2 y 3 de vida.

Tabla 17: Valoración cuantitativa (criterio A) de las lesiones observadas en intestino, hígado y pulmón en los tres grupos experimentales.

Grupo experimental	Nº de observaciones (valoración cuantitativa)				Total de puntos
	0	+	++	+++	
Grupo control	0 (0)	0 (0)	6 (12)	3 (9)	21
Grupo 2	2 (0)	3 (3)	4 (8)	0 (0)	11
Grupo 3	0 (0)	2 (2)	4 (8)	3 (9)	19

Grupo experimental 2: tratado con acetamida furánica monobromada en los días 1, 2 y 3 postinfección. Grupo experimental 3: tratado con la mezcla probiótica en los días 1, 2 y 3 de vida.

Tabla 18: Valoración cuantitativa (criterio B) de las lesiones observadas en todos los órganos estudiados en los tres grupos experimentales.

Grupo experimental	Nº de observaciones (valoración cuantitativa)				Total de puntos
	0	+	++	+++	
Grupo control	10 (0)	5 (5)	6 (18)	3 (15)	38
Grupo 2	2 (0)	9 (9)	5 (15)	1 (5)	29
Grupo 3	4 (0)	8 (8)	8 (248)	4 (20)	52

Grupo experimental 2: tratado con acetamida furánica monobromada en los días 1, 2 y 3 postinfección. Grupo experimental 3: tratado con la mezcla probiótica en los días 1, 2 y 3 de vida.

Tabla 19: Valoración cuantitativa (criterio B) de las lesiones observadas en intestino, hígado y pulmón en los tres grupos experimentales.

Grupo experimental	Nº de observaciones (valoración cuantitativa)				Total de puntos
	0	+	++	+++	
Grupo control	0 (0)	0 (0)	6 (18)	3 (15)	33
Grupo 2	2 (0)	3 (3)	4 (12)	0 (0)	29
Grupo 3	0 (0)	2 (2)	4 (12)	3 (15)	29

Grupo experimental 2: tratado con acetamida furánica monobromada en los días 1, 2 y 3 postinfección. Grupo experimental 3: tratado con la mezcla probiótica en los días 1, 2 y 3 de vida.

Como puede observarse, con independencia del criterio de conversión numérica empleado, cuando se incluyeron en la valoración cuantitativa las lesiones detectadas en todos los órganos y tejidos estudiados, el grupo experimental 3 tratado con la mezcla probiótica antes del desafío con *S. Enteritidis* presentó los peores resultados. Por el contrario, cuando se analizaron las lesiones localizadas en los tres principales órganos diana, intestino, hígado y pulmón, este grupo experimental mejoró su situación con respecto al control. De forma global, la menor puntuación y, por lo tanto, la menor severidad/extensión de las lesiones se observó en el grupo tratado con

acetamida furámica monobromada.

Los parámetros productivos obtenidos en el grupo experimental 3 que recibió tratamiento con prebióticos en los días inmediatamente anteriores al desafío se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20: Peso, ganancia de peso, consumo de pienso e índice de conversión estimado a los 7, 14 y 21 días de vida en los pollitos tratados con una mezcla probiótica en los días 1, 2 y 3 de vida y desafiados en el día 4 con un aislado de *S. Enteritidis*.

	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21
	Media (DE)			
Promedio peso/pollito (g)	37,92 (0,49)	140,87 (0,51)	345,93 (0,37)	658,95 (0,41)
Ganancia media semanal peso/pollito (g)		102,95 (0,77)	205,02 (0,56)	312,93 (0,38)
Consumo estimado semanal pienso/pollito (g)		136,0	342,0	546,2
Índice de conversión semanal		1,32	1,67	1,74

El peso medio de los pollitos a día 0 fue de 37,8 g en el grupo experimental que recibió probióticos. El análisis estadístico permitió demostrar que el peso medio de los pollitos de este grupo era significativamente inferior al de los pollitos del grupo control (38,8 g) ($F= 33,72$; $p < 0,001$) y al de los pollitos del grupo tratado con acetamida furánica monobromada (39,2 g) ($F= 84,56$; $p < 0,001$).

El peso a los 7 días fue, como media, de 140,9 g (DE 0,51) en los pollitos tratados con probiótico. Este valor fue significativamente menor ($F= 6255,62$; $p < 0,001$) al alcanzado por los pollitos del grupo tratado con acetamida furánica monobromada (150,9 g; DE 0,38). Igualmente, el peso a los 7 días fue inferior en los pollitos tratados con probiótico en comparación con los controles (141,5 g; DE 0,68) ($F= 13,31$; $p < 0,001$) aunque se puede destacar que las diferencias en este caso fueron inferiores a las observadas al día 0 de vida.

A los 14 días de vida, el peso medio de los pollitos del grupo experimental 3 fue de 345,9 g (DE 0,37). Este peso fue significativamente superior al medido en los animales del grupo control (338,7 g), invirtiéndose la situación con respecto a lo que ocurría en los días 0 y 7 de vida ($F= 2.261,75$; $p < 0,001$). La comparación de pesos a los 14 días entre los dos grupos con tratamiento reveló que estos pesos continuaban siendo más elevados para los animales tratados con acetamida furánica monobromada (358 g; DE 0,25) en comparación con los de los animales tratados con probiótico ($F= 12.841,81$; $p < 0,001$).

Finalmente, los resultados de peso obtenidos en el día 21 de vida confirmaron lo observado al día 14. El peso medio de los pollitos tratados con probiótico fue de 658,9 g (DE 0,41), un valor significativamente superior a los 642 g (DE 0,41) obtenidos, como promedio, en el grupo control ($H= 15,88$; $p < 0,001$). Por el contrario, el peso medio de los pollitos tratados con acetamida (667,7 g; DE 0,44) fue significativamente superior al de los pollitos que recibieron la mezcla probiótica ($F= 2.375, 57$; $p < 0,001$).

La comparación de la ganancia media semanal de peso por pollito entre los grupos control y tratado con probiótico reveló que no existían diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en la primera semana de vida ($F= 1,15$; $p= 0,406$). Sin embargo, esta ganancia media semanal de peso fue significativamente superior para los pollitos del grupo probiótico (205,0 g; DE 0,56) en comparación con los controles (175,5 g; DE 0,82) durante la segunda semana de vida ($F= 1.031,74$; $p < 0,001$). Este mismo resultado se

observó en la tercera semana de vida ($F= 1.910,40$; $p< 0,001$), siendo superior la ganancia media de peso en los tratados con probiótico (312,94 g; DE 0,38) que en los controles (304,26 g; DE 0,53).

De forma similar se compararon los valores de ganancia de peso entre el grupo tratado con probiótico y el grupo que recibió el tratamiento con acetamida furánica monobromada. Este valor fue más elevado en el grupo tratado con acetamida en comparación con el grupo tratado con probióticos en la primera semana (111,7 g frente a 102,9 g, respectivamente) y en la segunda semana de seguimiento (207,1 g frente a 205,0 g, respectivamente), alcanzando las diferencias observadas la significación estadística para ambos periodos ($F= 1.833,67$; $p< 0,001$ y $F= 142,78$; $p< 0,001$, respectivamente). Por el contrario, en la tercera semana de seguimiento, la ganancia media de peso por pollito fue significativamente mayor en los tratados con probiótico (312,9 g; DE 0,38) que en los tratados con acetamida furánica monobromada (309,7 g; DE 0,59) ($F= 234,07$; $p< 0,001$).

El consumo de pienso semanal por pollito durante la primera semana de seguimiento fue similar en los tres grupos experimentales, con menos de 1 g de diferencia. Sin embargo, durante la segunda semana de vida, los pollitos tratados con probiótico fueron los que más pienso consumieron, 12 g más por pollito y semana en comparación con los tratados con acetamida y 14,2 g más que los controles. De nuevo, en la tercera semana de vida los valores de consumo de pienso fueron muy similares entre los tres grupos experimentales.

El índice de conversión durante la primera semana de vida fue de 1,32 en el grupo que recibió tratamiento con la mezcla probiótica, idéntico valor al estimado en el grupo control. En la segunda semana de vida, este índice de conversión fue de 1,67 frente a 1,66 determinado en los controles y 1,59 en el grupo que recibió la acetamida. Finalmente, en la tercera semana de seguimiento, el grupo que recibió el probiótico proporcionó el mejor valor del índice de conversión, 1,74, ligeramente superior al determinado en los animales tratados con acetamida, 1,76, o en los controles, 1,80.

De forma general, los resultados obtenidos tras el tratamiento con la mezcla probiótica demostraron una cierta actividad, con disminución de la proporción de órganos positivos a los 21 días, acortamiento del periodo de afectación clínica de los animales en 3 días y mejora de los parámetros productivos, particularmente entre la segunda y tercera semana de seguimiento, con respecto a los valores observados en los controles aunque cabe destacar que, para todos los parámetros evaluados, el tratamiento con la mezcla probiótica resultó inferior al tratamiento con acetamida furánica monobromada. Además, podemos destacar que la mejora con respecto a los controles fue más evidente en los últimos muestreos, a los 14 y, particularmente, a los 21 días, a pesar de que el tratamiento con la mezcla probiótica se llevó a cabo en los tres primeros días de vida, antes del desafío experimental con *Salmonella*.

En la actualidad, existen diversos productos probióticos o de exclusión competitiva comerciales que han sido diseñados para su empleo en la producción avícola, Avifree[®], Broilact[®], Aviguard[®], Primalact[®], Gallipro[®], Preempt[®] o FM[®], entre otros. Además, existe un número muy significativo de publicaciones que evalúan el efecto de cepas aisladas o de mezclas probióticas de forma experimental. La gran mayoría de los estudios realizados coinciden en demostrar la capacidad de estos productos, tanto los productos comerciales como los experimentales, para reducir patógenos intestinales y muy particularmente para limitar la multiplicación y colonización por *Salmonella* (Rondón & Laurencio, 2008). Un meta-análisis llevado a cabo por Kerr *et al.* (2013) en el que se evaluaron 14 productos probióticos diferentes, incluyendo mezclas de EC comerciales, demostró que, de forma general, estos productos son capaces de disminuir el riesgo de colonización por *Salmonella* en pollos broiler. La comparación entre los diferentes productos indicó que los mejores resultados son proporcionados por las mezclas no definidas con respecto a los productos constituidos por uno o unos pocos aislados bien identificados. Entre los factores que podrían explicar este hecho se proponen las dificultades para mantener un cultivo estable en el caso de las mezclas definidas o la falta de algunos componentes esenciales, incluidos algunos microorganismos en los

productos más definidos. En este sentido, se ha propuesto que las técnicas empleadas para el aislamiento y cultivo de los microorganismos afectan en gran medida a su posterior eficiencia como probióticos (Jeffrey 1999; Nisbet 2002). Si estas técnicas de cultivo limitan el número de cepas bacterianas que pueden mantenerse y multiplicarse, probablemente, la eficiencia del producto probiótico o mezcla de EC será menor. Con el fin de minimizar este efecto, algunos investigadores proponen el empleo de técnicas de cultivo continuo para la producción de estas mezclas de EC (Nisbet *et al.*, 1998).

Existen numerosos ejemplos en la bibliografía relativos al empleo de probióticos en pollos broiler y su efecto sobre diferentes parámetros productivos. Capcarova *et al.* (2011) emplearon una mezcla de seis aislados de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus* y *Enterococcus faecium* en pollos de engorde y demostraron mejoras en la absorción de calcio y potasio, además de un aumento del peso. Anteriormente, Han *et al.* (1984) y Guillot *et al.* (1990) demostraron mejoras en la ganancia de peso y el índice de conversión en pollos broiler tras las inclusión de diferentes probióticos en la dieta (*Bacteroides bifidum*, *L. acidophilus*, *Pediococcus acidilactici* y *Enterobacterium faecium*). Igualmente se ha demostrado que el empleo de esporas de *Bacillus subtilis* o de *Clostridium butyricum* se asocia a una mejoría en la ganancia de peso. Gunther (1995) empleó un producto probiótico en pollitos en crecimiento y pudo demostrar un incremento en la ganancia de peso corporal y una mejora en el índice de conversión alimenticia con respecto al grupo control. De igual manera, Sheng *et al.* (2013) reportaron que las dietas suplementadas con *Bacillus subtilis* variedad Natto al 0,4 % mejoran el desempeño del crecimiento en patos, aumentando la absorción de proteínas, suprimiendo microflora nociva y mejorando de la estructura del duodeno y las funciones inmunitarias. Onifade (1997) estudió el efecto de una dieta complementada con una cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en broilers. Los grupos tratados mostraron mejor ganancia de peso vivo, mejor índice de conversión y mayor rendimiento de canal. Otros trabajos (Nakano *et al.*, 1999; Alarcón, 2001) han demostrado que la administración de una mezcla

probiótica (*Lactobacillus*, *Bacillus*, *Streptococcus* y *Saccharomyces*) reduce el nivel de colesterol sérico y hepático en pollos alimentados con dietas enriquecidas con colesterol. Aguavil (2012) administró *L. acidophilus* a pollos Ross 308 y observó mejoras en la ganancia de peso. En el mismo sentido, Cortes & Ávila (2000) y Araujo (2005) demostraron diferencias significativas en el rendimiento productivo de pollos tratados con probióticos en relación con los controles. Awad *et al.* (2009) comprobaron que la administración de un probiótico constituido por especies de *Lactobacillus*, tanto homofermentativos como heterofermentativos, en el pienso mejoraba la ganancia de peso diaria, el índice de conversión, el peso de los órganos y la morfología del epitelio intestinal en pollos de entre 1 y 35 días de edad. Kim *et al.* (2012) han descrito que la inclusión en la dieta de un probiótico multi-especie aumentaba el rendimiento productivo de las aves al tiempo que disminuía la concentración de coliformes y de clostridios en el ciego, modificaba la morfología del intestino delgado e incrementaba la digestibilidad de los nutrientes. Alkhalif *et al.* (2010) comprobaron que la inclusión de un probiótico comercial, Bactocell[®], compuesto por *Pediococcus acidilactici*, en la dieta mejora la ganancia de peso diaria y la conversión alimentaria en pollos entre las 3 y las 6 semanas de vida.

Otro importante número de estudios ha valorado el efecto sobre parámetros productivos de diferentes combinaciones de aditivos alimentarios que incluyen probióticos junto con otros productos. Bozkurt *et al.* (2009) evaluaron la combinación de ácidos orgánicos, prebióticos y probióticos en pollos de engorde, demostrando la existencia de efectos sinérgicos. Colin *et al.* (1994) estudiaron la influencia de dos probióticos (esporas de *Bacillus* spp. y de una mezcla de bacterias del ácido láctico, levaduras y enzimas digestivas) en el rendimiento productivo de pollos de engorde demostrando mejoras en la ganancia de peso. Midilli *et al.* (2008) evaluaron el comportamiento productivo y los niveles de inmunoglobulina G en sangre asociados a la utilización de una combinación de un probiótico y un prebiótico (MOS) o a su empleo por separado. Aunque los parámetros productivos como la ganancia de peso, el consumo de pienso o el rendimiento de la canal fueron similares, la

combinación de probiótico y prebiótico se asoció a un mejor valor del índice de conversión.

Algunos estudios han comparado también combinaciones de tratamientos con antibióticos (flavomicina), probióticos (Primalac[®]) y prebióticos (Biolex-MB), demostrando mejoras en la ganancia de peso y el índice de conversión al emplear una combinación de probiótico y prebiótico y sugiriendo que esta mezcla u otras similares pueden sustituir a los antibióticos empleados como promotores de crecimiento (Ashayerizadeh *et al.*, 2009). En este mismo sentido, Bozkurt *et al.* (2009) compararon el efecto de un prebiótico (MOS), de un ácido orgánico (ácido fórmico), de un probiótico y de la combinación de éstos. Los mejores datos productivos fueron proporcionados por la combinación de probiótico y prebiótico.

Un número más limitado de estudios *in vivo* ha podido demostrar el efecto protector de algunos probióticos o mezclas de EC, incluyendo productos comerciales, sobre la colonización de las aves por bacterias del género *Salmonella*. Así, Corrier *et al.* (1998) demostraron que Preempt[®], una mezcla con 29 cepas de bacterias del ácido láctico producida en EE.UU. es capaz de reducir los niveles de contaminación por *Salmonella* en aves. Estrada *et al.* (2010) demostraron la capacidad de un probiótico de composición definida para disminuir la colonización del bazo y el hígado por *S. Enteritidis* y reducir su transmisión horizontal en aves. Revollo *et al.* (2009) comprobaron, asimismo, que el probiótico comercial Aviguard[®] es capaz de reducir la invasión por *S. Typhimurium* mientras que Nuotio *et al.* (1992) reportaron este mismo efecto para el probiótico comercial Broilac[®] en pollos infectados con *S. Enteritidis*. Koščová *et al.* (2006) demostraron que la administración combinada de un aislado de *Lactobacillus fermentum* con aceites esenciales de orégano y tomillo a un grupo experimental de pollos reducía la colonización por *Salmonella* en el intestino en comparación con los controles sin tratamiento.

En nuestro trabajo, hemos valorado el efecto sobre la colonización por *Salmonella* y la salmonelosis (valoración clínica y lesional) así como sobre los

parámetros productivos de un probiótico constituido por la mezcla de bacterias del género *Lactobacillus* seleccionados previamente en base a la ausencia de resistencia antimicrobiana y a los resultados de caracterización *in vitro* de diferentes propiedades probióticas tales como la actividad antimicrobiana, la capacidad para disminuir el pH del medio o la resistencia a pH ácido y sales biliares. Los tres aislados fueron recuperados de gallináceas adultas ya que, de acuerdo a estudios previos, la microbiota de animales adultos es superior en eficacia a la procedente de animales más jóvenes o de animales libres de patógenos específicos (Jeffrey, 1999). No se incluyó en esta mezcla ningún otro componente, por lo cual el efecto observado solo puede ser atribuido al probiótico.

La eficacia de los probióticos o de las mezclas de exclusión competitiva está en dependencia de numerosos factores incluyéndose entre éstos las cepas incluidas (Mulder, 1996; Espinoza, 1997; Naheeda, 1997; Vázquez, 1997; Jeffrey, 1999; Nisbet, 2002), el momento en que se administran (Vázquez, 1997), la dosis empleada (Teo & Tan, 2007) o la vía de administración (Cox *et al.*, 1990, 1991, 1993; Meijerhof & Hulet, 1997; Wierup *et al.*, 1988, 1992; Pivnick & Nurmi, 1982; Goren 1984, 1988; Schneitz, 1990, 1992, 2005; Blankenship, 1993; Corrier *et al.*, 1995; Chen, 1998; Higgins *et al.*, 2008; Mountzouris *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012), entre otros. A continuación, vamos a revisar los principales aspectos recogidos en investigaciones previas con respecto a estos factores.

Efecto de la composición del producto probiótico

Como ya hemos indicado, algunos de los productos probióticos comerciales para aves más populares como Avifree[®], Aviguard[®], Broilact[®], MSC[®], Preempt[®] o CF-3[®] son cultivos mixtos obtenidos a partir del contenido intestinal, generalmente contenido cecal, de aves domésticas sanas (Schneitz, 2005) y presentan una composición de especies desconocida. Todos ellos tienen un largo historial de uso y predominan en el mercado no europeo (Applegate *et al.*, 2010). Además, se ha comprobado que, por lo general, estos cultivos mixtos y no definidos se asocian a una mayor eficacia frente a

Salmonella en los ensayos experimentales (Mulder, 1996; Espinoza, 1997; Naheeda, 1997; Kerr *et al.*, 2013).

Sin embargo, el uso de cultivos no definidos está restringido legalmente en algunos países, como por ejemplo en la Unión Europea (EFSA, 2005b; 2007; 2008). Uno de los riesgos de este tipo de productos es la posibilidad de transferencia de microorganismos patógenos, particularmente patógenos oportunistas, a los individuos que los consumen (Mead, 2000). Otro riesgo es la posibilidad de transferencia de genes de resistencia a antibióticos a la microbiota del tracto intestinal de las aves o, indirectamente, al hombre, a través del consumo de carne de ave (Tollefson *et al.*, 1997). Sin embargo, para otros países la seguridad de estos productos está garantizada existiendo evidencias aportadas por años de investigación y aplicación sin que se hayan observado efectos adversos en los parámetros zootécnicos de las aves que reciben tratamiento.

De acuerdo a Vázquez (1997), la mayor eficacia de las mezclas indefinidas de EC en comparación con los productos probióticos definidos y con menor número de aislados es consecuencia de las dificultades existentes, en condiciones industriales, para aislar y cultivar muchos de los componentes de la microbiota normal de las aves. Las técnicas de cultivo limitan el número de cepas bacterianas que pueden aislarse, mantenerse y multiplicarse, reduciendo la eficiencia del producto. Por tanto, los métodos para cultivar el componente bacteriano afectan notablemente a la capacidad protectora del producto obtenido (Jeffrey, 1999; Nisbet, 2002). Por otra parte, se ha descrito que además de incluir diferentes microorganismos también es importante mantener una adecuada relación entre ellos. En la microbiota existe un balance delicado entre una elevadísima diversidad de géneros y especies. De algunos microorganismos puede ser necesario adicionar concentraciones muy elevadas, hasta 10^9 UFC/g, mientras que de otros pueden ser suficientes concentraciones muy inferiores, 10^3 UFC/g. Es importante que se mantenga el equilibrio entre los diversos géneros bacterianos incluidos en la mezcla. Si no se respeta esta relación numérica, se produce un desequilibrio que puede tener

consecuencias graves, pudiendo limitar la viabilidad de todas las especies incluidas.

Además, los productos probióticos definidos pueden estar constituidos por una única cepa o por mezclas de varias (Yeganiz, 2010). Por lo general, los productos constituidos por más de una especie presentan el beneficio de ser eficaces frente a una gama más amplia de condiciones del tubo digestivo. Diversos estudios (Timmerman *et al.*, 2004; Etleva *et al.*, 2010) han demostrado que las mezclas de probióticos proporcionan mejores resultados como promotores del crecimiento que los aditivos constituidos por un único aislado, siendo evidente un incremento significativo del peso final corporal en pollos de engorde. De forma general, los probióticos con más de un aislado tienen mayores posibilidades de éxito al complementarse sus efectos de forma sinérgica y favorecen la colonización de un sistema tan complejo como el tracto gastrointestinal.

En nuestro caso se empleó una mezcla de *L. reuteri*, *L. salivarius* y *L. mucosae*, aislados obtenidos a partir de heces y contenido intestinal de gallinas autóctonas en producción extensiva, los gallos de pluma de León, o de perdices. No existen referencias previas en lo que respecta al empleo de estos animales como fuente de aislados con fines probióticos pero la existencia de una elevada prevalencia de la resistencia antimicrobiana en los aislados de bacterias del ácido láctico procedentes de aves en cría intensiva, nos hizo escoger este abordaje. Sin embargo, podemos indicar que existen numerosas referencias en trabajos previos acerca del empleo de las especies de lactobacilos seleccionadas, *L. reuteri*, *L. salivarius* y *L. mucosae*, como probióticos en avicultura. De acuerdo a Milian (2005), éstas y otras especies de bacterias del ácido láctico como *L. acidophilus*, *L. bulgaris*, *Bifidobacterium bifidum* o *B. infantis* forman parte de la primera línea de defensa contra microorganismos potencialmente dañinos que se localizan en el tracto digestivo.

L. reuteri y *L. salivarius* se han utilizado como probióticos tanto en aves como en cerdos con muy buenos resultados, ya sea de forma individual o formando parte de mezclas. Así, Zacconi *et al.* (1999) comprobaron *in vivo* que la cepa de *Lactobacillus salivarius* A23 era capaz de colonizar y adherirse a la mucosa intestinal de pollos influyendo de forma positiva en la población de lactobacilos y negativamente en la de coliformes en el intestino.

Lactobacillus mucosae no ha sido tan utilizado pero ha sido, igualmente, propuesto por diferentes autores como una especie potencialmente probiótica prometedora, particularmente por su capacidad de adhesión mediante la producción de mucus (Roos *et al.*, 2002).

Un aspecto relevante es el relativo al origen de los aislados empleados con fines probióticos. Se ha descrito ampliamente que existe una especificidad con respecto a la especie animal que es importante en la colonización y en la adhesión *in vivo* por parte de los microorganismos. De acuerdo a Frizzo (2006), las cepas bacterianas aisladas de la microbiota de una determinada especie no colonizan necesariamente la misma localización en otra especie animal. Además, se ha demostrado que la microbiota intestinal varía en función de factores como la edad y que, de forma general, los aislados provenientes de aves adultas comerciales son más eficaces que los obtenidos de aves libres de patógenos específicos (Jeffrey, 1999).

Efecto de la vía de administración

En nuestro caso se empleó la vía oral directa para la inoculación del probiótico a los animales, con el fin de favorecer la colonización del intestino.

Aún cuando la vía oral es la forma más común de administración de probióticos, Sheil *et al.* (2004) demostraron que la administración por vía subcutánea de un probiótico elaborado a base de aislados de *Lactobacillus* tuvo un efecto antiinflamatorio y disminuyó la colitis y la artritis reumatoide en ratas. Igualmente, Laudanno *et al.* (2006) demostraron que la administración por vía oral y por vía subcutánea de un probiótico compuesto por *L. casei*, *L. plantarum*, *Streptococcus faecalis* y *Bifidobacterium brevis* se asociaba a un

efecto antiinflamatorio significativo en lesiones gastrointestinales de ratas. Ambos estudios concluyen que los efectos beneficiosos de los probióticos no se relacionan solamente con su administración por vía oral.

En lo que respecta a la administración por vía oral, ésta puede llevarse a cabo de diferentes formas. De acuerdo a Jeffrey (1999), Rostagno *et al.* (2003) y Schneitz (2005) las vías de administración de probióticos más empleadas en aves son la inclusión en el agua de bebida o la pulverización; con menos frecuencia los probióticos son agregados directamente a los comederos o mezclados con el alimento mientras que la aplicación en dosis individuales se limita a criaderos con bajo número de individuos.

La adición de los probióticos en el agua de bebida fue la primera forma de administración testada en experimentos de campo, dando muy buenos resultados (Wierup *et al.*, 1988; 1992; Schneitz, 2005). Sin embargo, se han señalado desventajas como el consumo desigual por individuo, la pérdida de viabilidad de algunos microorganismos anaeróbicos o sensibles al cloro del agua o la imposibilidad de administrar el producto a pollos recién nacidos.

El uso de aerosoles para la administración de probióticos fue sugerido inicialmente por Pivnick & Nurmi (1982). Posteriormente, Goren *et al.* (1984; 1988) desarrollaron un modo de aplicación por aspersion para el tratamiento de los pollitos recién nacidos en criaderos. La aplicación por aspersion, ya sea manual (Schneitz *et al.*, 1990) o automática (Schneitz, 1992; Chen *et al.*, 1998) permite tratar a los pollos con rapidez después de la eclosión y asegura un reparto equilibrado del tratamiento. Además, se ha demostrado que no causa efectos adversos sobre la salud o el rendimiento de las aves (Corrier *et al.*, 1995). La pulverización en la incubadora y la administración en agua de bebida fueron utilizadas por Blankenship *et al.*, (1993) de forma simultánea, demostrando ser eficaces en el control de la infección por *Salmonella*. Sin embargo, no hay evidencia de que un doble tratamiento de este tipo ofrezca una mayor protección.

Cox *et al.* (1993) desarrollaron un método de administración *in ovo* en el que se introduce el producto probiótico en la cámara de aire o en el amnios del

huevo dos días antes de la eclosión. Sin embargo, esta aplicación en la cámara de aire o el amnios reduce el porcentaje de nacimientos (Meijerhof & Hulet, 1997).

Efecto de la dosis

De acuerdo a Mountzouris *et al.* (2010), la dosis de los probióticos es un factor importante que afecta a su eficacia. La dosis recomendada para la mayoría de los probióticos se halla en el rango de 10^8 - 10^9 UFC por pollo y día. Aunque existe acuerdo general en que la eficacia es dependiente de la dosis, algunos autores han descrito mayor eficacia para las dosis más elevadas mientras que otros han observado el efecto inverso. Así, Higgins *et al.* (2008) demostraron que la aplicación de un probiótico constituido por varias bacterias del ácido láctico (FM-B11[®]) a dosis de 10^6 y 10^8 UFC/pollito tras del desafío con 10^4 UFC/pollito de *S. Enteritidis* reduce el riesgo de colonización intestinal del patógeno. Por el contrario, dosis inferiores del probiótico (10^4 UFC/pollito) no se asociaron a protección. En este mismo sentido, Kim *et al.* (2012) describen que la administración de una mezcla probiótica a dosis de 10^8 y 10^9 UFC/kg de alimento era más efectiva en la mejora de parámetros productivos de pollos que el empleo de una dosis de 10^7 UFC/kg. *Bacillus subtilis* mejora en mayor medida el rendimiento de las aves cuando se administra a dosis de 10^6 UFC/kg de alimento que a dosis de 10^4 UFC/kg (Teo & Tan, 2007).

Por el contrario, Mountzouris *et al.* (2010) describen un mejor rendimiento productivo en pollos tras la administración de un probiótico comercial, PoultryStar[®], a dosis de 10^8 UFC/kg que cuando se administra a dosis más elevadas, 10^9 o 10^{10} UFC/kg. Igualmente, Apata (2008) describe que el efecto de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sobre el peso de las aves es mayor cuando la dosis de probiótico disminuye en un logaritmo decimal, pasando de 8×10^9 a 2×10^9 UFC/kg. En base a estos resultados, se ha sugerido que la dosis es dependiente del producto probiótico y que una mayor concentración no siempre conduce a un efecto mejor.

En nuestro estudio la dosis empleada fue elevada, 1×10^9 UFC, ya que consideramos que con esta concentración bacteriana se puede favorecer una buena colonización del intestino en los pollitos.

Efecto del momento de administración

La gran mayoría de los estudios relativos al empleo de probióticos en pollos broiler eligen como momento de administración los primeros días de vida. De acuerdo a diversos autores, el éxito o el fracaso de los tratamientos con productos probióticos o con mezclas de EC en pollos depende del rápido establecimiento de las bacterias que contienen (Barnes *et al.*, 1972; Stern *et al.*, 2001; Tellez *et al.*, 2001; Fulton *et al.*, 2002; Revollo *et al.*, 2006). Sin embargo, no se conocen exactamente las dosis y la periodicidad óptima para lograr este objetivo de colonización.

Podemos destacar que en nuestro estudio, a pesar de que el probiótico fue administrado en los tres primeros días de vida, sus efectos tanto en lo que respecta a los parámetros productivos como en lo relativo a la infección por *Salmonella* no fueron evidentes hasta el día 14 y, particularmente, hasta el día 21 de vida de los animales. Cabe pensar que la administración del producto probiótico indujo un cambio en la microbiota digestiva de los pollos que se manifestó progresivamente y a largo plazo en la mejora de los índices productivos (ganancia media semanal e índice de conversión en la tercera semana). No obstante, estos datos deben ser confirmados en pruebas posteriores.

CONCLUSIONES

1.- El aislamiento de bacterias del género *Salmonella* en el 96% de los pollitos broiler de un día de edad en explotaciones con sospecha clínica de salmonelosis confirma la elevada frecuencia de esta infección en las explotaciones avícolas del oriente de Cuba. Los aislados obtenidos incluyeron salmonelas de los serogrupos D (61,2%), E (19,3%), C (11,3%) y B (8,1%). Desde el punto de vista clínico, las infecciones se asociaron a un cuadro de enteritis y elevada mortalidad así como a la presencia de lesiones de tipo necrótico en hígado, bazo y pulmón. Desde el punto de vista del diagnóstico microbiológico, los órganos en los que se alcanzó una mayor proporción de aislamientos fueron el saco vitelino, bazo, hígado y pulmón.

2.- La acetamida furánica monobromada, un derivado furánico obtenido por síntesis química, ha demostrado una elevada actividad frente a aislados de *Salmonella enterica* en los ensayos *in vitro*, con valores de concentración mínima inhibitoria de entre 12,5 y 50 µg/mL.

3.- La ausencia de resistencia a antimicrobianos es un factor limitante en la selección de aislados de bacterias del ácido láctico con fines probióticos. A pesar de emplear como fuente para estos aislados poblaciones de aves con un mínimo uso de antimicrobianos, como los gallos de pluma de León o perdices, tan solo 1 de cada 3 aislados presentó valores de concentración mínima inhibitoria inferiores al rango propuesto por la EFSA para la selección de bacterias del ácido láctico con fines probióticos.

4.- Una elevada proporción de los aislados de bacterias del ácido láctico procedentes de gallos de pluma de León y de perdices y recuperados de las heces, la mucosa o el contenido de diferentes tramos del intestino, particularmente del ciego, demostraron capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y para disminuir el pH del medio. Además, estos aislados presentaron una resistencia elevada a condiciones de pH ácido y una tolerancia moderada a las sales biliares. Entre los aislados seleccionados en base a estas potenciales propiedades probióticas se incluyeron aislados del género *Lactobacillus*, incluyendo las especies *L. reuteri*, *L. mucosae* o *L. salivarius*, así como un aislado identificado como *Enterococcus durans*.

5.- El impacto clínico y productivo de la infección experimental con un aislado de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, recuperado de explotaciones avícolas del oriente de Cuba con problemas clínicos de salmonelosis, fue moderado. Sin embargo, los estudios microbiológico e histopatológico permitieron demostrar la existencia de una importante infección sistémica asociada a lesiones en diferentes órganos, particularmente en el tracto intestinal, hígado y pulmón.

6.- La administración de una dosis de 0,5 mL de una solución con 50 mg/mL de acetamida furánica monobromada, por vía oral, a pollitos broiler en los tres días inmediatamente posteriores al desafío con un aislado de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis limitó la diseminación de la bacteria en los órganos internos, particularmente en el hígado y el bazo, acortó la duración del cuadro clínico en seis días y disminuyó la extensión y gravedad de las lesiones en diferentes órganos. Además, los pollitos que recibieron la acetamida furánica monobromada mostraron mejores parámetros productivos, ganancia de peso e índice de conversión, a lo largo del seguimiento realizado, alcanzado estas diferencias el máximo a los 14 días de vida.

7.- La administración de una mezcla probiótica constituida por tres aislados de origen aviar del género *Lactobacillus*, especies *L. reuteri*, *L. mucosae* y *L. salivarius*, a una dosis de 5×10^8 UFC y por vía oral, en los tres días inmediatamente anteriores al desafío con un aislado de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis tuvo un limitado efecto. Tan solo se redujo la proporción de muestras positivas por cultivo microbiológico en el bazo, se acortó el cuadro clínico en 3 días y se observaron mejoras en los parámetros productivos en la segunda y tercera semana de vida. Las lesiones observadas en los diferentes órganos en estos animales fueron similares, en extensión y gravedad, a las de los controles.

RESUMEN

El objetivo general del presente trabajo ha sido la evaluación de dos estrategias de control de las infecciones por *Salmonella* en pollos broiler: la acetamida furánica monobromada y una mezcla probiótica de origen aviar.

En una primera etapa, se valoró in vitro la eficacia de la acetamida furánica monobromada frente a diferentes aislados de *Salmonella enterica* de origen aviar y cepas de referencia utilizando las técnicas de macrodilución en tubop y de microdilución en placa para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). Los aislados de *Salmonella* de origen aviar fueron obtenidos en explotaciones avícolas del oriente de Cuba con problemas clínicos en los que se sospechaba de la participación de *Salmonella enterica*. Los valores obtenidos de CMI (entre 12,5 y 50 µg/mL) fueron similares o superiores a los reportados para algunos antibióticos de uso habitual lo que permitió confirmar que la acetamida furánica monobromada es una sustancia bioactiva con potente acción bactericida frente a *Salmonella enterica*.

En la segunda etapa se llevaron a cabo trabajos dirigidos a la obtención de un preparado probiótico que pudiera ser empleado en el control de las infecciones causadas por *Salmonella enterica* o por otros enteropatógenos en producción aviar. Para ello, se aislaron bacterias ácido lácticas a partir del contenido intestinal y las heces de dos poblaciones de aves con mínimo uso de antimicrobianos, los gallos de pluma de León y perdices. Se caracterizó el potencial probiótico de los aislados obtenidos mediante la determinación del perfil de resistencia a nueve antibióticos, de la capacidad para inhibir a microorganismos patógenos, de la capacidad para disminuir el pH del medio, de la tolerancia a condiciones de pH ácido y a sales biliares. Los aislados seleccionados en base a las pruebas anteriores fueron identificados por técnicas moleculares incluyendo diferentes especies del género *Lactobacillus*,

L. reuteri, *L. mucosae* y *L. salivarius*, y un aislado identificado como *Enterococcus durans*.

Finalmente, en una tercera etapa, se llevó a cabo la valoración *in vivo* de la eficacia de la acetamida furánica monobromada y de la mezcla probiótica desarrollada frente a *Salmonella enterica*, utilizando un modelo de infección experimental con un aislado de origen aviar y procedente de Cuba. Se utilizaron 75 pollitos que fueron distribuidos al azar en tres grupos experimentales, de 25 animales cada uno. Todos los pollitos fueron desafiados en el día 4 de vida mediante la administración por vía oral de una dosis de 0,5 mL de un cultivo en medio líquido con una concentración de 10^6 UFC/mL de un aislado de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis. El grupo experimental 1 fue el grupo control y no recibió tratamiento. Los pollitos del grupo experimental 2 recibieron por vía oral una dosis de 0,5 mL de una solución con una concentración de 50 mg/mL de acetamida furánica monobromada en los días 1, 2 y 3 postinfección mientras que los pollitos del grupo experimental 3 recibieron, por vía oral y en los días 1, 2 y 3 de vida, una mezcla probiótica constituida por tres aislados del género *Lactobacillus*, *L. reuteri*, *L. mucosae* y *L. salivarius*, y a una dosis de 0,5 mL/pollito de una suspensión con una concentración de 1×10^9 UFC/mL. La administración de la acetamida furánica monobromada limitó la diseminación de *S. Enteritidis* en los órganos internos, particularmente en el hígado y el bazo, acortó la duración del cuadro clínico y disminuyó la extensión y gravedad de las lesiones en diferentes órganos. Además los animales mostraron mejores parámetros productivos, ganancia de peso e índice de conversión. Por su parte, la administración de la mezcla probiótica tuvo un efecto limitado y tan solo redujo la proporción de muestras positivas por cultivo microbiológico en el bazo, acortó el cuadro clínico en 3 días y se asoció a mejoras en los parámetros productivos en la segunda y tercera semana de vida.

SUMMARY

The aim of this study was the evaluation of two different strategies for the control of *Salmonella* infection in broiler chickens: the use of furan acetamide monobrominated and the use of a probiotic mixture of avian origin.

In a first stage, the antimicrobial activity of monobrominated furan acetamide was evaluated *in vitro* against different field isolates of *Salmonella enterica* of avian origin and reference strains using a tube macrodilution and a plate microdilution tests to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). *Salmonella* isolates of avian origin were recovered from poultry farms in eastern Cuba with clinical problems in which *Salmonella* infection was suspected. CMI values (12.5-50 µg/ mL) were similar or higher than those reported for some commonly used antibiotics which confirmed that the furan acetamide monobrominated is a bioactive substance with potent bactericidal activity against *Salmonella enterica*.

In a second step, the research was directed towards obtaining a probiotic preparation that could be used in the control of infections caused by *Salmonella enterica* as well as other enteropathogens in poultry production. Lactic acid bacteria (LAB) were recovered from the intestinal contents and feces of two populations of birds with minimal use of antimicrobials, cocks bred for the production of feathers (gallos de pluma) and partridges. Potential probiotic characteristics of the isolates were estimated by determining the resistance profile against nine antibiotics, the ability to inhibit pathogenic microorganisms, the ability to decrease the pH of the medium and the tolerance to acid conditions and bile salts. Those isolates selected based on the above tests were identified by molecular techniques and included different species of *Lactobacillus*, *L. reuteri*, *L. salivarius* and *L. mucosae*, as well as an isolate identified as *Enterococcus durans*.

Finally, in a third step, we conducted an *in vivo* assessment of the effectiveness of monobrominated furan acetamide and of the probiotic mixture

against *Salmonella enterica* in broiler chickens, using a model of experimental infection with an isolate of avian origin from Cuba. A total of 75 chicks were randomly divided into three experimental groups of 25 animals each. All chicks were challenged on day 4 of life by oral administration of a dose of 0.5 mL of a liquid culture with a concentration of 10^6 CFU/mL of an isolate of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis. Experimental group 1 was the control group and received no treatment. Chicks from experimental group 2 received orally a dose of 0.5 mL of a solution with a concentration of 50 mg/mL of furan acetamide monobrominated on postinoculation days 1, 2 and 3 while the animals of the experimental group 3 received orally and on days of life 1, 2 and 3, a probiotic mixture including three selected isolates of *Lactobacillus*, *L. reuteri*, *L. salivarius* and *L. mucosae*, at a dose of 0.5 mL per chick of a suspension with a concentration of 10^9 CFU/mL. The treatment with furan acetamide monobrominated limited the spread of *S. Enteritidis* in different organs, particularly in the liver and the spleen, shortened the duration of clinical symptoms and decreased the extent and severity of lesions. Besides the animals showed better growth performance, weight gain and feed conversion. On the other hand, the administration of the probiotic mixture had a limited effect and only reduced the proportion of positive samples in the spleen, shortened the duration of the clinical symptoms in 3 days and was associated with limited improvements in production parameters in the second and third week of life.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi K. (1998).** Report calls for action on antibiotic resistance. *British Medical Journal*, 316: 1261.
- Abee T., Krockel L. & Hill C. (1995).** Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International Journal of Food Microbiology*, 28: 169-185.
- Acha P. & Szyfres B. (1986).** Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. Ed, OPS, EE.UU.: 158 -167.
- Acha P. & Szyfres B. (2001).** Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3ra ed. Vol. 1. Organización Panamericana de la Salud.
- Adachi S. (1992).** The lactic acid bacteria in health and disease. En: *The Lactic Acid Bacteria*. Elsevier Applied Science. London,R.U.: 233.
- Adams C. (2000).** Asistencia con resistencia. *Avicultura y ácidos en la dieta*. *Revista Alimentos Balanceados para Animales*. Marzo-Abril: 14 -16.
- Adams M.R. & Moss M.O. (1998).** *Microbiología de los alimentos*. Acribia. Zaragoza, España: 321-330.
- Aguavil E.J.C. (2012).** Evaluación del efecto de un probiótico nativo elaborado en base a *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* sobre el sistema gastrointestinal en pollos broiler ross-308 en santo domingo de los tsáchilas.” informe técnico del proyecto de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de ingeniero agropecuario.
- Ahn Y.T., Kim G.B., Lim K.S., Back Y.J. & Kim H.U. (2003).** Desconjugation of bile salt by *Lactobacillus acidophilus* isolates. *International Dairy Journal*, 13: 303-311.
- Aire T.A. (1973).** Growth of the bursa of Fabricius and thymus gland in the Nigerian and White Leghorn cockerels. *Research in Veterinary Science*, 15: 383-385.
- Akhtar A., Hair-Bejo M., Omar A.R., Zakaria Z. & Khairani-Bejo S. (2011).** Pathogenicity of *Salmonella Enteritidis* phage types 3A and 35 after experimental infection of white leg horn chicks. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 21 (4): 770-777.
- Al Jassim R.A. (2003).** *Lactobacillus ruminis* is a predominant lactic acid producing bacterium in the caecum and rectum of the pig. *Letters in Applied Microbiology*, 37 (3): 213-7.
- Alakomi H.L., Skytta E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K. & Helander I.M. (2000).** Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2001-2005.
- Alarcón T. (2001).** *B. subtilis* 3 contra *H. pylori*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 45: 3156.

- Alkhalif A., Alhaj M., & Al-Homidan I. (2010).** Influence of probiotic supplementation on blood parameters and growth performance in broiler chickens. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 17 (3): 219-225.
- Almeida S.A. (1994).** Evaluación preliminar de la actividad biológica de los compuestos sintetizados en síntesis de compuestos potencialmente bioactivos derivados del furoilacetónitrilo. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Químicas. Santa Clara, Cuba.
- Alquicira Paez L. (2006).** Determinación del mecanismo de resistencia a la acción inhibitoria de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa, México.
- Alvarado Rivas C.C. & Díaz Rivero C.G. (2009).** Estudio preliminar del potencial probiótico lactobacilos aislados de pastizal de una finca lechera. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 51 (1): 8-14.
- Al-Zenki S.F., Al-Nasser A.Y., Al-Saffar A.E., Abdullah F.K., Al-Bahouh M. E., Al-Haddad A.S., Alomirah H. & Mashaly M. (2009).** Effects of using a chicken-origin competitive exclusion culture and probiotic cultures on reducing *Salmonella* in broilers. *Journal of Applied Poultry Research*, 18 (1): 23-29.
- Ammor M.S., Flórez A.B. & Mayo B. (2007).** Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 24: 559-570.
- Ammor M.S., Flórez A.B., van Hoek A.H., de Los Reyes-Gavilan C.G., Aarts H.J., Margolles A. & Mayo B. (2008).** Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Molecular Microbiological Biotechnology*, 14: 6-15.
- Anadon A., Martinez-Larranaga M.R. & Aranzazu Martinez M. (2006).** Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 45 (1): 91-5.
- Anom. (1969).** Report of the Joint Committee of the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine. Swann Committee Report. HMSO.
- Apajalahti J., Kettunen A. & Graham H. (2004).** Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *World's Poultry Science Journal*, 60 (2): 223-262.
- Apata D.F. (2008).** Growth performance, nutrient digestibility and immune response of broiler chicks fed diets supplemented with a culture of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88 (7): 1253-1258.

- Applegate T.J., Klose V., Steiner T., Ganner A. & Schatzmayr G. (2010).** Probiotics and phytochemicals for poultry: Myth or reality? *Journal of Applied Poultry Research*, 19 (2): 194-210.
- Araujo R. (2005).** Beneficios de la utilización de HYDROENZIME en la ganancia de peso y conversión alimenticia en pollos de engorde. Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer. Disponible en: http://www.agranco.com/pdf/hydroenzime_prueba_elsalvador.pdf
- Argudín M.A., Mendoza M.C., Martín M.C. & Rodicio M.R. (2014).** Molecular basis of antimicrobial drug resistance in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from young healthy carriers in Spain. *Microbial Pathogenesis*, 74: 8-14.
- Arias F. (2000).** Programas de exclusión competitiva, una realidad mundial contra enteropatógenos en avicultura. III Congreso Nacional de Avicultura. Varadero, Matanzas, Cuba: 22-26.
- Arunachalam K., Gill H.S. & Chandra R.K. (2000).** Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019). *European Journal of Clinical Nutrition*, 54: 263-267.
- Asahara T., Nomoto J., Watanuki M. & Yokokura T. (2001).** Antimicrobial activity of intraurethrally administered probiotic *Lactobacillus casei* in a murine model of *E. coli* urinary tract infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 1751-1760.
- Ashayerizadeh A., Dabiri N., Ashayerizadeh O., Mirzadeh K.H., Roshanfekar H. & Mamooee M. (2009).** Effect of dietary antibiotic, probiotic and prebiotic as growth promoters, on growth performance, carcass characteristics and hematological indices of broiler chickens. *Pakistanian Journal of Biological Science*, 12: 52-57.
- Ashraf R. & Shah N.P. (2011).** Antibiotic resistance of probiotic organisms and safety of probiotic dairy products. *International Food Research Journal*, 18: 837-853.
- Atterbury R.J., Bergen M.A.P., Ortiz F.M., Lovell A., Harris J.A., De Boer A., Wagenaar J.A., Allen V.M. & Barrow P.A. (2007).** Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 4543-4549.
- Aviagen, (2012).** Disponible en: http://es.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Spanish_TechDocs/Ross-308-Broiler-Objetivos-de-Rendimiento-SP.pdf
- Awad W.A., Ghareeb K., Abdel-Raheem S. & Böhm J. (2009).** Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poultry Science*, 88 (1): 49-55.

- Axelsson F.S. (1998).** Lactic acid bacteria: classification and physiology. En: Lactic acid Bacteria, Microbiology and functional aspects. Salminen S. & von Wright A. Eds. 2nd edition. Marcel Dekker Inc. New York, EE.UU.
- Axelsson L.T., Ahrne S.E.I., Andersson M.C. & Stahl S.R. (1998).** Identification and cloning of a plasmid-encoded erythromycin resistance determinant for *Lactobacillus reuteri*. Plasmid, 20: 171-174.
- Azahares L.E., González O., Sierra G., Medina R., Silveira E., Campa C., Castañedo N. & Callis A.H. (1992).** Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* del derivado del furfural G.1. Informe Técnico I/1992. Grupo Haemophilus. Centro de Producción e Investigaciones de Vacunas y Sueros. Instituto Finlay. Ciudad Habana, Cuba.
- Back A. (2012).** Salmonelosis paratífica: la enfermedad y su control. Industria Avícola, Mayo 2012.
- Bager E. & Petersen J. (1991).** Sensitivity and specificity of different methods for the isolation of *Salmonella* from pigs. Acta Veterinaria Scandinavica, 32: 473-481.
- Bager F., Madsen M., Christensen J. & Aarestrup F. M. (1997).** Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. Preventive Veterinary Medicine, 31: 95-112.
- Bailey J.S., Blankenship L.C. & Cox N.A. (1991).** Effect of fructooligosaccharide on *Salmonella* colonization of the chicken intestine. Poultry Science, 70: 2433-2438.
- Bao Y., Zhang Y., Zhang Y., Liu Y, Wang Y., Dong X., Wang Y. & Zhang H. (2010).** Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. Food Control, 21 (5): 695-712.
- Barbosa T., Claudia R. S., La Ragione R., Martí J. W. & Adriano H.O. (2005).** Screening for *Bacillus* isolates in the broilers gastrointestinal tract. Applied Environmental Microbiology, 71: 968.
- Barefoot S.F. & Klaenhammer T.R. (1983).** Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Applied and Environmental Microbiology, 45 (6): 1808-15.
- Barnes E.M., Mead G.C. Barnum D.A. & Harry E.G. (1972).** The intestinal flora of the chicken in the period 2-6 weeks of age with particular reference to the anaerobic bacteria. Poultry Science, 13: 311-326.
- Barnes E.M., Impey C.S. & Stevens B.J.H. (1979).** Factors affecting the incidence and anti-*Salmonella* activity of the anaerobic cecal flora of the chick. Journal Hygiene, 82: 263-283.

- Barreto Argilagos G., Sadrés Cabrera M., Rodríguez Torrens H. & Guevara Viera G. (2010).** Agentes bacterianos asociados a brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) en Camagüey, Cuba, durante el periodo 2000-2008. Revista electrónica de veterinaria 11 (2). Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020210/021002.pdf>. Acceso: 23/5/2013.
- Barrow P. (1990).** Experimental *Salmonella enteritidis* phage type 4 infection in chickens. Proceedings IX th. International Congress of the World Veterinary Poultry Association.
- Barrow P. (1991).** Experimental infection of chickens with *Salmonella enteritidis*. Avian Pathology, 22: 651-669.
- Barrow P.A. & Freitas Neto O.T (2011).** Pullorum diseases and fowl typhoid-new thoughts on old diseases: a review. Avian Pathology, 40 (1): 1-13.
- Barrow P.A., Huggins M.B., Lovell M.A. & Simpson J.M. (1987).** Observations on the pathogenesis of experimental *Salmonella typhimurium* infection in chickens. Research in Veterinary Science, 42: 194-199.
- Barrow P.A., Jones M.A., Smith A.L. & Wigley P. (2012).** The long view: *Salmonella*- the last forty years. Avian Pathology, 41: 413-20.
- Bassam Y.K. (2011).** *Leuconostoc mesenteroides* cause nosocomial UTI at a tertiary care center in North India. Journal of Thi-Qar University, 6: 23-34.
- Bedford M. (2000).** Removal of antibiotic growth promoters from poultry diets: implications and strategies to minimize subsequent problems. World Poultry Science Journal, 56: 347-365.
- Bejar W., Farhat-Khemakhem A., Smaoui S., Makni M., Farhat M.B., Abdelmalek B., Mellouli, L., Maguin E., Bejar S. & Chouayekh H. (2011).** Selection of *Lactobacillus plantarum* TN627 as a new probiotic candidate based on in vitro functional properties. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 16: 1115-1123.
- Belmear P., Holterman O. & Mirand E. (1984).** Influence of the microflora on the immunologic response. General characteristics of the germ-free animal. Biomedical Research. Coates & Gustafson Eds. London, R.U.: 335-346.
- Bengmark S. (1998).** Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotics biota. Gut, 42: 2.
- Bengmark S. (2001).** Pre, pro and symbiotics. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 4: 571-579.
- Bermello A., Bermello A. & Mieres G. (2003).** Identificación de muestras sólidas mediante comparación con sustancias químicas de referencia. Análisis por espectrometría FTIR de absorción. Manual de Procedimientos de Ensayo, Laboratorio de Espectrometría

Infrarroja, Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar, 2003. Memorias del 1er. Taller de síntesis de Medicamentos. LTM-IMEFA-MINSAP. La Habana.

- Berthier F. & Ehrlich S.D. (1998).** Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. *FEMS Microbiology Letters*, 161 (1): 97-106.
- Bezkorovainy A. (2001).** Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 399-405.
- Blandino G., Milazzo I. & Fazio D. (2008).** Antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products available in Italy. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 6: 199-203.
- Blankenship L.C., Bailey J. & Cox N.A. (1993).** Two step mucosal competitive exclusion flora treatment to diminish *Salmonella* in commercial broiler chickens. *Poultry Science*, 72: 1667-1672.
- Blankenship L.C., Bailey J.S., Cox N.A., Stern N.J., Brewer R. & Williams O. (1993).** Two-step mucosal competitive exclusion flora treatment to diminish *Salmonellae* in commercial broiler chickens. *Poultry Science*, 72 (9): 1667-1672.
- Bloksma N., Ettekoven H., Hothvis F., Van Noorle–Jausen L., de Reuver M., Kreeflenberg J. & Willers J. (1981).** Effects of *Lactobacilli* on parameters of non-specific resistance of mice. *Medical Microbiology and Immunology*, 170: 45-53.
- Bogdanov L., Popkhirstov P. & Marinov L. (1962).** Anticancer effect of antibioticum bulgaricum on sarcoma 180 and on the select form of Ehrlich carcinoma. VIII International Cancer Congress: 364.
- Borczyk A.A., Karmali M.A., Lior H. & Duncan L.M.C. (1987).** Bovine reservoir for verotoxin-producing *Escherichia coli* O157: H7. *Lancet*, 1: 98.
- Borie P. Consuelo & Sánchez C.H. María Luisa. (1998).** *Salmonella enteritidis* : Un nuevo desafío. *Revista Tecnológica Veterinaria*, 4 (2).
- Boris S., Jimenez-Diaz R., Caso J.L. & Barbes C. (2001).** Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* UO004, an intestinal isolate with probiotic potential. *Journal of Applied Microbiology*, 91 (2): 328-33.
- Botina B., Zimmermann B.H. & Vanegas M. (2008).** Caracterización preliminar de compuestos antilisteriales producidos por bacterias ácido lácticas nativas. *Revista MVZ Córdoba*, 13 (3).
- Boyen F., Haesebrouck F., Vanparys A., Volf J., Mahu M., Van Immerseel F., Rychlik I., Dewulf J., Ducatelle R. & Pasmans F. (2008).** Coated fatty acids alter virulence

properties of Salmonella Typhimurium and decrease intestinal colonization of pigs. Veterinary Microbiology, 132: 319-327.

- Bozkur M., Küçükylmaz K., Çatlı A.U. & Çınar M. (2009).** The effect of dietary supplementation of prebiotic, probiotic and organic acid, either alone or combined, on broiler performance and carcass characteristics. Poultry Research Institute. South African Journal Animal Science, January. 39 (3) Pretoria.
- Brackett R.E. (2008).** Taking the fight to food borne diseases . Disponible in: UR:<http://www.food.solutions.eu.com/pastissue/article.asp?art=269551&issue=193>.
- Bradley W.L., Mysliwiec T.H. & Gourama H. (2005).** Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). Food Microbiology, 22: 199-200.
- Brashears M.M., Jaroni D. & Trimble J. (2003).** Isolation, selection, and characterization of lactic acid bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of *E. coli* O157:H7 in cattle. Journal of Food Protection, 66 (3): 355-63.
- Breuil J., Brisabois A., Casin I., Armand-Lefrève L., Frémy S. & Collatz E. (2000).** Antibiotic resistance in *Salmonella* isolated from human and animals in France: comparative data from 1994 and 1997. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 46: 965-971.
- Brozca F., Grybusky R., Stecka K. & Prieska M. (2000).** Effect of two probiotics vs. antibiotics on chicken broiler body weight carcass yield and carcass quality. Roczniki Naukowe Zootechniki, 27: 303-315.
- Bruno M.E. & Montville T.J. (1993).** Common mechanism of action of bacteriocin from lactic acid bacteria. Applied Environmental Microbiology, 59 (9): 3003-3010.
- Bryan L.E. & Kwan S. (1981).** Mechanisms of aminoglycoside resistance of anaerobic bacteria and facultative bacteria grown anaerobically. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 8: 1-8.
- Bumstead N. & Barrow P.A. (1988).** Genetics of resistance to *Salmonella typhimurium* in newly hatched chicks. British Poultry Science, 29: 521-529.
- Buncic S., Avery S, Rocourt J. & Dimitrijevic M. (2001).** Can food-related environmental factors induce different behaviour in two key serovars, 4b and 1/2a. of *Listeria monocytogenes*? International Journal of Food Microbiology, 65: 201-212.
- Bussiere D.E., Muchmore S.W., Dealwis C.G., Schluckebier G., Nienaber V.L., Edalji R.P., Walter K.A., Ladror U.S., Holzman T.F. & Abad-Zapatero C. (1998).** Crystal structure of ermC, an rRNA methyltransferase which mediates antibiotic resistance in bacteria. Biochemistry-US, 37: 7103-7112.

- Butaye P., Devriese L. & Haesebrouck F. (2003).** Antimicrobial growth promoters used in animal feed: Effects of less well known antibiotics on Gram-positive bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 16: 175-188.
- Cabrera R., Ramírez M., Bravo L., García B. & Fernández A. (1998).** Serotipaje de los microorganismos pertenecientes al género *Salmonella*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 18: 150-152.
- Cabrera R., Ruíz, J., Marco F., Oliveira I., Arroyo M., Aladueña A., Usera MA., Jiménez de Anta MT., Gastón J. & Villa J. (2004).** Characterization of mechanism of resistance to several antimicrobial agents in *Salmonella* clinical isolates causing travelers diarrhea. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 48: 3934-3939.
- Caffer María Iny Terragno Raquel (2001).** Manual de procedimiento para la caracterización de *Salmonella*. Ministerio de Salud. Subsecretaría de Investigación Tecnológica ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán. Instituto nacional de Enfermedades Infecciosas. Departamento de bacteriología. Servicio de enterobacterias. Buenos Aires. Argentina.
- Cagigas Reig A.L. (2002).** Prebióticos y probióticos: una relación beneficiosa. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 16 (1): 63-68.
- Canway P.L., Gorbach S.L. & Goldin B.R. (1987).** Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of Dairy Science*, 70 (1): 1-12.
- Capcarova M., Hascik P., Kolesarova A., Kacaniova M., Mihokb M. & Pal G. (2011).** The effect of selected microbial strains on internal milieu of broiler chickens after per oral administration. *Research in Veterinary Science*, 91: 132-137.
- Carr F.J., Chill D. & Maida N. (2002).** The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical reviews in Microbiology*, 28 (4): 281-370.
- Carter G.R. (1985).** Bacteriología y Micología Veterinaria. Ed. El Manual Moderno, México.: 171-189.
- Carter G.R. (1989).** Bacteriología y Micología Veterinaria. Ed, El Manual Moderno, México: 171-189
- Cervantes H. (1999).** Control de la *Salmonella* en reproductoras de engorde y su progenie. *Revista Avicultura Profesional*, 18 (9) : 58 - 66.
- Casas I.A., Edens F.V.V. & Dobrogoz W.J. (1998).** *Lactobacillus reuteri* an efective probiotic for poultry and other animals. *Lactic acid bacteria*. 2nd ed. New York. Marcel Dekker. 475-518.
- Casewell M., Friis C., Marco E., McMullin P. & Phillips I. (2003).** The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52: 159-161.
- Casey P.G., Casey G.D., Gardiner G.E., Tangney M., Stanton C., Ross R.P., Hill C. & Fitzgerald G.F. (2004).** Isolation and characterization of anti-*Salmonella* lactic acid

bacteria from the porcine gastrointestinal tract. Letters in Applied Microbiology, 39 (5): 431-8.

Cason J.A., Cox N.A., & Bailey J.S. (1994). Transmission of *Salmonella* Typhimurium during hatching of broiler chicks. Avian Diseases, 38: 583-588.

Castro Albornoz G. & Valbuena Colmenares E. (2009). Biopreservación: alternativa para mejorar la calidad de los quesos. Venezuela. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/121460574/Biopreservacion-alternativa-para-mejorar-la-calidad-de-los-quesos>

Casula G. & Cutting S.M. (2002). *Bacillus probiotics*: spore germination in the gastrointestinal tract. Applied Environmental Microbiology, 68: 2344.

Cataloluk O. & Gogebakan B. (2004). Presence of drug resistance in intestinal *Lactobacilli* of dairy and human origin in Turkey. FEMS Microbiology Letters, 236: 7-12.

Cauwerts K., Pasmans F., Devriese L.A., Martel A., Haesebrows F. & Decostere A. (2006). Cloacal *Lactobacillus* isolates from broilers show high prevalence of resistance towards macrolide and lincosamide antibiotics. Avian Pathology, 35: 160-4.

Cervantes H. (1999). Control de la *Salmonella* en reproductoras de engorde y su progenie. Rev. Avicultura Profesional, 18 (9): 58 – 66.

Chacana P. & Terzolo H. (2003). Revisión sobre Pullorosis y Tifosis aviar. Revista de Medicina Veterinaria, 84: 14-20.

Chaengprachak W., Sthitmatee N., Hafez H.M. & Zessin K.H. (2009). Prevalence of *Salmonella* spp. in a production compartment broiler farms in Northern Thailand (abstract). In: Food safety and zoonoses symposium for Asia Pacific. 27-28 July 2009, Chiang Mai, Thailand : 14.

Chambers J.R. & Gong J. (2011). The intestinal microbiota and its modulation for *Salmonella* control in chickens. Food Research International, 44 (10): 3149-3159

Champ M., Szyllit O., Raibaud P. & Ait-Abdelkader N. (1983). Amylase production by three *Lactobacillus* strains from chicken crop. Journal of Applied Bacteriology, 55: 487.

Chang Y.H., Kim J.K., Kim H.J., Kim W.Y., Kim Y.B. & Park Y.H. (2001). Selection of a potential probiotic *Lactobacillus* strain and subsequent in vivo studies. Antonie van Leeuwenhoek, 80 (2): 193-9.

Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L. & Collins J.K. (1998). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. Journal of Food Protection, 61: 1636-1643.

Chaveerach P., Lipman L. & Knapen F. (2004). Antagonistic activities of several bacteria on in vitro growth of 10 strains of *Campylobacter jejuni/coli*. International Journal of Food Microbiology, 90 (1): 43-50.

- Chen M., Stern N. J., Bailey J. S., & Cox N. A. (1998).** Administering mucosal competitive exclusion flora for control of *salmonellae*. *Journal of Applied Poultry Research*, 7 (4): 384-391.
- Chikindas M.L., García-Garcera M.J., Driesessen A.J.M., Ledebøer A.M., Nissen-Mejer J., Nes I.F., Abee T., Konings W.N. & Venema G. (1993).** PediocinPA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Applied Environmental Microbiology*, 59: 3577-3584.
- Chopra I. & Roberts M. (2001).** Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65: 232-260.
- Christensen H.R., Frøkiær H., & Pestka J.J. (2002).** *Lactobacilli* differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *Journal of Immunology*, 168 (1): 171-178.
- Chuayana E., Ponce C., Rivera M. & Cabrera E. (2003).** Antimicrobial activity of probiotics from milk products. Philippines. *Journal of Microbiology and Infectious Diseases*, 32: 71-74.
- Cintas L.M., Casaus M.P., Herranz C., Nes I.F. & Hernández P.E. (2001).** Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Science and Technology International*, 74: 281-305.
- Clewell D.B., Flannagan S.E. & Jaworski D.D. (1995).** Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. *Trends in Microbiology*, 3: 229-236.
- Close B., Banister K., Baumans V., Bernoth E.M., Bromage N., Baunvan J., Bernoth Eva-Maria, Niall Bromage, Bunyan J., Erhardt W., Flecknell P., Gregory N., Hackbarth H., Morton D. & Warwicket C. (1996).** Recomendaciones para la eutanasiade los animales de experimentación: parte 1. *Laboratory animals*, (4): 293-316.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2004).** Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: Approved Standard- 6th edition. M11-A6. EE.UU.
- Colin I., Morales E. & Ávila E. (1994).** Evaluación de promotoresdel crecimiento para pollos de engorde. *Revista Veterinaria de México*, 25: 141.
- Collazos J.A. (2008).** Aportaciones al diagnóstico y control de la salmonelosis porcina. Tesis Doctoral. Universidad de León.
- Collins M.D. & Gibson G.R. (1999).** Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69 (suppl. 1): 1052.

- Comunian R., Daga E., Dupré I., Paba A., Devirgiliis C., Piccioni V., Perozzi G., Zonenschain D., Rebecchi A., Morelli L., De Lorenttis A. & Giraffa G. (2010).** Susceptibility to tetracycline and erythromycin of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from traditional Italian fermented foods. *International Journal of Food Microbiology*, 138: 151-156.
- Condon S. (1983).** Aerobic metabolism of lactic acid bacteria. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 7: 15-25.
- Contreras C.J.C. (2001).** Qualidade de carcaça e carne de aves. I Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes. San Pedro, Brasil: 160-178.
- Contreras C.J.C. & Beraquet N.J. (1995).** Effect of deboning and electrical stimulation on post mortem biochemical changes in chicken breast. *International Congress of Meat Science and Technology*. The Hague, Holanda: 41-46.
- Cooper G.L., Venables L.M., Woodward M.J. & Hormaeche C.E. (1994)** Invasiveness and persistence of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, and a genetically defined *Salmonella enteritidis* aroA strain in young chicks. *Infection and Immunity*, 62: 4739-4746.
- Coppola R., Succi M., Tremonte P., Reale A., Salzano G. & Sorrentino E. (2005).** Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Lait*, 85: 193-204.
- Corrêa G.S.S., Gomes A.V.C., Corrêa AB. & Salles AS. (2002).** Desempenho de frangos de corte alimentados com diferentes promotores de crescimento. *Reunião Anual da SBZ*. Viçosa, Anais, Portugal.
- Corrier D.E., Byrd IJ.A., Hume M.E., Nisbet D.J. & Stanker L.H. (1998).** Effect of simultaneous or delayed competitive exclusion treatment on the spread of *Salmonella* in chicks. *Journal of Applied Poultry Research*, 132-137.
- Corrier D.E., Nisbet D.J., Scanlan C.M., Hollister A.G., Caldwell D.J., Thomas L.A., et al. (1995).** Treatment of commercial broiler chickens with a characterized culture of cecal bacteria to reduce *Salmonellae* colonization. *Poultry Science*, 74 (7): 1093-1101.
- Cortés C. Ávila G. (2000).** El efecto del *Bacillus toyoi* sobre el comportamiento productivo en pollos de engorda. *Veterinaria*. México. *Rev. Veterinaria de México*. 31: 4. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/espanol/e-htms/e-vetmex/e-vm2000/e-vm00-4/ervm004e.htm>
- Corzo G. & Gilliland S.E. (1999).** Bile salt hydrolase activity of three strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 82: 472-480.
- Cotter P.D., Hill C. & Ross R.P. (2005).** Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 777-788.

- Cotter P.D., Hill C., Ross R.P., Eijsink V.G.H., Skeie M., Middelhoven P.H., Brurberg M.B. & Ness I.F. (1998).** Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3275-328.
- Cox N.A. & Bailey J.S. (1993).** Introduction of bacteria *in ovo*. United States patent, 5: 206, 215.
- Cox N.A., Bailey J. S., Mauldin J.M., Blankenship L.C. & Wilson J.L. (1991).** Extent of *Salmonellae* contamination in breeder hatcheries. *Poultry Science*, 70(2): 416-418.
- Cox N.A., Bailey J.S., Mauldin J. M. & Blankenship L.C. (1990).** Presence and impact of salmonella contamination in commercial broiler hatcheries. *Poultry Science*, 69 (9): 1606-1609.
- Cristóbal Delgado R.L. (2008).** Lactobacilos productores de bacteriocinas aislados de quesos artesanales provenientes de Lima y provincias. Tesis de maestría. Lima, Perú.
- Cruchaga S., Echeita A., Aladueña A., García-Peña J. & Frías N, (2001).** Antimicrobial resistance in Salmonella from human, foods and animals in Spain in 1998. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47: 315-321.
- Cuca G.M., Avila G.E. & Pro M.A. (1990).** La alimentación de las aves. Colegio de postgraduado. Montecillo, México.
- Cueto C. & Aragón S. (2012).** Evaluación del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas para reducir el colesterol *in vitro*. *Scientia Agropecuaria*, 1: 45-50. Disponible en: www.sci-agropecu.unitru.edu.pe
- Cueto-Vigil M.C., Acuña-Monsalve Y. & Valenzuela-Riaño J. (2010).** Evaluación *in vitro* del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño. *Actualidades Biológicas*, 32 (93): 129-138.
- Cunning J.H. (1981).** Short chain fatty acids in the human colon. *Gut*, 22: 763-779.
- Daeschel M.A. (1989).** Antimicrobial substance from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology*, 43: 164-147.
- Dalloul R.A., Lillehoj H.S., Shellem T.A., & Doerr J.A. (2003).** Intestinal immunomodulation by vitamin A deficiency and lactobacillus-based probiotic in *Eimeria acervulina* infected broiler chickens. *Avian Diseases*, 47 (4): 1313-1320.
- Danielsen M. & Wind A. (2003).** Susceptibility of *Lactobacillus spp.* to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*, 82: 1-11.
- Dar A., Potter A., Tikoo S., Gerdtts V., Lai K. & Babiuk L.A. (2009).** CpG oligodeoxynucleotides activate innate immune response that suppresses infectious bronchitis virus replication in chicken embryos. *Avian Diseases*, 53 (2): 261-267.

- Davies J.E. (1994).** Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*, 264: 375-382.
- De Angelis M., Siragusa S., Berloco M., Caputo L., Settanni L., Alfonsi G., Amerio M., Grandi A., Ragni A. & Gobbetti M. (2006).** Selection of potential probiotic *Lactobacilli* from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. *Research in Microbiology*, 157 (8): 792-801.
- De la Fuente C., Gil T., Diez J., González M.A., Campo J.L. & Vázquez, I. (2009).** Memoria para reconocimiento de dos razas de gallos: Pardo de León e Indio de León. Proyecto: "Programas de mejoras genética y conservación de razas de ganado autóctono de castilla y León".
- De Martinis E.C.P., Públio M.R.P., Santarosa P. R. & Freitas F.Z. (2001).** Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged brazilian meat and meat products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32 (1).
- De Ross N. & Katan M. (2000).** Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71: 405-411.
- Delgado S., Florez A.B. & Mayo B. (2005).** Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*: species from the human gastrointestinal tract. *Current Microbiology*, 50: 202-207.
- Deplancke B., Vidal O., Ganessunker D., Donovan S.M., Mackie R.I. & Gaskins H.R. (2002).** Selective growth of mucolytic bacteria including *Clostridium perfringens* in a neonatal piglet model of total parenteral nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76: 1117-1125.
- 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.
- Devirgiliis C., Barile S. & Perozzi G. (2011).** Antibiotic resistance determinants in the interplay between food and gut microbiota. *Genes & Nutrition*, 6: 275-284.
- Devirgiliis C., Coppola D., Barile S., Colonna B. & Perozzi G. (2009).** Characterization of the Tn916 conjugative transposon in a food-borne strain of *Lactobacillus paracasei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 3866-3871.
- Dhillon A.S., Alisantosa B., Shivaprasad H.L., Jack O., Schaberg D. & Bandli D. (1999).** Pathogenicity of *Salmonella enteritidis* Phage Types 4, 8 and 23 in broilers chicks. *Avian Diseases*, 43: 506-515.

- Dhillon A.S., Jack O.K., Shivaprasad H.L., Schaberg D.M. & Bandli D.V. (1998).** Experimental infection of *Salmonella enteritidis* in broilers chicks. In the Proceedings. 50th Western Poultry Disease Conference.
- Doug R., Wagner T. & Cerniglia C. (2005).** Antimicrobial susceptibility patterns of competitive exclusion bacteria applied to newly hatched chickens. *International Journal of Food Microbiology*, 102: 349-353.
- Drago L., Gismondo M.R., Lombardi A., de Haen C. & Gozzini L. (1997).** Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin. *FEMS Microbiology Letters*, 153 (2): 455-63.
- Drasar B. & Hill H. (1972).** Intestinal bacteria and cancer. *American Journal of diseases of children*, 105: 643-645.
- Dridger D., Fimland G., Hechard Y., McMu-Ilen L.M. & Prevost H. (2006).** The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70: 564-582.
- Du Toit M., Dicks L.M., Holzapfel W.H. (2001).** Taxonomy of obligately homofermentative and facultatively heterofermentative *Lactobacilli* in pig faeces. *Letters in Applied Microbiology*, 32 (3): 199-204.
- Du Toit M., Franz C.M., Dicks L.M., Schillinger U., Haberer P., Warlies B., Ahrens F. & Holzapfel W.H. (1998).** Characterization and selection of probiotic *Lactobacilli* for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. *International Journal of Food Microbiology*, 40 (1-2): 93-104.
- Dunne C. (2001).** Adaptation of bacteria to the intestinal niche: probiotics and gut disorder. *Inflammatory Bowel Disease*, 7: 136-145.
- Dunne C., Murphy L., Flynn S. O'Mahony L., O'Halloran S., Feeney M., Darrin M., Thornton G., Fitzgerald G & Daly C. (1999).** Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76 (1-4): 279-292.
- Edel W. & Kampelmacher E.H. (1973).** *Bulletin of the World Health Organization*, 48: 167-174.
- Edens F.W. (2003).** An alternative for antibiotic use in poultry: probiotics. *Revista Brasileira de Ciencia Avícola*, 5: 1-40.
- EFSA (2005).** Opinion of the scientific panel on additives and products in substances used in animal feed on the updating of the criteria used in the assessment of bacteria for resistance to antibiotics of human and veterinary importance. *EFSA journal*, 223: 1-12.

- EFSA (2007).** European Food Safety Authority. 2007. Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. EFSA Journal, 587: 1-16.
- EFSA (2008).** European Food Safety Authority. Guidance for the preparation of dossiers for zotechnical additives Prepared by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (Question No EFSA-Q-2008-403). EFSA Journal, 776: 1-17.
- EFSA (2012).** Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. EFSA Journal; 10 (6): 2740.
- EFSA (2012).** The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotics Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. EFSA Journal, 10 (3): 2597.
- EFSA (2013).** The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotics Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. EFSA Journal, 11 (4): 3129.
- EFSA (2014).** The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotics Agents and Food-borne Outbreaks in 2012; EFSA Journal, 12 (2): 3547.
- EFSA Journal (2013).** Scientific Report of EFSA and ECDC. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. EFSA Journal, 11 (5): 3196.
- Ehrmann M.A., Kurzak P., Bauer J. & Vogel R.F. (2002).** Characterization of *Lactobacilli* towards their use as probiotic adjuncts in poultry. Journal of Applied Microbiology, 92: 966-975.
- Eijsink V.G.H. Skey M., Middelhoven M., Brurberg P.H. & Nesl. F. (1998).** Comparative studies of class II bacteriocins of lactic acid bacteria. Applied Environmental Microbiology, 64: 3275-3281.
- Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K. & Ishizaki A. (2000).** Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiology Reviews, 24: 85-106.
- Errecalde J.O. (2004).** Uso de antimicrobianos en animales de consumo, incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública. FAO. Roma, Italia.
- Espinoza R. (1997).** Parámetros productivos e incidencia de enfermedades bacterianas en reproductoras pesadas tratadas con un producto a base de microflora intestinal. IV Encuentro Latinoamericano de Avicultura. Guadalajara. México.
- Estévez Tousard M., Díaz González M., Monte Boada M.J., Toledo Rl. & Bravo J.R. (1993).** The infectious etiology of acute diarrheal diseases in Republic of Cuba 1991. Revista Cubana de Medicina Tropical, 45: 139-145.
- Estrada C., Osmaida, Cadrelo T. Surelis, Salazar A. Ana Ivis, Almeida S., M., Montero V.R, Peillón V.O., Cos D. Yusel, Bárzaga R. y Campuzano Y. (2007).** Efecto

bactericida de la acetamida furánica bromada frente a cepas salvajes de *Pasteurella multocida* *in vitro*. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504 VIII (11). Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/recvet/n111107/110704.pdf>

Etleva V., Thanas P., Pashk L. & Myqerem T. (2010). Using combined probiotic to improve growth performance of weaned piglets on extensive farm conditions. *Livestock Science*, 134: 249-251.

Evans M.R., Swaminathan B., Graves L.M. Altremann E., Klaenhammer T.R., Fink R.C., Kernodle S. & Kathariou S. (2004). Genetic markers unique to *Listeria monocytogenes* serotype 4b differentiate epidemic clone II (hot dog outbreak strains) from other linages. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 2383-90.

Fakhry S., Manzo N., D'Apuzzo E., Pietrini L., Sorrentini I., Ricca E., De Felice M. & Baccigalupi L. (2009). Characterization of intestinal bacteria tightly bound to the human ileal epithelium. *Research Microbiology*, 160: 817-823.

FAO (2013). Revisión del desarrollo avícola. Disponible en: www.fao.org/docrep/019/i3531s.pdf

FAO/WHO (2002). Joint FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization) working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Ontario, Canada.

Farias Filho D.E., Torres K.A.A., Faria D.E., Campos D.M.B. & Rosa P.S. (2006). Probiotics for broiler chickens in Brasil: systematic reviews and meta-analysis. *Revista Brasileira de Ciencia Avícola*, 8: 89-98.

Fayol-Messaoudi D., Berger C.N., Coconnier-Polter M.H., Lievin-Le Moal V. & Servin A.L. (2005). pH Lactic acid, and non-lactic acid dependent activities of probiotic *Lactobacilli* against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (10): 6008-13.

Feberwee A., de Vries T.S., Hartman E.G, de Wit JJ., Elbers A.R. & de Jong W.A. (2001). Vaccination against *Salmonella enteritidis* in Dutch commercial layer flocks with a vaccine based on live *Salmonella gallinarum* 9R strain: evaluation of efficacy, safety and performance of serologic *Salmonella* test. *Avian Diseases*, 45. 83-91.

Ferguson AR., Connel M.C. & Truscott R.B. (1961). Isolation of *Salmonella pullorum* from joints of broiler chicks. *Canadian Veterinary Journal*, 2: 143-145.

Fernández D.A. (2005). Producción inducible de lactococina A, pediocina PA-1, colicina V e interleuquina-2 en cepas de *Lactococcus lactis* productoras de nisina. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

Fernández F.M.H. & Van Gils B. (2002). Dietary manan-oligosaccharide and their effect on chicken caecal microflora in relation of *Salmonella enteritidis* colonization. *Avian Pathology*, 31: 40-9-58.

- Fernández M.F., Boris S. & Barbes C. (2003).** Probiotic properties of human *Lactobacilli* strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 94 (3): 449-55.
- Filho A.E.L., Higgings S.E., Gaona G., Golfeuden A.D., Telles G. & Hargis B.M. (2007).** Ability of bacteriophages isolated from different sources to reduce *Salmonella enterica* serovar Enteritidis *in vitro* and *in vivo*. *Poultry Science*, 86: 1904-1909.
- Filho R.L.A., Sampaio H.M., Barros M.R., Gratao P.R., Cataneo A. (2003).** Use of cecal microflora cultured under aerobic and anaerobic conditions in the control of experimental infection of chicks with *Salmonella* Enteritidis. *Veterinary Microbiology*, 92: 237–244.
- Floch M. H., Binder H.J., Filburn B. & Gershengoren W. (1972).** The effect of bile acids on intestinal microflora. *American Journal of Clinical Nutrition*, 25: 1418-1426.
- Flores T.N.E., François Z.N. & Felicite T.M. (2010).** Immune system stimulation in rats by *Lactobacillus* sp. isolates from Raffia wine (*Raphia vinifera*). *Cellular Immunology*, 260 (2): 63-5.
- Florez A.V., Delgado S. & Mayo B. (2005).** Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. *Canadian Journal of Microbiology*, 51: 51-8.
- Flynn S., van Sinderen D., Thornton G.M., Holo H., Nes I.F. & Collins J.K. (2002).** Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. *Microbiology*, 148 (4): 973-984.
- Forestier C., Champs C.D., Vatoux C. & Joly B. (2001).** Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: *in vitro* adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Research in Microbiology*, 152: 167-173.
- Forney L.J., Zhou X. & Brown C.J. (2004).** Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Current Opinion in Microbiology*, 7: 210-120.
- Forrest J.C., Aberle E.D., Hedrich H.B., Judge M.D. & Merkel R.A. (1975).** Principles of meat science. Freeman. San Francisco. California.
- Freter R. (1962).** *In vivo* and *in vitro* antagonism of intestinal bacteria against *Shigella flexnerii*. Inhibitory mechanisms. *Journal of Infectious Diseases*, 110: 38-46.
- Friend B. & Shahany K. (1984).** Antitumor properties of *Lactobacilli* and dairy products fermented by *Lactobacilli*. *Journal of Food Protection*, 47: 717-723.
- Frizzo L.S., Soto L.P., Bertozz I.E., Sequeira G., Marti L.E. & Rosmini M.R. (2006).** Evaluación *in vitro* de las capacidades probióticas microbianas orientadas al diseño de

inóculos probióticos multiespecie para ser utilizados en la crianza de terneros. Revista FAVE-Ciencias Veterinarias, 5: 1-2.

- Froning G.W. & Uijttenboogaart T.G. (1999).** Effect of post mortem electrical stimulation on color, texture, pH, and cooking loss of hot and cold deboned chicken breast meat. Poultry Science, 67 (11): 1536-1544.
- Fujiwara S., Hashiba H., Hirota, T. & Forstner, J.F. (1997).** Proteinaceous factor(s) in culture supernatant fluids of bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* to ganglio-tetraosyl-ceramide. Applied and Environmental Microbiology, 63: 506-512.
- Fukao M., Tomita H., Yakabe T., Nomura T., Ike Y. & Yajima N. (2009).** Assessment of antibiotic resistance in probiotic strain *Lactobacillus brevis* KB290. Journal of Food Protection, 6: 1923-1929.
- Fuller R. & Turvey A. (1971).** Bacteria associated with the intestinal wall of the fowl (*Gallus domesticus*). Journal of Applied Bacteriology, 34: 617-622.
- Fuller R. (1977).** The importance of lactobacilli in maintaining normal microbialbalance in the crop. British Poultry Scienca, 18: 85-94.
- Fuller R. (1989).** Probiotics in man and animals. A review. Journal of Applied Bacteriology, 66 (1): 365-378.
- Fulton R.M., Nersessian B.N. & Red W.M. (2002).** Prevention of *Salmonella enteritidis* infection commercial ducklings by oral chicken egg-derived antibody alone or combination with probiotics. Poultry Science, 81: 34-40.
- Gabriel I., Mallet S. & Sibille P. (2005).** La microflore digestive des volailles: facteurs de variation et conséquences pour l'animal. INRA Production Animale, 18 (5): 309-322.
- García R.J.A., Cantón R., García J., Elías S., Gómez-Lus M^a Luisa, Martínez L.M. & Gast R. (2002).** *Salmonella* Infections. En: BW. Calnek et al (eds). Diseases of Poultry. 11th edition. The Iowa State University Press: Ames IA. :567-568. Horizon Scientific Press, England.
- García Y., López A. & Bocourt R. (2005).** Probióticos: una alternativa para mejorar el comportamiento animal. Revista Cubana de Ciencias Agrícolas, 39: 129-140.
- Garriga M., Pascual M.J. Monfort M. & Hugas M. (1998).** Selection of *Lactobacilli* for chicken probiotic adjuncts. Journal of Applied Microbiology, 84: 125-132.
- Garrity G.M., Bell J.A. & Lilburn T.G. (2004).** Taxonomic outline of the prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd Ed. Release 5: 190-195. Disponible en: <http://141.150.157.80/bergeysoutline>

- Gast R. K. (1994).** Understanding *Salmonella enteritidis* in laying chickens: the contributions of experimental infection. *Int Journal Food Microbiology*, 21: 107-116.
- Gast R.K. (2003).** Paratyphoid infections. En: Saif, Y.M. *Diseases of Poultry*. 11ª ed. Iowa State Press, 593-613.
- Gast R.K., Guraya R., Jones D.R. & Anderson K.E. (2013).** Colonización de los órganos internos por *Salmonella Enteritidis* en gallinas ponedoras infectadas experimentalmente y alojadas en jaulas convencionales o enriquecidas. *Poultry Science*, 92: 468-473.
- Geis A., Singh J. & Teuber M. (1983).** Potential of Lactic *Streptococci* to produce bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 205-211.
- Gevers D., Danielsen M., Huys G. & Swings J. (2003).** Molecular characterization of tet(M) genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 1270-1275.
- Gil T. (2013).** **El gallo indio de León: un caso único para la producción de plumas.** Jornadas Profesionales de Avicultura, León, España. Disponible en: <http://www.jornadasavicultura.com>.
- Gill A.O. & Holley R.A. (2006).** Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International Journal Food Microbiology*, 108: 1-9.
- Gilliland S.E. (1987).** Importance of bile tolerance in *Lactobacilli* used as dietary adjunct. En: *Biotechnology in the feed industry*. Lynos T.P. (Ed). Alltech Feed Co. Lexington, R.U.
- Gilliland S.E., Staley T.E. & Bush L.J. (1984).** Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *Journal of Dairy Science*, 67 (12): 3045-51.
- Goldin B.R. & Gorbach S.L. (1984).** Alterations of the intestinal microflora by diet, oral antibiotics, and *Lactobacillus*: decreased production of free amines from aromatic nitro compounds, azo dyes, and glucuronides. *Journal of the National Cancer Institute*, 73: 689-95.
- Goldin B.R. (1996).** The metabolic activity of the intestinal microflora and its role in colon cancer: *Nutrition Today*, 31: 24-27.
- Goldin B.R., Gorbach, S.L., Saxelin M., Barakat S., Gualtieri L. & Salminen S. (1992).** Survival of *Lactobacillus species* (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Digestive Diseases and Science*, 37: 121-128.
- Golender V.E. & Rozenblit A.B. (1985).** Logical and Combinatorial Algorithms for Drug Design. *Computational Biology & Chemistry*, 9 (4): 325.

- Gómez F.D. (2002).** Sensibilidad *in vitro* e *in vivo* de *Salmonellas* grupo D aisladas de pollitos de inicio de ponedoras. Tesis en opción al título de Master en Ciencia. Universidad de Granma. Cuba.kk
- González E.S., González V.R. & Lothar T.S. (1987).** Monografía. Aspectos técnico-económicos en la proyección de plantas químicas. Revista Centro Azúcar. UCLV. MES. Cuba.
- González H.M.Y. (2004).** Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de cuatro plantas del género *Stevia* y cuatro plantas del género *Mimosa*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.
- González L., Sandoval H., Sacristán N., Castro J.M., Fresno J.M. & Tornadijo M.E. (2007).** Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. Food Control, 18 (6): 716-722.
- Gorbach S. & Goldin B. (1990).** The intestinal microflora and the colon cancer connection. Reviews of Infections Diseases, 12: 252-261.
- Gordon M.D. & O'Brien L.C. (2006).** Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *E. coli*. Microbiology, 152: 3239-3244.
- Gordon R.F. (1964).** Salmonellosis en aves. Informe del primer curso de capa. Citación en Patología avícola para países latinoamericanos. FAO - 7 México, GF: 20- 40.
- Goren E., de Jong W.A., Doornenbal P., Bolder N.M., Mulder R.W. & Jansen A. (1988).** Reduction of *Salmonella* infection of broilers by spray application of intestinal microflora: A longitudinal study. Veterinary Quarterly, 10 (4): 249-255.
- Goren E., de Jong W.A., Doornenbal P., Koopman J.P. & Kennis H.M. (1984).** Protection of chicks against *Salmonella* infection induced by spray application of intestinal microflora in the hatchery. Veterinary Quarterly, 6 (2): 73-79.
- Granato D., Perotti F., Masserey I., Rouvet M., Golliard M., Servin A. & Brassart D. (1999).** Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells. Applied and Environmental Microbiology, 65: 1071-1077.
- Grande M.J., Lucas R., Abriouel, H., Valdi-via E., Omar N. Ben. Maqueda M., Martínez-Bueno M. & Martínez-Cañamero A. (2006).** Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48. Journal of Food Microbiology, 106 185-194.
- Greene J. D. & Klaenhammer T.R. (1994).** Factors involved in adherence of *Lactobacilli* to human Caco-2 cells. Applied and Environmental Microbiology, 60: 4487-4494.
- Grillo M., Lengomin M.E., Caballero A., Castro A. & Hernandez A.M. (1996).** Análisis de las enfermedades transmitidas por alimentos en Cuba. Revista Cubana de Alimentación y

Nutrición, 10 (2). Disponible en: http://www.bus.sld.cu/revistas/ali/vol10_2_96/ali07296.htm. Acceso: 1/4/2014.

- Grossowics N., Kapland D. & Schnerson S. (1947).** Production of an antibiotic substance by a *Lactobacillus*. International Congress of Microbiology. Río de Janeiro, Brasil.
- Guarner F. & Malagelada J. R. (2003).** Gut flora in health and disease. *Lancet*, 360: 512-519.
- Gueimonde M., Sánchez B., de Los Reyes-Gavilán C.G. & Margolles A. (2013).** Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 6: 202.
- Guerra B., Sotto S., Cal S. & Mendoza M.C. (2000).** Antimicrobial resistance and spread of Class I integrons among *Salmonella* serotypes. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 44: 2166-2169.
- Guillot J.F. (2003).** Probiotic feed additives. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 26: 52-55. Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics/en/.
- Guillot J.F., Jule S. & Ivore P. (1990).** Effects of strain of *Bacillus* used as probiotics against *Salmonella* carriage and experimental coccidiosis in chicks. *Microecology and therapy*, 20: 19-22.kk
- Gunther K. (1995).** *The role of probiotics as feed additives in animal nutrition*. Gottingen. Germany: Department of Animal Physiology and Animal Nutrition. kk
- Gupta P.K., Mital B.K. & Garg S.K. (1996).** Characterization of *L. acidophilus* strains for use as dietary adjunct. *International Journal of Food Microbiology*, 29: 105-109.
- Gusils C., González S.N. & Oliver G. (1999).** *Lactobacilli* isolated from chicken intestines: potential use as probiotics. *Journal Food Protection*, 62: 252-256.
- Gusils C., Oppezzo O., Pizarro R. & Gonzalez S. (2003).** Adhesion of probiotic *Lactobacilli* to chick intestinal mucus. *Canadian Journal of Microbiology*, 49: 472-478.
- Gutierrez C., Disney M. & Jose L. (2007).** Evaluacion de la calidad del agua (microbiologica y fisicoquimica) en pollos de engorde con peróxido de cloro. Bogota D.C.kk
- Hall R.M. (2010).** *Salmonella* genomic islands and antibiotic resistance in *Salmonella enterica*. *Future Microbiology*, 5 (10): 1525-38.
- Hall W.J. (1964).** Tifoidea en la gallina, En: *Enfermedades de las Aves*. (Eds.: Biester C. Schwarte M. Uthea, México: 252-275.
- Hamilton-Miller J.M. & Shah S. (1998).** Vancomycin susceptibility as an aid to the identification of *Lactobacilli*. *Letters in Applied Microbiololy*, 26 (2): 153-4.

- Hamman L., El-Samalouti V., Turner A.J., Flad H.D. & Rietschel E.T. (1998).** Components of gut bacteria as immunomodulators. *International Journal of Food Microbiology*, 41: 141-154.
- Han I.K., Lee S.C., Lee J.H., Kim J.D., Jun P.K. & Lee J.C. (1984).** Study on the changes in the microbial flora of the feces and intestinal contents of the broilers chicks. *Korean Journal Animal Science*, 26: 158-165.
- Hardie J. (1992).** Genus *Streptococcus rosenbach* 1984. 22. In *Bergey's Manual of determinative Bacteriology (Vol.2)* Sneath P.H.A., Wuliams & Wilkis (Eds.). Baltimore, EE.UU.: 1043-1047.
- Havenaary R. & Husis In't Veld J.H.C. (1992).** Probiotics a general view: The lactic acid bacteria. En: *The Acid Lactic Bacteria in Health and Disease*. Wood B.J.B. (Ed.). Elsevier Applied Science. Essex, R.U.: 151-170.
- Hawkey P.M. (2000).** Mechanisms of resistance to antibiotics. *Intensive Care Medicine*, 26: 9-13.
- Hedouin V., Neut C., Lescut D., Rambaud J. & Colombel J. (1995).** Bacterial translocation of endogenous bacteria. *Gastroenterology and Clinical Biology*, 19: 393-401.
- Hernández-Briz V.F. (1991).** La perdiz roja. Ministerio de la agricultura pesca y alimentación. Dirección general de investigación y capacitación agrarias. Servicio de extensión agraria. Madrid, España.
- Hess J. (1997).** Aditivos en el agua para pollos de engorde. *Industria Avícola*, 10: 28-29.
- Higgins J.P., Higgins S.E., Wolfenden A.D., Henderson S.N., Torres-Rodríguez A., Vicente J.L., Hargis, B.M. & Téllez G. (2010).** Effect of lactic acid bacteria probiotic culture treatment timing on *Salmonella enteritidis* in neonatal broilers. *Poultry Science*, 89 (2): 243-247.
- Higgins S.E., Erf G.F., Higgins J.P., Henderson S.N., Wolfenden A.D., Gaona-Ramirez G. & Hargis B.M. (2007).** Efecto del tratamiento probiótico en pollos de engorde sobre el número de macrófagos intestinales y la fagocitosis de *Salmonella enteritidis* por células abdominales exudadas. *Poultry Science*, 86 (11): 2322-2326.
- Higgins S.E., Higgins J.P., Wolfenden A.D., Henderson S.N., Torres-Rodríguez A., Tellez G. et al. (2008).** Evaluation of a *Lactobacillus*-based probiotic culture for the reduction of *Salmonella enteritidis* in neonatal broiler chicks. *Poultry Science*, 87 (1): 27-31.
- Hofacre C.L., Froyman R., Gautrias B., George B., Goodwin M.A. & Brown J. (1998).** Use of Aviguard and other intestinal bioproducts in experimental *Clostridium perfringens*-associated necrotizing enteritis in broiler chickens. *Avian Diseases*, 42: 579-584.

- Hofacre C.L., Primm N.D., Vance K., Goodwin M.A., Mark A.G. & Brown J. (2000).** Comparison of a lyophilized chicken-origin competitive exclusion culture, a lyophilized probiotic and fresh turkey cecal material against *Salmonella* colonization. *Applied Poultry Science*, 9: 195.
- Holt J., Krieg N., Sneath P., Spaley J. & Williams F. (1994).** *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th Ed. Baltimore, EE.UU.: 565-570.
- Holzapfel W.H., Haberer P., Geisen R., Bjorkroth J. & Schillinger U. (2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 365–373.
- Hood S.K. & Zottola E.A. (1988).** Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *Journal of Food Science*, 53: 1514 -1516.
- Hoop R.K. & Popischil A. (1993).** Bacteriological, serological, histological and immunohistochemical findings in laying hens with acquired *Salmonella enteritidis* phage type 4 infection. *Veterinary Record*, 133: 391-393.
- Huerta B.F., Ponsa G., Ordoñez N., Fernández Y.P. & Peñalver P. (2005).** estudio de la eficacia de aceites esenciales ante una infección experimental de *Salmonella enteritidis* en gallinas ponedoras en producción. XLII Symposium de Avicultura Científica. Cáceres. España.
- Humphrey T. (2004).** *Salmonella*, stress responses and food safety. *Natural Revista Microbiology*, June 2 (6): 504-9.
- Huys G., D'Haene K., Danielsen M., Matto J., Egervarn M. & Vandamme P. (2008).** Phenotypic and molecular assessment of antimicrobial resistance in *Lactobacillus paracasei* strains of food origin. *Journal of Food Protection*, 71: 339-344.
- International Organization For Standardization (ISO) (2002).** ISO 6579: (Annex D) Detection of *Salmonella spp.* in animal faeces and in samples of the primary production stage. Horizontal method for the detection of *Salmonella spp.*, International Organization for Standardization, 1, rue de Varembé. Case postale 56 CH-1211 Geneva 20. Switzerland. kk
- Izada D. & Silveira E.A. (1991).** Programa para el cálculo de la MCI/ 50-90 y MCB/ 50-90. UCLV. Cuba.
- Jadamus A., Vahjen W. & Simon O. (2001).** Growth behaviour of spore forming probiotic strain in the gastrointestinal broiler chickens and piglets. *Archiv Tierernahr*, 54: 1.
- Jamuna M. & Jeevaratnam K. (2004).** Isolation and characterization of *Lactobacilli* from some traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocins. *Journal of General Applied Microbiology*, 50: 79-90.

- Jangho-Hyuk, Annsung-Ho, Deokkim Myung, Whakim Chan. (2008).** Use of hydrogen peroxide as an effective disinfectant to *Actinobacillus ureae*. *Process Biochem* 43: 225-228.
- Jaramillo D. (2010).** Evaluación de la producción de bacteriocinas a partir de *Lactobacillus* y bifidobacterias. Universidad de Los Andes, Facultad de Ingeniería. Bogotá, Colombia. Disponible en: http://www.rvcta.org/Publicaciones/Vol1Num2/ArchivosV1N2/Jaramillo-Giraldo_et_al._RVCTA-V1N2.pdf
- Jay J. M. (1997).** *Modern food Microbiology*. 5th Ed. Chapman & Hall, New York, EE.UU.
- Jay J.M. (2000).** *Microbiología moderna de los alimentos*. 4^a Ed. Acribia. Zaragoza, España.
- Jeffrey J.S. (1999).** Use of competitive exclusion products for poultry. *Poult. Fact Sheet*. Cooperative Extension. University of California. No 30.
- Jimenez-Diaz R., Ruíz-Barba J.L., Cathcart D.P., Holo H., Nes I.F., Sletten K.H. & Warner P.J. (1995).** Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (12): 4459-63.
- Jiraphocakul S., Sullivan W.T. & Shahani, M.K. (1990).** Influence of dried *Bacillus subtilis* culture and antibiotics as performance and intestinal microflora in turkey. *Poultry Science*, (9): 1966-1973.
- Joerger M.C. & Klaenhammer T.R. (1986).** Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *Journal of Bacteriology*, 167: 439-446.
- Joerger R.D. (2003).** Alternatives to Antibiotics: Bacteriocins, Antimicrobial Peptides and Bacteriophages. *Poultry Science*, 82: 640-647.
- John D., Ruiz B., Suárez C.M. & Uribe C. (2006).** Susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de cepas de *Salmonella spp.* en granjas de ponedoras comerciales del departamento de Antioquia. *Revista del Colegio de Ciencias Pecuarias*, 19 (3): 297-305.
- Jonsson H., Strom E. & Roos S. (2001).** Addition of mucin to the growth medium triggers mucus-binding activity in different strains of *Lactobacillus reuteri* *in vitro*. *FEMS Microbiology Letters*, 204:19-22.
- Juneja V.K., y Davidson P.M. (1993).** Influence of Altered Fatty Acid Composition on Resistance of *Listeria monocytogenes* to Antimicrobials. *Journal of Food Protection*, 56 (4): 302- 305.

- Kaldhusdal M., Shneitz C., Hofshagen M. & Skjerve E. (2001).** Reduced incidence of *Clostridium perfringens* associated lesions and improved performance in broiler chickens treated with normal intestinal bacteria from adult fowl. *Avian Diseases*, 45: 149.
- Kandler O. & Weiss N. (1986).** Genus *Lactobacillus*. En: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2, Williams & Wilkins (eds.), Baltimore, EE.UU.: 1208-1234.
- Kandler O. & Weiss N. (1992).** Regular, non-sporing Gram-positive rods. En: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 10th Ed. Sneath P.H., Mair N.S., Sharpe M.E. & Holt J.G. (Eds.). Williams & Wilkins. Baltimore, EE.UU. : 1208-1235.
- Katikou P., Ambrosiadis I., Georgantelis D., Koidis P. & Georgakis S.A. (2005).** Effect of *Lactobacillus*-protective cultures with bacteriocin-like inhibitory substances producing ability on microbiological, chemical and sensory changes during storage of refrigerated vacuum packaged sliced beef. *Journal of Applied Microbiology*, 99: 1303-1313.
- Kerr A.K., Farrar A.M., Waddell L.A., Wilkins W., Wilhelm B.J., Bucher O., Wills R.W., Bailey R.H., Varga C., McEwen S.A. & Rajić A. (2013).** A systematic review-meta-analysis and meta-regression on the effect of selected competitive exclusion products on *Salmonella* spp. prevalence and concentration in broiler chickens. *Preventive Veterinary Medicine*, 111 (1/2): 112-125.
- Keverling-Buisman J.A. (1981).** Strategy in Drug Research. Proceedings of the 2nd. IUPAC-IUPHAR Symposium and Satellite Symposium on the Value of Predictions in Structure-activity Analysis. Noordwijkerhout. Elsevier.
- Kim J.S., Ingale S.L., Kim Y.W., Kim K.H., Sen S., Ryu M.H., Lohakare J.D., Kwon I.K. & Chae B.J. (2012).** Effect of supplementation of multi-microbe probiotic product on growth performance, apparent digestibility, cecal microbiota and small intestinal morphology of broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96, 618 – 626.
- Kim J.W., Siletzky R.M. & Kathariou S. (2008).** Hot ranges of *Listeria* -specific bacteriophages from the turkey processing plant environment in the United States. *Applied Environmental Microbiology*, 74: 6623-30.
- Kinsey C. (1981).** Use of microbial additives in feed: a literature review. *American Feed Industry Association. Nutrition Council Report*: 25-30.
- Klaenhammer T.R. & Kleeman E.G. (1981).** Growth characteristics, bile sensitivity, and freeze damage in colonial variants of *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 41: 1461-1467.
- Klaenhammer T.R. (1988).** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70: 337.
- Klaenhammer T.R. (1993).** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiological Reviews*, 12: 39-86.

- Klein G., Hallmann C., Casas I. A., Abad J., Louwers J. & Reuter G. (2000).** Exclusion of vanA, vanB and vanC type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 815-824.
- Knap I., Kehlet A. B., Bennedsen M., Mathis G. F., Hofacre C.L., Lumpkins B.S., Jensen M.M., Raun M. & Lay A. (2011).** *Bacillus subtilis* (DSM17299) significantly reduces *Salmonella* in broilers. *Poultry Science*, 90 (8): 1690-1694.
- Ko W.C., Yan J.J., Yu W.L., Lee H.C., Lee N.Y., Wang L.R. & Chuang Y.C. (2005).** A new therapeutic challenge for old pathogens: community-acquired invasive infections caused by ceftriaxone and ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* serotype choleraesuis. *Clinical Infectology Diseases*, 40: 315-318.
- Kociubinski G., Pérez P. De Antoni G. (1999).** Screening of bileresistance and bile of precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Food Protection*, 62: 905-912.
- Kodama R. (1952).** Estudios on lactic acid bacteria: Lactolin a new antibiotic substance produced by lactic acid bacteria. *Journal of Antibiotic*, 5: 72.
- Kolar M., Pantueek R., Bardoo J., Vagnerova I., Typovska H., Doskar J. & Valka I. (2002).** Occurrence of antibiotic-resistant bacterial strains isolated in poultry. *Veterinary Medicine - Czech*, 47: 52-59.
- Kollanoor Johny A., Baskaran S.A., Charles A.S., Amalaradjou M.A.R., Darre M.J., Khan M.I., Hoagland T.A., Schreiber D.T., Donoghue A. M., Donoghue D.J. & Venkitanarayanan K. (2009).** Prophylactic supplementation of caprylic acid in feed reduces *Salmonella Enteritidis* population in commercial broiler chicks. *Journal Food Protection*, 72: 722-727.
- Kollanoor Johny A., Hoagland T. A. & Venkitanarayanan K. (2010).** Effect of subinhibitory concentrations of plant-derived molecules in increasing the sensitivity of multi-drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 to antibiotics. *Foodborne Pathogens. Diseases*, 7: 1165-1170.
- Kollanoor Johny A., Mattson T., Baskaran S. A., Amalaradjou M. A. R., Darre M. J., Schreiber D. T., Khan M. I., Donoghue A. M., Donoghue D. J., & Venkitanarayanan K. (2012a).** Caprylic acid reduces *Salmonella Enteritidis* populations in various segments of digestive tract and internal organs of three- and six-week-old broiler chickens, therapeutically. *Poultry Science*, 91: 1686-1694.
- Kollanoor Johny A., Mattson T., Baskaran S. A., Amalaradjou M. A., Babapoor S., March B., Valipe S., Hoagland T., Darre M., Schreiber D., Khan M., Donoghue A., Donoghue D. & Venkitanarayanan K. (2012b).** Effect of plant-derived compounds,

trans-cinnamaldehyde and eugenol in reducing *Salmonella Enteritidis* colonization in 20-day-old broiler chickens. Applied Environmental Microbiology, 78: 2981-2987.

Kollanoor Johny A., Upadhyay A., Baskaran S. A., Upadhyaya I., Moyooottu S., Mishra N., Darre M. J., Khan M. I., Donoghue A. M., Donoghue D. J., & Venkitanarayanan K. (2012c). Effect of therapeutic supplementation of the plant compounds trans-cinnamaldehyde and eugenol on *Salmonella enterica* serovar Enteritidis colonization in market-age broiler chickens. Journal Applied Poultry Research, 21: 816-822.

Konstantinov S.R., Awati A.A., Williams B.A., Miller B.G., Jones P., Stokes C.R., Akkermans A.D., Smidt H. & de Vos W.M. (2006). Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. Environmental Microbiology, 8 (7): 1191-9.

Koščová J., Nemcová R., Gancarčíková S., Jonecová Z., Sciranková L., Bomba A. & Vuelca V. (2006). Effect of two plant extracts and *Lactobacillus fermentum* on colonization of gastrointestinal tract by *Salmonella enterica* var. Düsseldorf in chicks. Biología, 61 (6):775-778.

Kralik G., Milakovic Z. & Ivankovic S. (2004). Effect of probiotic supplementation on the performance and the composition of the intestinal microflora in broilers. Acta Agraria Kaposvariensis, 8 (20): 23-31.

Lamelas k., Mair G. & Beczkowski G. (2011). Boletín avícola: anuario 2010. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 61: 1-43.

Lammers K.M., Brigidi P., Vitali B., Gionchetti P., Rizzello F., Caramelli E., Matteuzzi D. & Campieri M. (2003). Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 38 (2): 165-172.

Lan Y., Verstegen M.W.A., Tamminga S. & Williams B.A. (2005). The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens. World's Poultry Science Journal, 61 (1): 95-104.

Lankaputra W.E.V. & Shah N.P. (1995). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* in the presence of acid and bile. Cultured Dairy Products Journal, 30: 2-7.

Lapierre L., Toro C. & San Martín B. (1997). Estudio de la resistencia a antimicrobianos en cepa *Enterococcus spp.*, aisladas de aves y cerdos de producción. Instituto de Salud Pública de Chile. Marathon 1000. Ñuñoa. Santiago de Chile, Chile: 56 (2).

Lara C. & Burgos Á. (2012). Potencial probiótico de cepas nativas para uso como aditivos en la alimentación avícola. Revista Colombiana de Biotecnología, XIV (1): 31-40.

- Lasa I., del Pozo J.L., Penadés J.R. & Leiva J. (2005).** Biofilms bacterianos e infección. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 28 (2): 163-175.
- Lastras P. (2009).** Probióticos, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum*, Suplementos nutricionales. *Salud BIO*, 12. Disponible en: <http://saludbio.com/articulo/suplementos/probioticos-lactobacillus-acidophilus-bifidobacterium-bifidum>
- Laudanno O., Vasconcelos L., Catalana J. & Cesolari J. (2006).** Anti-inflammatory effect of bioflora probiotic administered orally or subcutaneously with live or dead bacteria. *Digestive Diseases Science*, 51: 2180-2183.
- Laurencio M., Pérez M., Piad R., Milián G., Rondón A.J. & Díaz M. (2005).** Actividad probiótica de una mezcla de exclusión competitiva en indicadores microbiológicos en pollos de ceba. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5 (1): 48-53.
- Laurencio M., Pérez M., Piad R.E., Milián G. & Rondón A.J. (2002).** Determinación del contenido de bacterias ácido lácticas y *Bacillus* del TGI de pollos de ceba y obtención de una mezcla de exclusión competitiva. *Revista Cubana de Ciencia Avícola*, 26: 17-22.
- Law B.A. & Kolstad J. (1983).** Proteolytic systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49: 225-245.
- Lebeer S., De Keersmaecker S.C., Verhoeven T.L., Fadda A.A., Marchal K., & Vanderleyden J. (2007).** Functional analysis of luxS in the probiotic strain GG reveals a central metabolic role important for growth and biofilm formation. *Journal Bacteriology*, 189: 860-871.
- Lebman D.A. & Edmiston J.S. (1999).** The role of TGF- β in growth, differentiation, and maturation of B lymphocytes. *Microbes and Infection*, 1 (15): 1297-1304.
- Leclercq R. & Courvlin P. (1997).** Resistance to glucopeptides in enterococci. A review. *Clinical Infectious Diseases*, 24: 545-546.
- Lee K., Lillehoj H.S. & Siragusa G.R. (2010).** Direct-fed microbials and their impact on the intestinal microflora and immune system of chickens. *Journal of Poultry Science*, 47 (2): 106-114.
- Levean J.Y. & Bouix M. (2000).** Microbiología industrial: los microorganismos de interés industrial. Acribia. Zaragoza, España.
- Levy B. (1998).** La resistencia contra los antibióticos. *Investigación y Ciencia*, 14.
- Lillehoj E.P., Yun C.H. & Lillehoj H.S. (2000).** Vaccines against the avian enteropathogens *Eimeria*, *Cryptosporidium* and *Salmonella*. *Animal Health Research Review*, 1: 47-65.

- Lima E.T. & Andreatti R.L. (2005).** Bacteriocins: nomenclature, detection, mechanism of action and potential use in poultry production. *International Journal of Food, Agriculture & Environment*, 3 (2): 62-66.
- Lima E.T., Andreatti Filho R.L., Okamoto A.S., Noujaim J.C., Barros M.R. & Crocci A.J. (2007).** Evaluation *in vitro* of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 7 (2): 103-107.
- Lin C.F., Fung C.F., Wu C.L. & Chung T.C. (1996).** Molecular characterization of a plasmid-borne (pTC82) chloramphenicol resistance determinant (cat-Tc) from *Lactobacillus reuteri* G4. *Plasmid*, 36: 116-124.
- Liong M.T. & Shah N.P. (2005).** Acid and bile tolerance and cholesterol removability of *Lactobacilli* strains. *Journal of Dairy Science*, 88: 55-66.
- Lister S.A. & Barrow P. (2008).** Enterobacteriaceae (Chapter 8). In *Poultry Diseases*. 6th Ed. Pattison et al., Eds. Elsevier, Edinburgh: 110-145.
- Llop A. (2002).** Antimicrobial resistance and antimicrobial surveillance in Cuba. In: Salvatierras-González & R. Benguigui. *Antimicrobial resistance in the Americas. Magnitudes and containment of the problem*. Washintong. DC. Pan American Health Organization: 111-118.
- Lucchini F., Kmet V., Cesena C., Coppi L., Bottazzi V. & Morelli L. (1998).** Specific detection of a probiotic *Lactobacillus* strain in faecal samples by using multiplex PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 158: 273
- Lucier T.S., Heitzman K., Liu S.K. & Hu P.C. (1995).** Transition mutations in the 23S rRNA of erythromycin resistant isolates of *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39: 2770-2773.
- Lutful Kabir S.M. (2010).** Avian colibacillosis and salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *International Journal Environmental Research & Public Health*, 7: 89-114.
- Lyons P. (1997).** Opinán los hombres del negocio. *Avicultura profesional*, 15 (7):22
- Ma L., Deitch E., Specian E., Steffen E. & Berg R. (1990).** Traslocation of *Lactobacillus murinus* from the gastrointestinal tract. *Current Microbiology*, 20: 177-184.
- Ma Y.L., Xu Z.R. & You P. (2004).** Adhesion of some bacteria to broiler intestinal mucus. *ACTA Microbiologica Clinica*, 44: 361-364.
- Maassens C.B., van Holten-Neelsen C., Balk F., den Bak-Glashon M.J., Leer R.J., Larram J.D., Boerssma W.J. & Claasen E. (2000).** Strain dependent induction of cytoquinine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. *Vaccine*, 18 (23): 2613-23.

- Macfarlane S. & Dillon J.F. (2007).** Review: Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 102 (5): 1177-1436.
- Madden D. (2009).** Antibiotic resistance in *E. coli* A practical investigation of bacteria conjugation. National Centre for Biotechnology Education (NCBE). University of Reading, R.U.
- Madigan M.T., Martinko J.M. & Parker J. (2004).** *BROC Biología de los microorganismos*. 10ª ed. Prentice Hall. Madrid. España.
- Magnet S. & Blancahrd J. (2005).** Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chemical Reviews*, 105: 477-497.
- Majhenič A.C. & Matijašič B.B. (2001).** Antibiotics influence on lactic acid bacteria inhabiting gastrointestinal tract. *Mljekarstvo*, 6: 119-134.
- Majowicz S.E., Musto J., Scallan E., Angulo F.G., Kiri M., Ó'Brien S.J., Jones T.F., Fazil A. & Hoekstra R.M. (2010).** The global burden of nontyphoidal *Salmonella gastroenteritis*. *Clinical Infectious Diseases*, 50: 882-889
- Mantilla J. & Pulido M. (2010).** Valoración de la situación actual de explotaciones de ponedoras comerciales con cuadros compatibles con Tifoidea Aviar en Colombia. Tesis Maestría: Posgrado en Salud y Producción Animal. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional de Colombia.
- Mantilla L.C & Burgos P.A. (2012).** Potencial probiótico de cepas nativas para uso como aditivos en la alimentación avícola. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XIV (1): 31-40.
- Marcos Balciunas E., Castillo Martinez F.A., Dimitrov S.T., Gombossy de Melo Franco B. D. & De Souza Oliveira R.P. (2013).** Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 32: 134 - 142.
- Marshall B.M., Ochieng D.J. & Levy S.B. (2009).** Commensals: underappreciated reservoir of antibiotic resistance. *Microbes*, 4: 231-238.
- Marteau P., Minekus M., Havenaar R. & Huis in't Veld J.H. (1997).** Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *Journal of Dairy Science*, 80 (6): 1031-7.
- Mathur S. & Singh R. (2005).** Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria a review. *International Journal of Food Microbiology*, 105: 281-95.
- May K. (1988).** Las publicaciones sobre el peligro por Salmonelosis aviares son exageradas. *Selecciones Avícolas*, 30 (1): 18 -19.
- McCartney A.L. (2002).** Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *British Journal of Nutrition*, 88 (suppl. 1): 29-37.

- McDonald L.C, Fleming H.P. & Hassan H.M. (1990).** Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. Applied Environmental Microbiology, 56: 2120-2124.
- Mead G.C. (2000).** Prospects for competitive exclusion treatment to control *Salmonella* and other food borne pathogens in poultry. Veterinary Journal, 159 (2): 111-123.
- Meijerhof R., & Hulet R.M. (1997).** *In ovo* injection of competitive exclusion culture in broiler hatching eggs. Journal of Applied Poultry Research, 6: 260-266.
- Mejía R.J.A., Chacón R. Zarack, Guerrero C.B., Otoniel R. J. & López C.G. (2007).** Obtención de cepas de *Lactobacillus*. Caracterización *in vitro* como potenciales probióticas. Revista Científica de Maracaibo, 17 (2): 178-185.
- Melling U. (1989).** *Salmonella enteritidis* in the U.K. Poultry International, 72-76.
- Menconi A., Wolfenden A.D., Shivaramaiah S., Terraes J.C., Urbano T., Kuttel J., Kremer C., Hargis B.M. & Tellez G. (2011).** Effect of lactic acid bacteria probiotic culture for the treatment of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in neonatal broiler chickens and turkey poults. Poultry Science, 90 (3): 561-565.
- Mendoza G.P., López G.L.K. & Escudero A.B.I. (2004).** Efecto de la combinación de nisina, pediocina y ácido láctico sobre patógenos en alimentos. Revista Salud Pública y Nutrición, 4.
- Mendoza R. (2001).** Fermentación de las excretas porcinas y su reciclaje en la alimentación de cerdos. Tesis doctoral. Universidad Agraria de La Habana, Cuba.
- Messaoudi S., Kergourlay G., Rossero A., Ferchichi M., Prévost H., Drider D., Manai M. & Dousset X. (2011).** Identification of *Lactobacilli* residing in chicken ceca with antagonism against *Campylobacter*. International Microbiology, 14: 103-110.
- Messens W. & De Vuyst L. (2002).** Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs: a review. International Journal of Food Microbiology, 72: 31- 43.
- Metchnikoff E. (1908).** Prolongation of life. G.P. Putnam's Sons. New York, EE.UU.
- Midilli M., Alp N. & Kocabağlı. (2008).** Effects of dietary probiotic and prebiotic supplementation on growth performance and serum IgG concentration of broilers. University of Abant İzzet Baysal, Mudurnu Süreyya Astarçı Vocational School of Higher Education. Department of Poultry Science, Bolu. Turkey.
- Mikolajcik E. & Hamdam I. (1975).** *Lactobacillus acidophilus* its growth characteristic and metabolic products. Culture Dairy Production, 10: 10.
- Milián G. (2005).** Empleo de probióticos a base de *Bacillus sp* y sus endosporas en la producción avícola. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba. 16p.. Disponible en: <http://www.bibliociencias.cu/gsdll/collect/libros/index/assoc/HASH01b8.dir/do c.pdf>.

- Milián G. (2009).** Obtención de cultivos de *Bacillus spp.* y sus endosporas. Evaluación de su actividad probiótica en pollos (*Gallus gallus domesticus*). Tesis Doctoral. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba.
- Millette C., Dupont F., Shareck M.T., Ruiz D., Archambault & Lacroix M. (2008).** Purification and identification of the pediocin produced by *Pediococcus acidilactici* MM33, a new human intestinal strain. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 269-275.
- Miroslava M., Viola S., Klaudia B., Andrea L., Sona G. (2004).** Effect of probiotic activity of *Enterococcus faecium* EE3 strain against *Salmonella* infection in Japanese quails. *Bulletin veterinary institute pulawy*, 48 (3): 387-390.
- Mitsui K., Yasui H., Nakamura N. & Kanazawa H. (2005).** Oligomerization of the *Saccharomyces cerevisiae* Na⁺/H⁺ antiporter Nha1p: Implications for its antiporter activity. *Biochimica Biophysica Acta*, 1720: 125-136.
- Mitsuoka T. (1992).** The human gastrointestinal tract. En: *The lactic acid bacteria in health and disease. The lactic acid bacteria.* Wood B.J.B. Ed. Elsevier Applied Science, New York, EEUU.: 69-114.
- Mohankumar A. (2011).** Characterization and antibacterial activity of bacteriocin producing *Lactobacillus* isolated from raw cattle milk sample. *International Journal of Biology*, 3: 128-143.
- Monroy M.C., Castro T., Fernández P.F.J. & Mayorga R.L. (2009).** Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. Disponible en: http://www.academia.edu/1534199/Revision_bibliografica_Bacteriocinas_producidas_por_bacterias_probioticas
- Monteagudo A. (2010).** Selección *in vitro* de microorganismos con potencial probiótico. Tesis doctoral. Universidad de León.
- Montville T.J. & Winkowski K. (1997).** Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. En: *Food microbiology, fundamentals and frontiers.* Doyle, M.P., Beuchat, L.R. & Montville, T.J. (Eds). ASM Press. Washington D.C., EE.UU.: 557-577.
- Mooijman K.A. (2004).** The use of semisolid media for the detection of *Salmonella spp.* in poultry faeces and other matrices. Working document ISO/TC34 SC9 N681 annex 1.
- Moreno B.G. (1962).** Enfermedades de las aves en las explotaciones modernas. Acribia. Zaragoza, España: 58-74.
- Motta S.A. & Brandelli A. (2008).** Evaluation of environmental conditions for production of bacteriocin-like substance by *Bacillus sp.* strain P34. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 641-646.

- Mountzouris K.C., Balaskas C., Xanthakos I., Tzivinikou A. & Fegeros K. (2009).** Effects of a multi-species probiotic on biomarkers of competitive exclusion efficacy in broilers challenged with *Salmonella* Enteritidis. *British Poultry Science*. 50 (4): 467-478.
- Mountzouris K.C., Tsitrsikos P., Palamidi I., Arvaniti A., Mohnl M., Schatzmayr G. & Fegeros K. (2010).** Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. *Poultry Science*, 89 (1): 58-67.
- Mulder R. (1996).** Probiotics and competitive exclusion microflora against *Salmonella*. *World Poultry*, May: 30-32.
- Muriana P.M. (1996).** Bacteriocin for control of *Listeria spp.* in food. *Journal of Food Protection*, 56: 54-63.
- Murry A., Hinton A. & Morrison H. (2004).** Inhibition of Growth of *E. coli*, *Salmonella Typhimurium*, and *Clostridium perfringens* on Chicken Feed Media by *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Poultry Science*, 3 (9): 603-607.
- Musikasang H., Tani A., H-Kittikun & Maneerat S. (2009).** Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. *World Journal of Microbiology and Biochemistry*, 25: 1337-1345.
- Nagafuchi S., Takahashi T., Yajuna T., Kumata T., Hirayama K. & Itoh K. (1999).** Strain dependency of immunopotentiating activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Bioscience & Biotechnology*, 63 (3): 474-479.
- Naheeda K. (1997).** La nueva faceta de la Nutrición. *Avicultura Profesional*, 15: 37.
- Nakano T., Shimuzu M. & Fukushima (1999).** Effects of a probiotic on the lipid metabolism of pullet hen as a cholesterol- enriched diet. *Biotechnology and Biochemistry*, 63: 1569.
- Nava G. & Dávila M. (2004).** New perspectives in the selection and evaluation of probiotics. *Revista Chilena de Nutrición*, 21: 184-185.
- Nava J. (2008).** Evaluación de Bacterias Ácido Lácticas Comercializadas como Probióticas. Universidad de los Andes. Merida, Colombia.
- Nawaz M., Wang J., Zhou A., Ma C., Wu X., Moore J. E., Cherie B. & Xu J. (2011).** Characterization and transfer of antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented food products. *Current Microbiology*, 62: 1081-1089.
- Nazef L., Belguesmia Y., Tani A., Prévost H. & Drider D. (2008).** Identification of lactic acid bacteria from poultry feces: evidence on anti-*Campylobacter* and anti-*Listeria* activities. *Poultry Science*, 87: 329-334.

- Neal-McKinney J.M., Lu Xiaonan, Duong T., Larson C.L., Call D.R., Shah D.H., Konkel M.E. (2012).** Production of organic acids by probiotic *Lactobacilli* can be used to reduce pathogen load in poultry. PLoS ONE, 7 (9): 43928.
- Negwer M. (1987).** Organisch-chemische Arzneimittel und ihre Synonyma (eine internationale Übersicht). Organic-Chemical Drugs and Their Synonyms (an international review). Organic Drugs and their Synonyms Akademie-Verlag. Berlin. Germany.
- Nelson R.R. (1999).** Intrinsically vancomycin resistant gram-positive organisms: clinical relevance and implications for infection control. Journal of Hospital Infection, 42: 275-282.
- Nemcova R., Laukova A., Gancarcikova S. & Kastel R. (1997).** *In vitro* studies of porcine *Lactobacilli* for possible use. Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift, 110: 413.
- Nisbet D. (2002).** Defined competitive exclusion culturin the prevention of enteropathogen colonization in poultry and swine. Antoine van Leeuwenhock, 81-481.
- Nisbet D., Tellez G., Kogut M.H., Corrier D., Lowry V.,Hernández M.L., Deloach J.R. & Stanker L. (1998).** Effect of a competitive exclusion culture (CF3) on Mortality and horizontal transmission of *Salmonella gallinarum* in broiler chickens. Tektran. United States Department of Agriculture Research Service.
- Nithya K., Senbagam D., Senthilkumar B., Udhayashree N. & Gurusamy R. (2012).** Characterization of bacteriocin producing lactic acid bacteria and its application as a food preservative. African Journal of Microbiology Research, 6: 1138-1146.
- Nowroozi J., Mirzaii M. & Norouzi M. (2004).** Study of *Lactobacillus* as probiotic bacteria Iranian. Journal of Public Health, 33: 1-7.
- Nuotio L., Schneitz C., Halonen U. & Nurmi E. (1992).** Use of competitive exclusion to protect newly-hatched chicks against intestinal colonisation and invasion by *Salmonella enteritidis* PT4. British Poultry Science, 33 (4): 775-779.
- Ocaña V., Silva C. & Nader-Macías M.E. (2006).** Antibiotic susceptibility of potentially probiotic vaginal *Lactobacilli*. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology, 181-82.
- Ogawa M., Shimizu K., Nomoto K., Tanaka R., Hamabata T., Yamasaki S. Takeda T. & Takeda Y. (2001).** Inhibition of *in vitro* growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. International Journal of Food Microbiology, 68: 135-140.
- Ogunbanwo S., Sanni A. & Onilude A. (2003).** Influence of cultural conditions on the production of bacteriocina by *Lactobacillus brevis* OG1. African Journal of Biotechnology, 2 (7): 179-184.

- Ohgaki R., Nakamura N., Mitsui K. & Kanazawa H. (2005).** Characterization of the ion transport activity of the budding yeast Na⁺/H⁺ antiporter, Nha1p, using isolated secretory vesicles. *Biochemical and Biophysical Acta*, 1712: 185-196.
- OIE (2004).** Manual sobre animales terrestres. Cap. 210.14. *Listeria monocytogenes*. Madrid, España.
- OIE (2008).** Manual de la OIE sobre los animales terrestres Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.09.09.%20Salmonellos.pdf.
- Onifade A. (1997).** Growth performance, carcass characteristics, organ measurements and haematology of broiler chickens fed a high fibre diet supplemented with antibiotics or dried yeast. *Die Nahrung*, 41: 370-374.
- Ortiz D., Stpierre M., Abdulmessih A. & Arias I. (1997).** A yeast ATP binding cassette type protein mediating ATP-dependent bile acid transport. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 15358-15365.
- Osman M. Kamelia, Moussa I.M.I., Yousef A.M.M., Aly M.M., Radwan M.I. & Alwathnani H.A. (2010).** Pathogenicity of some avian *Salmonella* serovars in two different animal models: SPF-chickens and BALB/c mice. *Environmental We Inst. Journal Science Techology*, 5: 65-78).
- Ouba LII, Lei V. & Jensen L.B. (2008).** Resistance of potential lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials: determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 121: 217-224.
- Ouwehand A.C. (1993).** Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En: *Lactic Acid Bacteria*. Salminen S. & Von Wrigt A. (Eds). Marcel Dekker. New York, EE.UU.: 139-154.
- Ouwehand A.C., Kirjavainen P.V., Gronlund M.M., Isolauri E. & Salminen, S.J. (1999a).** Adhesion of probiotic microorganisms to intestinal mucus. *International Dairy Journal*, 9: 623-630.
- Ouwehand A.C., Kirjavainen P.V., Short, C. & Salminen C. (1999b).** Probiotics: mechanism and established effects. *International Dairy Journal*, 9: 43-52.
- Oyetayo V., Adetuyi F. & Akinyosoye F. (2003).** Safety and protective effect of *Lactobacillus acidophylus* and *Lactobacillus casei* used as probiotic agent *in vivo*. *African Journal of Biotechnology*, 2: 448-452.
- Ozawa K., Yabu-uchi K., Yamanaka K., Yamashita Y., Nomura S. & Oku I. (1983).** Effect of *Streptococcus faecalis* BIO-4R on intestinal flora of weanling piglets and calves. *Applied and Environmental Microbiology*, 45 (5): 1513-8.

- Papagianni M. (2003).** Ribosomally synthesized peptides and antimicrobial properties: Biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnology advances*, 21: 465-499.
- Parimal R., Dhillon H.L., Shivaprasad D.M., Shaberg D., Blandli S. & Jonson S. (2001).** Patogenicity of different serogroups of avian *Salmonella* in SPF chickens. *Avian Diseases*, 45: 922-937.
- Pascual M.H., Badiola M., Monfor J.I. & Garriga M. (1999).** *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella Enteritidis* colonization in chickens. *Applied Environmental Microbiology*, 65: 4981-4986.
- Patterson J.A. & Burkholder K.M. (2003).** Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Science*, 82: 627-631.
- Paul W., Van der Wielen J., Len J., Lipman F., Knapen J. & Biesterveld S. (2002).** Competitive Exclusion of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis by *Lactobacillus crispatus* and *Clostridium lactatifermentans* in a Sequencing Fed-Batch Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (2): 555-559.
- Peinado M.J., Ruiz R., Echávarri A. & Rubio L. A. (2012).** Garlic derivative propyl propane thiosulfonate is effective against broiler enteropathogens *in vivo*. *Poultry Science*, 91: 2148-2157.
- Pennacchia C., Ercolini D., Blaiotta G., Pepe O., Mauriello G. & Villani F. (2004).** Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Science*, 67: 309-317.
- Peña A. (2001).** Introducción en diseño, síntesis y caracterización de nuevos compuestos con actividad potencial sobre el SNC empleando el TOSSMODE. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Químicas Santa Clara. Cuba.
- Perdigón G., Álvarez S. & Pesce A. (1991).** Immunoadjuvant activity of oral *Lactobacillus casei*, influence of dose on the secretory immune response and protective capacity in intestinal infections. *Journal of Dairy Research*; 58: 485-496.
- Perdigón G., de Macias M., Álvarez, S., Oliver G. & de Ruíz Holgado A. (1986).** Effect of per-orally administered *Lactobacilli* on macrophage activation in mice. *Infection and Immunology*, 53: 404-410
- Pérez Conesa D. (2003).** Adición de probióticos y prebióticos a fórmulas infantiles y su efecto sobre la biodisponibilidad mineral. Tesis doctoral. Universidad de Murcia.
- Pérez M., Laurencio M., Rondón A.J., Milián G., Bocourt R. & Arteaga F. (2011).** Actividad antimicrobiana de una mezcla probiótica de exclusión competitiva y su estabilidad en el tiempo. *Revista de Salud Animal*, 33: 147.

- Perreten V., Schwarz F., Cresta L., Boeglin M., Dasen G. & Teuber M. (1997).** Antibiotic resistance spread in food. *Nature*, 389: 801-802.
- Philips I., Casewell M., Cox T., De Groot B., Friis C., Jones R., Nightingale C., Preston R. & Waddell J. (2004).** Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53: 28-52.
- Piñero R., Pérez M., Milián G., Laurencio M., Sánchez L., Medina E., Rondón A. & Samaniego L.M. (2005).** Efecto de un hidrolizado enzimático de *S. cerevisiae* en pollitas de reemplazo de ponedoras. Indicadores inmunológicos y hematológicos. *Revista Salud Animal*, 27 (2): 109-114.
- Piard J. & Desmazeaud M. (1991).** Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*, 71: 525-541.
- Pivnick H. & Nurmi E. (1982).** The Nurmi concept and its role in the control of *Salmonella* in poultry. In R. Davies (Ed.), *Developments in food microbiology*. 1: 41-70. Barking. Essex. England: Applied Science Publishers Ltd.
- Planas de la Torre A. (1979).** Microbiología especial veterinaria Tomo I: Texto básico de Microbiología II. Ed, ENPES, La Habana. 348-370. Pulawy, 48 (3): 387-390.
- Polotsky Y., Dragunsky E. & Khavkin T. (1994).** Morphological evaluation of the pathogenesis of bacterial enteric infections. *Critical Reviews in Microbiology*, 20: 161-208.
- Poppe C. (2000).** *Salmonella* infections in the domestic fowl. In: Wray C., Wray A. (Eds). *Salmonella* in domestic animal. CAB International, New York, USA, pp. 107-132.
- Poppe C., Martin L.C., Gyles C.L., Reid-Smith R., Boerlin P., Mcewen S.A., Prescott J.F. & Forward K.R. (2005).** Acquisition of resistance to extended-spectrum cephalosporins by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Newport and *E. coli* in the turkey poult intestinal tract. *Applied Environmental Microbiology*, 71: 1184-1192.
- Porter P., Noakes D.E. & Allen W.D. (1972).** Intestinal secretion of immunoglobulins in the preruminant calf. *Immunology*, 23: 299-305.
- Prasad J., Gill H., Smart J. & Gopal P.K. (1998).** Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotic. *International Dairy Journal*, 8: 993-1002.
- Prescott J., Baggot J. & Walter R. (2002).** *Terapéutica Antimicrobiana en Medicina Veterinaria*. 3ª ed. Intermédica. Buenos Aires, Argentina.
- Prescott L.M, Harley J.P. & Klein D.A. (1999).** *Microbiología*. 1ª ed. Mc Graw-Hill Interamericana. Zaragoza, España.
- Price R.J. & Lee J.S. (1970).** Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing *Lactobacilli*. *Milk Food Technology*, 33: 13-18.

- Pridmore R.D., Berger B., Desiere F., Vilanova D. Barreto C., Pittel A.C., Zwahlen M.C., Roulvet M., Altermann T., Arigoru F., Mollet B., Mer enier A., Kñaenhamme T., Arigoni R. & Shell M.A. (2004).** The genome secuence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus jonnsonii* . NCC 533. Proccedings of the National Academy of Sciences, 101: 2512-2517.
- Puig P., Espino Yamila H.M., Leyva C. V., Portela L., Machín N., Mayrin D. & Soto R.P. (2011).** Serovariedades y patrones de suceptibilidad a los antimicrobianos de cepas de *Salmonella* aisladas de alimentos en Cuba. Revista Panamericana de Salud Pública 30 (6).
- Qin S., Wang Y., Zhang Q., Chen X., Shen Z., Deng F., Wu C. & Shen J. (2012).** Identification of a novel genomic island conferring resistance to multiple aminoglycoside antibiotics in *Campylobacter coli*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 56 (10): 5332-9.
- Raibaud P., Ducluseau R. & Tancrede C. (1977).** L'effect de barrierdans le tubedigestifmoyen de défense de l'hotecontre bacteriesexogenes. Médecine et Maladies Infectieuses, 7: 130-134.
- Rakoff-Nahoum S., Paglino J., Eslami-Varzaneh F., Edberg S. & Medzhitov R. (2004).** Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. Cell, 118 (2), 229-241.
- Ramírez B.O., Zambrano S.Y., Ramírez P.Y., Rodríguez V.Y. & Morales M. (2005).** Evaluación del efecto probiótico del *Lactobacillus* sp. origen aviar en pollitas de inicio reemplazo de la ponedora comercial en los primeros 42 días de edad. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET, 8. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>
- Reddy G., Friend B., Shahani K. & Farm R. (1983).** Antitumor activity of yoghurt components. Journal of Food Protection, 46: 8-11.
- Rekhif N., Atrih A., & Lefebvre G. (1994).** Selection and Properties of Spontaneous Mutants of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 Resistant to Different Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria Strains. Current Microbiology, 28: 237-241.
- Reque E., Pandey A., Franco S. & SoccoL C. (2000).** Isolation, identification and physiological study of *Lactobacillus fermentum* lpb for use as probiotic in chickens. Brazilian Journal of Microbiology, 31: 303-307.
- Revolledo L., Ferreira A.J.P. & Mead G.C. (2006).** Prospects in *Salmonella* control: competitive exclusion, probiotics, and enhancement of avian intestinal immunity. Journal Applied Poultry Research, 15: 341-351.

- Revolledo L., Ferreira C.S. & Ferreira A.G. (2009).** Prevention of *Salmonella typhimurium* colonization and organ invasion by combination treatment in broiler chicks. Poultry Science, 88 : 734-743.
- Revolledo P. Liliana. (2012).** Salmonelosis en las aves: Parte II pullorosis y tifoidea aviar. Revista Actualidad Avipecuaria. Perú. Disponible en: <http://www.actualidadavipecuaria.com/articulos/salmonelosis-en-las-aves-parte-II-pulorosis-y-tifoidea-aviar.html>
- Reynolds D., Davis R., Richards M. & Wray C. (1997).** Evaluation of combined antibiotic and competitive exclusion treatment in broilers breeder flocks infected with *Salmonella enterica* serovar enteritidis. Avian Pathology, 26: 83.
- Rice L.B. (1998).** Tn916 family conjugative transposons and dissemination of antimicrobial resistance determinants. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 42: 1871-1877.
- Rivero E., González A. & Muro Y. (2006).** Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos: nuevo enfoque en su prevención. Revista ciencias.com. Disponible en: <http://www.revistaciencias.com/publicacionesEEVKpyAAVylgTpQmB.phpEEVKpuAAVylgTpcQwB>.
- Roberts M.C. (2005).** Update on acquired tetracycline resistance genes. FEMS Microbiology Letters, 245: 195-203.
- Robredo B., Torres C., Ruiz F. & Baquero F. (1997).** Evolution of vanA *Enterococcus* populations in faeces of newborn chickens receiving avoparcin and tylosin as food additives. 33rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington, D.C., EE.UU.
- Rodríguez E., Arqués J.L., Rodríguez R., Núñez M. & Medina M. (2003).** Reuterin production by *Lactobacilli* isolated from pig faeces and evaluation of probiotic traits. Letters in Applied Microbiology, 37 (3): 259-63.
- Rodríguez H., Salazar C.M. & Villalobos E.I. (2012).** *Lactobacillus spp.* del tracto intestinal de *Gallus gallus* con potencial probiótico. REBIOL Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú, 32 (2): 62-72.
- Rodríguez O., Perea J., Martínez Y., Fernández M., Padrón I. & Núñez de Villavicencio M. (2008).** Evaluación *in vitro* de resistencia de bacterias lácticas a la barrera gástrica y biliar de cerditos y a enterobacterias patógenas. Revista Computadorizada de Producción Porcina, 15 (3).
- Roe M.T., Vega E. & Pillai S.D. (2003).** Antimicrobial resistance markers of Class I and Class 2 integrons - bearing *E. coli* from irrigation water and sediments. Emerging Infectious Diseases, 9: 822-826.

- Rojas Muñoz J. (2010).** Bacteriocinas: unas estrategias de competencia microbiana propuesta como alternativa de antibióticos dirigidos para el futuro humano. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/36605372/Capitulo-03-Bacteriocinas>.
- Rolfe F.D. (2000).** The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal the probiotic bacteria: implications for human health. *Journal of Nutrition Health and Aging*, 130: 390-402.
- Rondón A.J. (2009).** Obtención de biopreparados a partir de lactobacilos autóctonos del tracto digestivo de pollos y evaluación integral de las respuestas de tipo probióticas provocadas en estos animales. Tesis Doctoral. Instituto de Ciencia Animal. Cuba.
- Rondón A.J., Samaniego L.M., Bocourt S., Rodríguez S., Milián J., Ranilla, M.J. & Laurencio M.P. (2008).** Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobillus sp.* procedente del tracto gastrointestinal de pollos de ceba. *Ciencia y tecnología alimentaria*, 6 (1): 56-63. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=72460108>
- Rondón Ana J. & Laurencio Marta (2008).** Utilización de las mezclas de exclusión competitiva en la avicultura moderna *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 42(1): 3-11. Instituto de Ciencia Animal. Cuba. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193015413001>
- Rondón Ana J., Ojito Yurién, Arteaga Fátima G., Laurencio Marta, Milián Grethel & Pérez Y. (2013).** Efecto probiótico de *Lactobacillus salivarius C 65* en indicadores productivos y de salud de cerdos lactantes. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 47 (4): 401-407. Instituto de Ciencia Animal. La Habana. Cuba.
- Ross S.J. & Jonson H. (2002).** A high molecular mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adherence to mucus components. *Microbiology*, 148: 433-442.
- Rostagno M.H., Hurd H.S., McKean J.D., Ziemer C.J., Gailey J.K. & Leite R.C. (2003).** Preslaughter holding environment in pork plants is highly contaminated with *Salmonella enterica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (8): 4489-94.
- Ruano J.P.M. (2009).** Salmonellosis y su Impacto en la Avicultura Moderna Department of Animal and Food Sciences. University of Delaware Newark. DE 19716-2150.
- Ruiz F. Griselda, Constantino C. F., Quintana L.J.A., Cedillo P.C. & Urquiza B. Odette (2008).** Patogenia de *Salmonella enteritidis* FT 13a y *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko en pollos de engorda *Veterinary México*, 39 (2).
- Ruiz-Larrea F., Rojo-Bezares B., Sáenz Y., Navarro L., Díez L., Zarazaga M. & Torres C. (2007).** Bacteriocinas para la estabilización microbiológica y reducción de la dosis de CO₂. *International Symposium in Microbiology and Food Safety of Wine: Microsafetywine*. Vilafranca del Penedés, Barcelona, España.

- Sadler W.W., Brownell J.R. & Fanelli M.J. (1969)** Influence of age and inoculum level on shed pattern of *Salmonella typhimurium* in chickens.
- Saito H., Tomioka H. & Soto K. (1981).** Enhanced resistance of *Lactobacillus* against *Listeria* infection in mice. *Medicine and Biology*, 102: 273-277.
- Salminen S., Deighton M.A. & Gorbach S.L. (1993).** Lactic acid bacteria in health and disease. En: *Lactic acid bacteria*. Salminen, S. & von Wright, A. Eds. Marcel Dekker Inc. New York, EE.UU.: 199-225.
- Salminen S., von Wright A., Morelli L., Marteau P., Brassart D., de Vos W.M., Fondén R., Saxelin M., Collins K., Mogensen G., Birkeland S.E. & Mattila-Sandholm T. (1998).** Demonstration of safety of probiotics: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 44 (1-2): 93-106.
- Saloff-Coste C. (1994).** Fermented milks: effects on the immune system. *Danone World Newsletter*, 9: 2-8.
- Samaniego L. & Sosa M. (2002).** *Lactobacillus spp.*: importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Centro de Estudios Biotecnológicos. Facultad de Agronomía. Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos". Matanzas, Cuba. Disponible en : <http://www.bibliociencias.cu/gsd/collect/libros/index/assoc/HASH011d/e18c5081.dir/doc.pdf>
- Samaniego L.M., Pérez M., Laurencio M., Milián G., Piad R.E., Rondón A.G., Medina E., Sánchez A.M. & Amigo S. (2004).** Comprobación de la actividad probiótica de una mezcla de exclusión competitiva sobre algunos indicadores productivos y microbiológicos del tracto digestivo del pollo de ceba. *Revista Cubana de Ciencias Avícolas*, 31: 59.
- Sánchez J.M. & Cardona C.N. (2003).** Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. *Asociación Colombiana Infectología*, 7: 22-29.
- Sánchez O.I. (2003).** Uso del permeado de suero suplementando en la producción de bacteriocinas y su aplicación en la bioconservación. Tesis de maestría. Universidad Autónoma del Estado de Querétaro, México.
- Sánchez P.A. (2010).** Enfermedades bacterianas de las aves. Capítulo 5. Pullorosis y tifosis. *Salud y producción de las aves*. Ed. Félix Varela. La Habana, Cuba: 242-247.
- Sandine W., Muralidhara K., Ellike P. & England D. (1972).** Lactic acid bacteria in food and health: a review with special reference to enteropathogenic *E. coli* as well as certain enteric diseases and their treatment with antibiotics and *Lactobacilli*. *Journal of Milk Food Technology*, 35: 691-702.

- Santillán M.A. (2004).** Aislamiento y caracterización de cepas bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México: 1-11.
- Santini C., Baffoni L., Gaggia F., Granata M., Gasbarri R., Di Gioia D. & Biavati, B. (2010).** Characterization of probiotic strains: An application as feed additives in poultry against *Campylobacter jejuni*. *International Journal of Food Microbiology*, 141: 98-108.
- Savadojo A., Ouattara C., Bassole I. & Traore A. (2006).** Bacteriocins and lactic acid bacteria: A minireview. *African Journal of Biotechnology*, 5: 678-683.
- Savage D.C. (1992).** Growth phase, cellular hydrophobicity, and adhesion *in vitro* of *Lactobacilli* colonizing the keratinizing gastric epithelium in the mouse. *Applied Environmental Microbiology*, 58: 1992-1995.
- Schneitz C. & Mead G.C. (2000).** Competitive exclusion in poultry. En: *Salmonella* in Domestic Animals. Wray & Wray Eds. CAB International, New York, EE.UU.
- Schillinger U. & Lucke F. (1989).** Antibacterial activity of *Lactobocilli sake* isolated from meat. *Applied Microbiology*, 55 (8): 1901-1906.
- Schleifer J. (1985).** A review of the efficacy and mechanism of competitive exclusion for the control of the *Salmonella* in poultry. *World Poultry Science Journal*, 41: 72-83.
- Schneitz C. (1992).** Research note: Automated droplet application of a competitive exclusion preparation. *Poultry Science*, 71 (12): 2125-2128.
- Schneitz C. (2005).** Competitive exclusion in poultry 30 years of research. *Food Control*, 16: 657-667.
- Schneitz C., Hakkinen M., Nuotio L., Nurmi E., & Mead G. (1990).** Droplet application for protecting chicks against *Salmonella* colonization by competitive exclusion. *Veterinary Record*, 126 (20): 510.
- Schoeni J.L. & Wong A.C.L. (1994).** Inhibition of *Campylobacter jejuni* colonization in chicks by defined competitive exclusion bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (4): 1191-1197.
- Schrezenmeir J. & De Vrese, M. (2001).** Probiotics, prebiotics and symbiotics: approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73 (2): 361-364.
- Severino P. & Magalhaes V.D. (2004).** Integrons as tools for epidemiological studies. *Clinical Microbiology Infections*, 10: 156-162.
- Shahany K., Vaquil J. & Kiler A. (1976).** Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus*. Isolation from *L. acidophilus*. *Culture Dairy Products Journal*, 12: 8.

- Sham K.J. Rather N.P., Hare R.S. & Miller G.H. (1993).** Molecular generating of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzyme. *Microbiology*, 57: 138-161.
- Shazali N., Foo H.L., Loh T.C., Choe D.W., & Rahim R.A. (2014).** Prevalence of antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from faeces of broiler chicken in Malaysia. *Gut Pathogens*, 6: 1.
- Shea K. & Committee on Environmental Health and Committee on Infectious Diseases. (2004).** Non-therapeutic Use of Antimicrobial Agents in Animal Agriculture: Implications for Pediatrics. *Pediatrics*, 114: 862-868.
- Sheil B., McCarthy J., O'Mahony L., Bennett M.W., Ryan P., Fitzgibbon J.J., Kiely B., Collins J.K. & Shanahan F. (2004).** Is the mucosal route of administration essential for probiotic function? Subcutaneous administration is associated with attenuation of murine colitis and arthritis. *Gut*, 53: 694-700.
- Shen-Qiu T., Xiao -Ying D., Chun-Mei, Jin-Jing P., Shau-Sha L. & Jin-Ding C. (2013).** Effects of *Bacillus subtilis natto* on growth performance in Muscovy duck. *Revista Brasileira Ciencias Avícolas*, 15 (3). Campinas. June/September.
- Shiva C. & Jara L.M. (2013).** Identificación y caracterización molecular de cepas nativas de *Lactobacillus* aisladas de material de cama de pollos de engorde. *Revista de investigaciones veterinarias*, 24 (3), Perú.
- Shivaprasad H.L. (2003).** Pullorum disease and fowl typhoid. En: Saif, Y.M. *Diseases of Poultry*. 11^a ed. Iowa State Press, 568-582.
- Sieo C.C., Norhani A., Tan W.S. & Ho Y.W. (2005).** Plasmid profiling and curing of *Lactobacillus* strains isolated from the gastrointestinal tract of chicken. *Journal of Microbiology*, 6: 251-256.
- Sifour M., Tayeb I., Haddar H., Namous H. & Aissaoui S. (2012).** Production and characterization of bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* F12 with inhibitory activity against *Listeria monocytogenes*. *The Online Journal of Science and Technology*, 2: 55-61.
- Sisson J.W. (1989).** Potential of probiotic organism to prevent diarrhoea and promote digestion in farm animals. A review. *Journal Science Food Agricultural*, 49: 1-13.
- Skrivanová Eva, Molatová Zuzana & Marounek Milan. (2009).** Effects of caprylic acid and triacylglycerols of both caprylic and capric acid in rabbits experimentally infected with enteropathogenic O103. *Veterinary Microbiology, Elsevier*, 126 (4): 372.
- Slutsker L. & Schuchat A. (1999).** Listeriosis in humans. En: *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Ryser, E.T. & Marth E.H. Eds. Marcel Dekker. New York, EE.UU.

- Snoeyenbos G.H. (1972).** Pullorum Disease. In: Diseases of Poultry 6th, 83-114.
- Snoey'ebos G.H. (1989).** Pathogenesis and control of *sabnoneua*, *Campylobacter* and *Listeria* in poultry. In: Proceeding of Avian enteric disease Symposium. AAAP/AVMA. Annual Meeting. Orlando. Florida: 1-6.
- Snoeyenbos G.H. (1994).** Avian salmonellosis. In: Handbook of Zoonoses, Second Edition. Beran G.W.. ed. CRC Press. Boca Raton. Florida. USA.
- Soerjadi A.S., Rufner R., Snoeyenbos G.H. & Weinack O.M. (1982).** Adherence of *Salmonella* and native gut microflora to the gastrointestinal mucosa of chicks. Avian Diseases, 26: 576.
- Soerjadi-Liem A.S., Snoeyenbos G.H. & Weinack O.M. (1984).** Comparative studies on competitive exclusion of three isolates of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in chickens by native gut microflora. Avian Diseases, 28: 139-146.
- Souza M.R. Moreira J.L., Barbosa F.H.F., Cerqueira M.O.P., Nunes, M., Álvaro C. & Nicolic J.R. (2007).** Influence of intensive and extensive breeding on lactic acid bacteria isolated from *Gallus gallus domesticus* ceca. Veterinary Microbiology, 120: 142-150.
- Spika J.S., Waterman S.H., Hoo G.W., ST Louis M.E., Pacer R.E., James S.M., Bissett M.L., Mayer L.W., Chiu J.Y. & Hall B. (1987).** Chloramphenicol-resistant *Salmonella* Newport traced through hamburger to dairy farms: A major persisting source of human salmonellosis in California. New England Journal of Medicine, 316: 565-70.
- Spring P., Wenk C., Dawson K. & Newman K. (2000).** The effects of dietary mannaoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of *Salmonella*-challenged broiler chicks. Poultry Science, 79: 205-211.
- Springer W.T. & Tumlin J.T. (1990).** *Salmonella enteritidis* and other paratyphoids relative significance in early chick performance. In: Proceedings IXth. International Congress of the World Veterinary Poultry Association. Brighton. England, 35.
- Stanchi O. (2007).** Microbiología Veterinaria. Primera Edición. Editorial Intermedica. Buenos Aires -República Argentina: 210 - 214.
- Steer T., Carpenter H., Tuohy K. & Gibson G.R. (2000).** Perspectives on the role of the human gut microbiota and its modulation by pro and prebiotics. Nutrition Research Reviews, 13: 229-254.
- Steidler L. (2003).** Genetically engineered probiotics. Best Practice & Research Clinical and Gastroenterology, 17 (5): 861-876.
- Stern N.J., Cox N.A., Bailey J.S., Berrang M.E. & Musgrove M.T. (2001).** Comparison of mucosal competitive exclusion and competitive exclusion treatment to reduce

Salmonella and *Campylobacter* spp. Colonization in broiler chickens. Poultry Science, 80: 156-160.

- Suárez J.E. & Mendoza M.C. (1991).** Plasmid encoded fosfomycin resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 35: 791-795.
- Svetoch E.A., Eruslanov B., Perelygin V.V.V., Mitsevich E.V., Mitsevich P. I., Borzenkov V., Levchuk N.V., Svetoch P.O.E., Kovalev Y.N., Stepanshin Y.G., Siragusa N.G., Bruce R.S. & Norman J.S. (2008).** Diverse Antimicrobial Killing by *Enterococcus faecium* E 50-52 Bacteriocin. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 56: 1942-1948.
- Sychrovae H., Ramírez J. & Peña A. (1999).** Involvement of Nha1 antiporter in regulation of intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology Letters, 171: 167-172.
- Tagg J., Dajani A. & Wannamaker L. (1976).** Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Bacteriological Reviews, 40: 722-756.
- Tanaka H., Doesburg K., Iwasaki T. & Mieran I. (1999).** Screening of lactic acid bacteria for bile salt hidrolase activity. Journal of Dairy Science, 82: 2530-2535.
- Tancrede O. and Raibaud P. (1978).** Abord écologique de la flore digestive. Un écosystème qui fait partie des moyens de défense anti-infectieux. Concours Médical, 100: 3889-3894.
- Tannock G.W., Dashkevitz M.P. & Feighner S.D. (1989).** *Lactobacilli* and bile salt hydrolase in the murine intestinal tract. Applied and Environmental Microbiology, 55: 1848-1851.
- Tannock G.W., Luchansky J.B., Miller L., Connell H., Thode-Andersen S., Mercer A.A. & Klaenhammer T.R. (1994).** Molecular characterization of a plasmid-borne (pGT633) erythromycin resistance determinant (ermGT) from *Lactobacillus reuteri* 100-63. Plasmid, 31: 60-71.
- Tellez G., Petrone V.M., Escorcía M., Morishita Ty., Cobb C.W. & Villaseñor L. (2001).** Evaluation on avian specific probiotic and *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* and *Salmonella Heidelberg*s specific antibodies on cecal colonization and organic invasion of *Salmonella enteritidis* in broilers. Journal Food Protection, 64: 287-291.
- Ten Brink B., Minekus M. & Huis J. (1987).** Production of antibacterial compounds by *Lactobacilli*. Microbiology Reviews, 46: 64.
- Teo A.Y. & Tan H. (2007).** Evaluation of the performance and intestinal gut microflora of broilers fed on corn-soy diets supplemented with *Bacillus subtilis* PB6 (CloSTAT). Journal of Applied Poultry Research, 16 (3): 296-303.

- Tersolo H.R. (2012).** Salmonelosis. Producción animal. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Balcarce. Argentina.
- Terzolo H.R. (2008).** Estrategias en Salmonelosis de las aves: Dónde estamos y hacia dónde deberíamos ir. Disponible en: <http://www.cadenaavicola.com.ar/Adjuntos/AMEVEA2008/TerzoloFinal.doc>.
- Teuber M., Meile L. & Schwarz F. (1999).** Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology*, 76: 115-37.
- Thaker M., Spanogiannopoulos P. & Wright G.D. (2010).** The tetracycline resistance. *Cellular and Molecular Life Science*, 67: 419-431.
- Thomson N.R., Clayton D.J., Windhorst D., Vernikos G. Davidson S., Churcher C., Quail M.A., Stevens Mark, Jones M.A., Watson M., Barron A., Layton A., Pickard D., Kingsley R.A., Bignell A., Clark L., Harris B., Ormond D., Abdellah Z., Brooks K., Cherevach I., Chillingworth T., Woodward J., Norberczak H., Lord A., Arrowsmith C., Jagels K., Moule S., Mungall K., Sanders M., Whitehead S., Chabalgoity J.A., Maskell D., Humphrey T., Roberts M., Barrow P.A., Dougan G. & Parkhill J. (2008).** Comparative genome analysis of *Salmonella Enteritidis* PT4 and *Salmonella Gallinarum* 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Research*, 18 (10): 1624-1637).
- Thumu S.C. & Halami P.M. (2012).** Presence of erythromycin and tetracycline resistance genes in lactic acid bacteria from fermented foods of Indian origin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 102 (4): 541-51.
- Timmermana H., Koningb C., Mulderc L. Romboutsd F. & Beynena A. (2004).** Monostrain, multistrain and multispecies probiotics A comparison of functionality and efficacy. *International Journal of Food Microbiology*, 96: 219- 233. **Tollefson L., Altekruise S.F. & Potter M.E. (1997).** Therapeutic antibiotics in animal feeds and antibiotic resistance. *Revue Scientifique Et Technique. International Office of Epizootics*, 16 (2): 709-715.
- Toba T., Yoshioka E. & Itoh T. (1991a).** Acidophilucin A, a new heat-labile bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* LAPT 1060. *Letters in Applied Microbiology*, 12: 106-108.
- Toba T., Samant S.K., Yoshioka E. & Itoh T. (1991b).** Reuterin 6, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus reuteri* LA 6. *Letters in Applied Microbiology*, 13: 281-286.
- Toba T., Yoshioka E. & Itoh T. (1991c).** Potential of *Lactobacillus gasseri* isolated from infant faeces to produce bacteriocins. *Letters in Applied Microbiology*, 12: 228-231.
- Toomey N., Bolton D. & Fanning S. (2010).** Characterization and transferability of antibiotic resistance genes from lactic acid bacteria isolated from Irish pork and beef abattoirs. *Research in Microbiology*, 6: 127-135.

- Torres C. & Zarazaga M. (2000).** Repercusión de los antibióticos usados en la alimentación animal sobre la salud humana. Disponible en: www.seq.es/seq/html/revista_seq/0198/rev1.html
- Tsai C.C., Hsieh H.Y., Chiu H.H., Lai Y.Y., Liu J.H., Yu B. & Tsen H.Y. (2005).** Antagonistic activity against *Salmonella* infection *in vitro* and *in vivo* for two *Lactobacillus* strains from swine and poultry. *International Journal of Food Microbiology*, 102 (2): 185-94.
- Tuomola E. & Salminen S.J. (1998).** Adhesion of some probiotics and prebiotics and dairy *Lactobacillus* strains to some caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 41: 45-51.
- Uhlman L., Schillinger U., Rupnow J.R. & Holzapfel W.H. (1992).** Identification and characterization of two bacteriocin-producing strains of *Lactococcus lactis* isolated from vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 16 (2): 141-51.
- Ulacia S.P. (2008).** Zooantroponosis. Editorial Ciencias Medicas, La Habana, Cuba :73-77
United.States.Patent (1992) : 5,090,990. Feb.25
- Urrutia S. (1997).** Desventajas en el inicio de la postura con un bajo peso corporal. *Avicultura Profesional*, 15 (1): 6-9.
- Van Immerseel F., Meulemans G., De Buck J., Pasmans F., Celge P., Bottreau E., Haesebrouck F. & Ducatelle R. (2004).** Bacteria host interactions of *Salmonella Paratyphi B* dT+ in poultry. *Epidemiology and Infection*, 132: 239-243.
- Van Der Waaij D., Berghuis De Vries J. & Lekkerkerk Van Der Wess J. (1971).** Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic treated mice. *Journal of Hygiene*, 69: 405-411.
- Van der Wielen P.W., Biesterveld S., Notermans S., Hofstra H., Urlings B.A. & Van Kapen F. (2000).** Role of volatile fatty acids in the development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. *Applied Environmental Microbiology*, 66 (6): 2536-2540.
- van Reenen C.A. & Dicks L.M. (2011).** Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities. A review. *Archives in Microbiology*, 193: 157-168.
- Vandeplas S., Dubois Dauphin R., Beckers Y., Thonart P. & Thewis A. (2010).** *Salmonella* in chicken: Current and developing strategies to reduce contamination at farm level. *Journal Food Protection*, 73: 774-785.
- Vankerckhoven V., Geert H.H., Vancanneytc M., Klared C.V.I., Romonde M.B., Entenzaf JM, Moreillonf P, Windg RD, Knolg J, Wiertzh E, Poti B., Vaughanj E.E., Kahlmeterl K.G. & Gossensa H. (2008).** Biosafety assessment of probiotics used for human consumption: recommendations from the EU-PROSAFE project. *Trends in Food Science Technology*, 6: 102-114.

- Variyam E.P. & Hoskins L.C. (1981).** Mucin degradation in human colon ecosystems. Degradation of hog gastric mucin by fecal extracts and fecal cultures. *Gastroenterology*, 81: 751-758.
- Vasudevan P., Patrick M., Nair M., Annamalai T., Darre M., Khan M., Venkitanarayanan K. (2005).** *In vitro* inactivation of *Salmonella Enteritidis* in chicken cecal contents by caprylic acid. *Journal Applied Poultry Research*, 14: 122-125.
- Vázquez R.M. (1997).** Exclusión competitiva: Nuevo sistema para el control de las enfermedades de las aves. IV Encuentro Latinoamericano de Avicultura. Guadalajara. México.
- Vázquez S.M., Suárez H. & Zapata S. (2009).** Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido-lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*, 36 (1): 65-71.
- Venkitanarayanan K., Kollanoor- Johny A., Darre M.J., Donoghue A.M. & Donoghue D.J. (2013).** Use of plant-derived antimicrobials doe improving the safety of poultry products. *Poultry Scence*, 92: 493-501.
- Viegas C., Almeida P. & Cavaco M.I.C. (1998).** The H1-ATPase in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* is activated during growth latency in Octanoic Acid supplemented medium accompanying the decrease in intracellular pH and cell viability. *Applied Environmental Microbiology*, 64: 779-783.
- Vilà B., Fontgibell A., Badiola I., Esteve-García E., Jiménez G., Castillo M. & Brufau J. (2009).** Reduction of *Salmonella enterica* var. Enteritidis colonization and invasion by *Bacillus cereus* var. Toyoi inclusion in poultry feeds. *Poultry Science*, 88 (5): 975-979.
- Villedieu A., Díaz-Torres M.L., Hunt N., McNab R., Spratt D.A, Wilson M. & Mullany P. (2003).** Prevalence of tetracycline resistance genes in oral bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (3): 878-882.
- Vincent J., Viomet R. & Rilley R. (1959).** Antibacterial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Bacteriology*, 78: 477-484.
- Vinderola C.G. & Reinhermer J.A. (2003).** Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative *in vitro* study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36: 895-904.
- Vogel R.F., Müller M., Stolz P. & Ehrmann M.A. (1996).** Ecology in sour-doughs produced by traditional and modern technologies. *Advances in Food Science*, 18: 152-159.
- Voogt N., Raes M., Wannet W.J.B., Henken N.M. & Van De Giessen A.W. (2001).** Comparison of selective enrichment media for the detetection of *Salmonella* in poultry faeces. *Letter Applied Microbiology*, 32: 89-92.

- Wahlstrom A. (2013).** The importance of seven-day weight. *WorldPoultry*. April, 23.
- Waksman S. (1945).** *Micobiol antagonism and antibiotic substances*. New York, The Commonwealth Fund, New York, EE.UU.
- Walker S.T. (2000).** *Microbiología*. 1ª ed. Mc Graw-Hill Interamericana. México DF, México.
- Walker W.A., Duffy L.C. (1998).** Diet and bacterial colonization: Role of probiotics and prebiotics. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 9: 668-675.
- Walsh C.T. (2000).** Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, 406: 775-781.
- Walstra P., Geurts T.J., Normen A., Jellema A. & Van Boekel M.A.J.S. (2001).** *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Acribia. España.
- Weaver W.E. & Whaley W.M. (1947).** Organic Fungicides. I. The Preparation of Some α -Bromoacetamides. *Journal of the American Chemical Society*, 69 (3): 515.
- Wegener H.C. (2003).** Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Current Opinions in Microbiology*, 6: 439-445.
- Weill F.X., Lailier R., Praud K., Kerouanton A., Fabre L., Brisabois A., Grimont P.A.D. & Cloeckaert A. (2004).** Emergence of extended-spectrum-beta-lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow in poultry and humans in France. *Journal Clinical Microbiology*, 42: 5767–5773.
- Wendakoon C.N. & Sakaguchi M. (1995).** Combined effect of sodium chloride and clove on growth and biogenic amine formation of *Enterobacter aerogenes* in mackerel muscle extract. *Journal Food Protection*, 56: 410-413.
- Wheater D. Hirsch A. & Mattick A. (1951).** Lactobacillin: An Antibiotic from *Lactobacillus*. *Nature*, 168: 659.
- WHO (World Health Organization) Regional Office for Europe (2000).** WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe. Seventh Report on Surveillance of Foodborne Disease in Europe 1993-1998. Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine BGVV. FAO/WHO Collaborating Centre for Training and Research in Food Hygiene and Zoonoses. P.O. Box 33 00 13, 14191 Berlin. Germany.
- WHO (World Health Organisation), FAO (Food and Agriculture Organisation of the United Nations), IOE (World Organisation for Animal Health. (2003).** Joint FAO/OIE/ WHO Expert Workshop on Non-human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance. Scientific assessment. December 1-5, Ginebra, Suiza.

- Wierup M., Wahlstrom H. & Engstrom B. (1992).** Experience of a 10 year use of competitive exclusion treatment as part of the *Salmonella* control programme in sweden. International Journal of Food Microbiology, 15 (3-4): 287-91. kk
- Wierup M., Wahlstrom M., Nurmi E. & Hankken M. (1988).** Epidemiological evaluation of the *Salmonella*-controlling effect of a nationwide use of a competitive exclusion culture in poultry. Poultry Science, 67 (7): 1026-1033.
- Williams J.G. K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A. & Tin-Gey S.V. (1990).** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Research, 18: 6531-6535.
- Williams R. & Heymann D. (1998).** Containment of antibiotic resistance. Science, 279: 1153.
- Wilson K. & Perini F. (1988).** Role of competition for nutrients in supression of *Clostridium difficile* by the colonic microflora. Infection and Immunity, 56: 2610-2614.
- Woodford N.A. Adebisi M., Palepen B. & Cookson B. (1998).** Diversity of Van A glycopeptide resistance elements in *Enterococci* from human and non-human sources. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 42: 502-508.
- Woodford N.A., Johnson A.P., Morrison D. & Speller D.C.E. (1995).** Current perspective on glycopeptides resistance. Clinical Microbiology Reviews, 8: 585-615.
- Wray C. & Wray A. EDS. (2000).** *Salmonella* in Domestic Animals. CAB International. Wallingford. Oxon. UK.
- Yang Z. (2000).** Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: Structures and properties. Tesis doctoral. University of Helsinki.
- Yegani M. (2010).** Manipulación de la Flora Intestinal en Aves. Universidad de Alberta Canadá. Disponible en: [www./Manipulaci%C3%B3n%20de%20la%20microflora%20intestinal%20de%20las%20aves.htm](http://www.Manipulaci%C3%B3n%20de%20la%20microflora%20intestinal%20de%20las%20aves.htm)
- Yeo J. & Kim K. (1997).** Effect of feeding diets containing an antibiotic, a probiotic, or yucca extract on growth and intestinal urease activity in broiler chicks. Poultry Science, 76 (2): 381-385.
- Yin L., Wu C. & Jiang S. (2004).** Purification and characterization of bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52 (5): 1146 -1151.
- Zacconi C., Scolari G. & Sarra P.G. (1999a).** Colonisation of chicken intestinal tract by *Lactobacillus salivarius* A23 strain. Annali di Microbiologia ed Enzimologia, 49: 117-123.

- Zamora M.L. (2003).** Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero. Tesis doctoral. Universidad de Girona.
- Zavaglia A.G., Kociubinski G., Pérez P., De Antoni G. (1998).** Isolation and characterization of *Bifidobacterium* strains for probiotic formulation. *Journal Food Protection*, 61: 865-873.
- Zhang X.B. & Ohta Y. (1991).** *In vitro* binding of mutagenic pyrolyzates to lactic acid bacterial cells in human gastric juice. *Journal Dairy Science*, 74 (3): 752 - 757.
- Zhou J.S., Pillidge C.J., Gopal P.K. & Gill H.S. (2005).** Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 98: 211-217.
- Zopf D. & Roth S. (1996).** Oligosaccharide antiinfective agents. *The Lancet*, 347: 1017-1021.