



Un probiótico definido aumenta la exclusión de *Salmonella enterica* serovariedad *Enteritidis* durante la crianza de aves ligeras*

Enhancement of competitive exclusion by a defined probiotic on *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* colonization during rearing of Leghorn chicks

Marco Antonio Juárez Estrada** Jessica Alejandra Molina Hernández**
Lourdes González Soto**

Abstract

Competitive exclusion degree from a defined (DP) and undefined probiotic (UDP) administered to one-day Leghorn chicks and challenged with 1×10^8 CFU of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis fagotype 13^A (SE) was evaluated. Birds with DP at 20 day old showed 21.7% of SE positive isolates in liver-spleen (LS), less than 51.7% recorded from birds without any probiotic. In a second study, birds that received DP living together with a group inoculated with SE at third day old, showed 7.5% infection in LS at 13 day of age and 12.5% at 15 day. Whereas, SE inoculated group had 75% and 57.5% of SE isolates, respectively. A third group, living with the last two, without DP or SE showed 27.5% of SE in LS at 13 day, and only 10% at 15 day of age. DP group at 13 day of age, showed a decrease of 75% of SE colonization at cecal tonsils (CT), instead, SE inoculated group was 100% colonized; at 15 day of age, DP decreased 51.4% of SE colonization in CT, while control group showed a decrease of 42.5%, and 68.6% of SE in CT at 13 and 15 days, respectively. In a third study, a DP booster group was dosed three times, at 14 days of age, it had only 4.5% of SE isolates from LS. Birds without DP showed 34.6% of SE isolates, and the group inoculated with only one dose had 17.2% of SE positive birds. DP booster group showed 22.7% of SE in CT, the group with one dose had 62% of SE isolates; birds without DP decreased only 3.9% of SE colonization. DP showed greater margin of protection, decreased horizontal transmission of SE PT13^A in LS and CT, and it has good transmission potential. DP booster treatment was better than only one dose. DP is a good alternative for SE prevention and eradication in commercial poultry.

Key words: COMPETITIVE EXCLUSION, FOOD SAFETY, FOODBORNE ILLNESS, PROBIOTICS, NEWLY HATCHED CHICKS.

Resumen

Se determinó el grado de exclusión de un probiótico definido (PECD) y otro no definido (PECND) administrados a aves de la raza Leghorn, de un día de edad, sobre el desafío con 1×10^8 UFC de *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis fagotipo 13^A (SE). Las aves con PECD al día 20 mostraron 21.7% de aislamientos positivos de SE en hígado-bazo (HB), menor al 51.7% observado en las aves sin probiótico. En un segundo estudio, las aves que recibieron el PECD y convivieron en piso con un grupo inoculado con SE desde el día tres, mostraron una infección en HB de 7.5% al día 13 y 12.5% al día 15 de edad, el grupo inoculado mostró 75% y 57.5% de SE, respectivamente. Un tercer grupo que convivió con los dos anteriores y no recibió probiótico ni SE, mostró 27.5% de SE en HB al día 13 y sólo 10% al día 15. El grupo con el probiótico muestra una reducción de 75% de SE en tonsilas cecales (TC) al día 13, mientras que el inoculado fue 100% colonizado; al día 15, el probiótico redujo 51.4% la colonización, mientras que el testigo mostró una reducción de 42.5% al día 13 y de 68.6% al día 15. En un tercer estudio un grupo redosificado tres veces, al día 14 de edad disminuyó el porcentaje de aislamientos de SE en HB a tan sólo 4.5%. Las aves que no recibieron el probiótico mostraron 34.6% de SE y las aves que lo recibieron una sola vez mostraron 17.2%. El grupo con refuerzo mostró 22.7% de colonización en TC, el grupo con una dosis mostró 62% de aves positivas a SE, las aves sin probiótico redujeron sólo 3.9% esta colonización. El grupo con PECD muestra mayor margen de protección, reduce la transmisión horizontal de SE PT13^A en HB y TC; exhibe además un buen potencial de transmisión. El refuerzo de dosificación del PECD fue mejor que una sola toma. El PECD constituye una buena alternativa en la prevención y erradicación de la SE en la avicultura comercial.

Palabras clave: EXCLUSIÓN COMPETITIVA, INOCUIDAD ALIMENTARIA, INTOXICACIÓN ALIMENTARIA, PROBIÓTICOS, POLLITOS NEONATOS.

Recibido el 9 de marzo de 2009 y aceptado el 4 de diciembre de 2009.

*La referencia o mención de cualquier tipo de marca comercial registrada no implica la promoción de los productos a los que aluden, ni constituye a su vez una crítica hacia productos similares que no se mencionan aquí.

**Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F., Correo electrónico: britoco@unam.mx Tels. 5616-6923, 5622-5867 y 68 ext. 220.

Introduction

The genus *Salmonella* is a group of gram-negative bacteria belonging to the family Enterobacteriaceae that comprises more than 2,463 serotypes. The serotypes of interest in poultry production are divided into two groups, the first includes the motionless *Salmonella* such as *Salmonella enterica* serovar Gallinarum (SG) and *S. enterica* serovar Pullorum (SP). The second group includes some mobile *Salmonella* such as *S. enterica* serovar Typhimurium (ST) and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE), which produce para-typhoid in humans.¹⁻³ Successful campaigns for eradication of SG have been made in several countries, including Mexico.^{4,5} It was noted that SE was excluded from commercial birds during the first half and part of the second half of the twentieth century, mainly due to exclusion exerted by SG on *S. enteritidis*. However, according to comments made by Rabsch *et al.*,⁵ it currently covers the ecological niche that *S. gallinarum* has left, so *S. enteritidis* has become the main pathogen associated with egg and meat production.^{1, 2,6,7} Consumption of any food contaminated with *S. enteritidis* can lead to severe human enteritis, which in children, elderly and immunocompromised people may be mortal.^{2, 6-8}

Because of vertical integration in the modern poultry industry, a flock of breeders can produce thousands of commercial descendants contaminated with *Salmonella* spp.^{1,3,6} Breeding birds show no clinical signs. Even when there are SE positive isolates from samples of cecal contents, feces and litter, the birds become a reservoir that represents a potential public health risk.^{2,9} When a flock is positive to *S. enteritidis*, it is difficult to eliminate.^{1,2,9,10} With the unavoidable ban of antibiotics used as growth promoters (AGP) by the European Union and the United States of America, those should be replaced by methods equally effective than AGP.¹⁰⁻¹³ In recent years, some natural methods that are designed to attack such enteric pathogens have been explored as an alternative to antibiotic use.¹³⁻²³ Under natural breeding conditions the hatching chicken acquires its native intestinal microbiota (NIM) from the environment, then it colonizes the digestive tract, especially the esophageal diverticulum and cecum.^{24,25} The NIM is a complex and dynamic population of microorganisms that normally inhabit the tract of domestic birds in a close homeokinesis relation.^{12,26-28} The high susceptibility of young birds to enteric pathogens, coupled with the lack of competitive NIM, were identified to cause infection of *Salmonella* spp more than 30 years ago.²⁹

Nurmi and Rantala²⁹ showed that colonization by *Salmonella* spp could be prevented in newly hatched chicks by oral administration of NIM

Introducción

El género *Salmonella* es un grupo de bacterias gramnegativas que pertenece a la familia Enterobacteriaceae y comprende más de 2 463 serotipos. Los serotipos de interés en la producción avícola se dividen en dos grupos, en el primero se encuentran las *Salmonellas* inmóviles, como *Salmonella enterica* serovariedad Gallinarum (SG) y *S. enterica* serovariedad Pullorum (SP); en el segundo grupo algunas *Salmonellas* móviles, como *S. enterica* serovariedad Typhimurium (ST) y *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis (SE), que producen paratifoideas en humanos.¹⁻³ Las campañas para la erradicación de SG que se han efectuado en varios países, incluido México, han sido muy efectivas.^{4,5} Se ha observado que SE estuvo excluida de las aves comerciales durante la primera parte y parte de la segunda mitad del siglo XX, principalmente debido a la exclusión que ejercía SG sobre *S. enteritidis*; sin embargo, de acuerdo con las observaciones efectuadas por Rabsch *et al.*,⁵ actualmente SE cubre el nicho ecológico que ha dejado *S. gallinarum*, por lo cual *S. enteritidis* se ha convertido en el principal agente patógeno asociado con la producción de huevo y carne de pollo.^{1,2,6,7} El consumo de cualquier alimento contaminado con *S. enteritidis* puede dar lugar a enteritis humana severa, la cual en niños, ancianos y personas inmunocomprometidas puede ser mortal.^{2,6-8}

Debido a la integración vertical en la industria avícola moderna, una parvada de reproductoras puede generar miles de descendientes comerciales contaminados con *Salmonella* spp.^{1,3,6} Las aves reproductoras no muestran signos clínicos; aun cuando existan aislamientos positivos de SE a partir de muestras de contenido cecal, heces y cama, las aves se convierten en un reservorio que representa un riesgo potencial para la salud pública.^{2,9} En cuanto una parvada es positiva a *S. enteritidis*, ésta es difícil de eliminar.^{1,2,9,10} Ante la inminente prohibición de los antibióticos empleados como promotores de crecimiento (APC) por parte de la Unión Europea y Estados Unidos de América, aquéllos deben sustituirse por métodos igualmente efectivos que los APC.¹⁰⁻¹³ En los últimos años se ha explorado como alternativa a la utilización de antibióticos, algunos métodos naturales que tienen la finalidad de combatir este tipo de patógenos entéricos.¹³⁻²³ En condiciones de crianza natural, el pollito al momento de su eclosión adquiere su microbiota nativa intestinal (MNI) a partir del medio ambiente, esta última coloniza el tracto digestivo, principalmente el divertículo esofágico y los sacos ciegos.^{24,25} La MNI es una compleja y dinámica población de microorganismos que normalmente habitan el tracto digestivo de las aves domésticas en una estrecha relación de homeocinesis.^{12,26-28} La alta susceptibilidad de las aves jóvenes a patógenos entéricos,

bacteria from adult birds. Nurmi's proposal has been widely adopted in different countries for *Salmonella* control in poultry and is known as the Nurmi concept or competitive exclusion (CE).^{9,17,22,30,31}

Much of the knowledge derived from these new methodologies has been based on the use of NIM lactic bacteria, which synthesizes substances that show inhibitory activity for bacteria phylogenetically related and unrelated to them, as part of their metabolism.^{16,17,22,26,32}

Nowadays, new technological devices are being developed in order to find specific agencies for specific purposes. Such progress is based on the isolation of potentially beneficial microorganisms, in this group are probiotics.^{13,18,19,23} Probiotics include bacteria and some of its metabolites, the most used microorganisms are the lactic-acid producing bacteria, which contribute to the intestinal microbial balance.^{12,17,19,23,26} Using probiotics may be an alternative to *S. enteritidis* control.^{11,17,18,22,31,33}

Treatment success or failure with cultured CE in newborn chickens depends on rapid establishment of the bacteria they contain, but the optimum amount and schedule to achieve this objective is not yet known exactly.^{9,11,15,34-37} The present study evaluates the effect of the primary administration of a probiotic on the establishment of *Salmonella* in Leghorn breed-replacement poultry, reared in cages or on floor.

Material and methods

For isolation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 13^A (SE PT13^A), tetrathionate broth* (TB) and brilliant green phenol red agar** (BGA) were used. Nalidixic acid*** (NA) and novobiocin† (NO) were added to the BGA as differential antibiotic. Indole triple sugar (ITS), citrate, LIA, urea and SIM‡ were used for biochemical identification. Serotyping was performed with antisera specific to O somatic surface antigens and flagellar H antigens by the Kauffman-White scheme (48232-7058),³ phosphate solution was used as buffer[°] (PBS).

Experimental animals

One-day-old Leghorn chicks were used from a commercial hatchery. During the studies animals were housed in floor pens of 1.5 m², for cage testing they were housed in battery cages.*

Handling conditions

The birds were kept in isolation units at the Departamento de Produccion Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia of the Universidad Nacional Autonoma de Mexico (DPA: Aves, FMVZ-UNAM), under wellbeing conditions according to

aunada a su falta de MNI competitiva, fueron señaladas hace más de 30 años como causantes de infección de *Salmonella* spp.²⁹

Nurmi y Rantala²⁹ mostraron que la colonización por *Salmonella* spp, en los pollitos recién nacidos, podía ser prevenida a través de la administración oral de bacterias procedentes de MNI de aves adultas. La propuesta de Nurmi ha sido ampliamente adoptada en diferentes países para el control de *Salmonellas* en aves y se conoce como concepto Nurmi o exclusión competitiva (EC).^{9,17,22,30,31}

Gran parte del conocimiento fundamentado en estas nuevas metodologías se ha basado en el empleo de bacterias lácticas presentes en la MNI, las cuales sintetizan, como parte de su metabolismo, sustancias que muestran actividad inhibitoria para bacterias filogenéticamente relacionadas y no relacionadas con ellas.^{16,17,22,26,32}

Actualmente se están desarrollando productos derivados de la tecnología con la finalidad de encontrar organismos específicos con propósitos específicos; dicho avance se basa en el aislamiento de microorganismos potencialmente benéficos; en este grupo se encuentran los probióticos.^{13,18,19,23} Los probióticos incluyen bacterias y algunos de sus metabolitos, los microorganismos más utilizados son las bacterias productoras de ácido láctico, que contribuyen al equilibrio microbiano intestinal.^{12,17,19,23,26} El empleo de probióticos puede ser una alternativa para el control de *S. enteritidis*.^{11,17,18,22,31,33}

El éxito o fracaso del tratamiento con cultivos de EC en los pollos recién nacidos depende del rápido establecimiento de las bacterias que contienen; sin embargo, aún no se conoce exactamente la cantidad y periodicidad óptima para lograr este objetivo.^{9,11,15,34-37} En el presente estudio se evalúa el efecto de la administración primaria de un probiótico sobre el establecimiento de *Salmonella* en aves de la raza Leghorn de reemplazo, criadas en jaula o en piso.

Material y métodos

Para el aislamiento de *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis fagotipo 13^A (SE PT13^A), se utilizó caldo tetratiónato* (CT) y agar rojo fenol verde brillante** (AVB); como antibiótico diferencial en el AVB se empleó ácido nalidíxico*** (AN) y novobiocina† (NO), para la identificación bioquímica se utilizaron triple azúcar indol (TSI), citrato, LIA, urea y SIM.‡ La serotipificación se efectuó con antiseros específicos de antígenos somáticos de superficie O y antígenos flagelares H mediante el esquema de Kauffman-White (48232-7058),³ como solución tampón se empleó solución amortiguadora de fosfatos (PBS).[°]

*Sigma-Aldrich®, Estados Unidos de América.

**Sigma-Aldrich®, Estados Unidos de América.

***Sigma-Aldrich®, Estados Unidos de América.

†Sigma-Aldrich®, Estados Unidos de América.

‡Difco®, Ann Arbor, Detroit, M. Estados Unidos de América.

°Difco®, Ann Arbor, Detroit, M. Estados Unidos de América.

the Norma Oficial Mexicana NOM-069-ZOO-1999. Birds were fed with isocaloric and isoprotein flour, no antibiotic or anticoccidials were added and drinking water was provided *ad libitum*.

Bacteriological safety test

In order to rule out the presence of *Salmonella* spp in the birds used in each study, samples of liver, spleen and cecal tonsils of 20 one-day-old birds were taken, 100 g of transport litter and 200 g of the food provided throughout the study were tested. A bacteriological study was carried out according to the Norma Oficial Mexicana NOM-005-ZOO-1993.

Challenge inoculum

A SE PT13^A strain from the National Veterinary Services Laboratory in Ames, Iowa, United States of America, approved for use in the DPA: Aves, FMVZ-UNAM was used. SE PT13^A strain is cultured in general and selective medium even in the presence of NA or NO (genomic resistance). In order to inhibit the growth of other bacteria that were not SE PT13^A, the BGA contained 200 µg/mL of NA and 25 µg/mL of NO. The SE PT13^A inoculum was adjusted by spectrometry in sterile PBS. The challenge dose per bird was 1×10^8 colony forming units (CFU) contained in 250 µL. Challenge was performed *per os*. The negative control group received only sterile PBS *per os* in each challenge.

Commercial probiotic of defined competitive exclusion (DP)*

This probiotic is a mixture of facultative and obligate anaerobic bacteria. It is based on 32 different pure cultures from NIM obtained from specific pathogen free (SPF) adult birds, these cultures have been characterized. Isolates include 22 types of aerobic bacilli and cocci representing five genera, and ten types of anaerobic bacilli and cocci representing three genera. Some bacteria that compose it are *Enterococcus* spp, *Bacteroides* spp, *Bacillus* spp, *Lactobacillus* spp, *Eubacterium* spp, *Escherichia* spp, *Propionobacterium* spp, and gram-positive anaerobic cocci.³⁸ The probiotic is free of any spore-forming organism, has a bacterial count of 1×10^{10} bacteria per gram of lyophilized powder. It was administered 1 mg/bird of DP at day one of age through a tube directly into the ingluvies; boosters were given in drinking water according to manufacturer's recommendation for a single-dose (1 mg/bird/day).

Animales de experimentación

Se emplearon pollitos de la raza Leghorn de un día de edad, provenientes de una incubadora comercial, en los estudios de piso se alojaron en corrales de 1.5 m², en las pruebas en jaula se alojaron en baterías eléctricas.*

Condiciones de manejo

Las aves se mantuvieron en unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (DPA: Aves, FMVZ-UNAM), en condiciones de bienestar, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-069-ZOO-1999. Se alimentaron con dieta de harina isocalórica e isoproteínica, no se le adicionó antibiótico ni anticoccidiano y se proporcionó agua potable *ad libitum*.

Prueba bacteriológica de inocuidad

Con la finalidad de descartar presencia de *Salmonella* spp, en las aves empleadas en cada estudio, se tomó al día de edad una muestra de hígado, bazo y tonsilas cecales de 20 aves, 100 g de muestras de la cama de transporte y 200 g de las muestras del alimento que se proporcionó durante todo el estudio, se efectuó un estudio bacteriológico de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-005-ZOO-1993.

Inóculo de desafío

Se empleó una cepa de SE PT13^A proveniente del National Veterinary Services Laboratory, en Ames, Iowa, Estado Unidos de América aprobada para su uso en el DPA: Aves, FMVZ-UNAM. La cepa SE PT13^A crece en medios generales y selectivos aun en presencia de AN o NO (resistencia genómica). Con la finalidad de inhibir el crecimiento de otras bacterias que no fueran SE PT13^A, el AVB contenía 200 µg/mL de AN y 25 µg/mL de NO. El inóculo de SE PT13^A fue ajustado mediante espectrometría en PBS estéril. La dosis de desafío por ave fue de 1×10^8 unidades formadoras de colonia (UFC) contenidas en 250 µL. El desafío se efectuó *per os*. En cada desafío el grupo testigo negativo recibió únicamente PBS estéril *per os*.

*Petersime, Estados Unidos de América

Commercial product of undefined competitive exclusion (UDP)**

The NIM is composed from SPF birds. The manufacturer states that this microbiota is composed of organisms of the genera *Bacteroides* spp, *Citrobacter* spp, *Clostridium* spp, *Escherichia* spp, *Enterococcus* spp, *Eubacterium* spp, *Lactobacillus* spp, *Propionibacterium* spp, *Ruminococcus* spp, *Streptococcus* spp, and others not yet identified.³⁹ Each bird in the UDP treatment was given 12.5 mg of competitive exclusion product *per os*.

Comparison between defined and undefined probiotics

A total of 480 birds were allocated in four groups of 120 chicken with three replicates each, birds were challenged on two different dates. The experimental design only considered the analysis of one factor (type of probiotic: defined or undefined). Group A (negative control), were given only sterile PBS at one day of age, they did not receive any kind of challenge, three replicates were sacrificed at 12 days of age and three replicates at day 20 of age. Group B, one-day-old birds received DP *per os*, three replicates were challenged with SE PT13^A at 11 days old and three replicates at day 19 of age. Group C, UDP was given to one-day-old birds *per os*, three replicates were challenged with SE PT13^A at 11 days of age and three replicates at day 19 of age. Group D (positive control), only a PBS was administered *per os* on day one of age, three replicates were challenged with SE PT13^A at 11 days old and three replicates at day 19 of age.

Effect of defined probiotic on Salmonella spp infection in a trial conducted in floor pens

To evaluate the DP effect on SE PT13^A horizontal transmission of SE, the response variable was determined with 240 birds assigned to four pens, 60 chicks per pen, in which there were three groups of 20 birds each. Birds were evaluated in two different dates. A random arrangement was designed for DP administration, which only considered one factor analysis according to Nava⁴⁰ and Snoeyenbos *et al.*²⁴ Group E, birds received 250 µL of sterile PBS *per os* at one day of age; on the third day of age 250 µL/bird of inoculum were administered *per os* (SE PT13^A). Group F (negative control) received 250 µL of sterile PBS/bird *per os* on days one and three of age, respectively; this group was not challenged. Group G, DP was administered only *per os* to one-day-old chicks, on day three of age they received 250 µL of sterile PBS/bird *per os*; the birds of this group were not challenged. Each of the replicates of the three groups coexisted

Probiótico comercial de exclusión competitiva definido (PECD)*

Este probiótico es una mezcla de bacterias anaerobias facultativas y obligadas. Para su elaboración se obtuvieron 32 diferentes cultivos puros a partir de MNI proveniente de aves adultas libres de patógenos específicos (LPE), estos cultivos ya se han caracterizado. Los aislamientos incluyen 22 tipos de bacilos aerobios y cocos que representan cinco géneros, y diez tipos de bacilos anaerobios y cocos que representan tres géneros. Algunas bacterias que lo componen son *Enterococcus* spp, *Bacteroides* spp, *Bacillus* spp, *Lactobacillus* spp, *Eubacterium* spp, *Escherichia* spp, *Propionibacterium* spp, y cocos anaerobios grampositivos.³⁸ El probiótico está libre de cualquier organismo formador de esporas, tiene una cuenta bacteriana de 1×10^{10} bacterias por gramo de polvo liofilizado. Se administró 1 mg/ave del PECD al día uno de edad a través de una sonda directa en ingluvies; cuando fue necesario se redosificó en el agua de bebida de acuerdo con la recomendación del fabricante para dosis única (1 mg/ave/día).

Producto comercial de exclusión competitiva no definido (PECND)**

Está compuesto de MNI proveniente de aves LPE. El fabricante menciona que esta microbiota se encuentra integrada por microorganismos de los géneros *Bacteroides* spp, *Citrobacter* spp, *Clostridium* spp, *Escherichia* spp, *Enterococcus* spp, *Eubacterium* spp, *Lactobacillus* spp, *Propionibacterium* spp, *Ruminococcus* spp, *Streptococcus* spp, y otros aún no identificados.³⁹ A cada una de las aves del grupo de tratamiento correspondiente al PECND se les administró 12.5 mg del producto de exclusión competitiva *per os*.

Comparación entre los probióticos definido y no definido

Se asignaron 480 aves en cuatro grupos de 120 pollos con tres réplicas cada uno, las aves fueron desafiadas en dos diferentes fechas. Se diseñó el siguiente arreglo que únicamente contempló el análisis de un factor (tipo de probiótico: definido o indefinido). Grupo A (testigo negativo), al día uno de edad a las aves de este grupo se les administró únicamente PBS estéril, no recibieron ningún tipo de desafío; tres réplicas se sacrificaron a los 12 días de edad y otras tres réplicas

*Broilact® Orion Pharma Animal Health, Helsinki, Finlandia.

**Aviguard® Microbiol Developments Ltd., Worcestershire, Inglaterra.

on the litter in the same pen, fed and drank from the same source during the period prior to euthanasia. Each 1.5 m² pen housed 20 birds from Group E, 20 from Group F and 20 from Group G. Two replicates were euthanized ten days after the challenge and other two replicates 12 days after challenge.

Effect of dosage of defined probiotic on Salmonella spp infection in a trial conducted in battery cages

A total of 252 birds were allocated in three treatment groups of 28 chickens each in three different dates of evaluation (total = 9 groups). Each group was housed randomly at different levels of cages placed in two electric batteries.* The following arrangement was designed for the assignment of the explanatory variable (a single dose of probiotic or repeat doses up to three times): Group H, one-day-old birds received DP *per os*, the birds were challenged with SE PT13^A at seven, 13 and 23 days old. Group I, received the DP at one day of age *per os*, this group treatment was reinforced with the commercial probiotic in drinking water at six, 12 and 22 days of age.

Birds of this group were challenged with SE PT13^A 24 hours after receiving the DP as part of the booster scheme. Group J, birds were given only sterile PBS *per os* on day one of age, birds of this group were challenged with SE PT13^A at seven, 13 and 23 days of age, respectively.

Recovery of Salmonella spp

Birds from each group were euthanized 24 hours after challenge with SE PT13^A, according to the American Medical Veterinary Association guidelines.⁴¹ Samples were aseptically collected from each bird pooling liver-spleen and cecal tonsils, which were sowed in 10 mL of TB each.^{21,40} Samples were incubated for 24 hours at 37 °C. After incubation the broth was cultured in boxes of BGA with NA / NO and incubated for 24 hours at 37°C. Later, the boxes were examined for lactose negative colonies suggestive of SE PT13^A resistant to NO and NA. Of the lactose negative colonies 10% of the samples were selected, refrigerated and the biochemical identification and serotyping were performed in a period less than seven days.³

Statistical analysis

The percentage of birds positive to SE PT13^A was evaluated through the chi-square test with a 5% level of statistical significance for alpha.⁴²

al día 20 de edad. Grupo B, al día uno de edad a las aves se les administró el PECD *per os*; tres réplicas se desafiaron con SE PT13^A a los 11 días de edad y otras tres réplicas al día 19 de edad. Grupo C, al día uno de edad a las aves se les administró el PECND *per os*, tres réplicas se desafiaron con SE PT13^A a los 11 días de edad y otras tres réplicas al día 19 de edad. Grupo D (testigo positivo), al día de edad únicamente se les administró PBS estéril *per os*, tres réplicas se desafiaron con SE PT13^A a los 11 días de edad y otras tres réplicas al día 19 de edad.

Efecto del probiótico definido sobre la infección con Salmonella spp en una prueba efectuada en un corral de piso

Para la evaluación del PECD sobre la transmisión horizontal de SE PT13^A, la variable de respuesta se determinó con 240 aves asignadas en cuatro corrales, 60 pollos por corral, en los cuales había tres grupos de 20 aves cada uno, los cuales se evaluaron en dos fechas diferentes. Para la administración del PECD se diseñó el siguiente arreglo aleatorio, que contempló únicamente el análisis de un factor de acuerdo con lo mencionado por Nava⁴⁰ y Snoeyenbos *et al.*²⁴ Grupo E, las aves recibieron al día de edad 250 µL de PBS estéril *per os*, al tercer día de edad se administró *per os* 250 µL/ave del inoculo (SE PT13^A). Grupo F (testigo negativo), recibió 250 µL de PBS estéril/ave *per os* día, los días uno y tres de edad, respectivamente; este grupo no se desafió. Grupo G, sólo se le administró el PECD *per os* al día de edad, al día tres de edad recibieron 250 µL de PBS estéril/ave *per os*; las aves de este grupo no se desafiaron. Cada una de las réplicas de los tres grupos convivieron sobre la cama de un mismo corral, comieron y bebieron de la misma fuente durante el periodo anterior a la eutanasia, por lo cual en cada corral de 1.5 m² hubo 20 aves del Grupo E, 20 aves del Grupo F y 20 aves del Grupo G. Dos réplicas se sacrificaron diez días después del desafío y otras dos réplicas, doce días después del mismo.

Efecto de la dosificación del probiótico definido sobre la infección con Salmonella spp en una prueba efectuada en jaulas colocadas en batería

Se asignaron 252 aves en tres grupos de tratamiento de 28 pollos cada uno en tres fechas de evaluación (total = 9 grupos), cada grupo se alojó aleatoriamente en diferentes niveles de las jaulas colocadas en dos baterías eléctricas.* Para la asignación de la variable explicativa (una sola dosis de probiótico o su redosificación hasta

*Petersime®, Estados Unidos de América.

Results

Invasion and colonization of Salmonella spp in poultry treated with defined and undefined probiotic of competitive exclusion

Table 1 shows that at day 12 of age there was no inhibition of SE PT13^A invasion to liver-spleen or cecal tonsils from either probiotic. At day 20 the DP group showed greater inhibition ($P < 0.05$) in the liver-spleen invasion by SE PT13^A in contrast to the one shown by the positive control. The UDP group was not different from the other two challenged groups. There was no difference between groups in SE PT13^A isolates from cecal tonsils. The negative control groups showed no growth of *Salmonella* spp.

Invasion and colonization of Salmonella spp in the defined-probiotic-treated birds reared in floor pens

Table 2 shows that at day 13 of age SE PT13^A invaded up to 75% of liver-spleen in the seed group, 27.5% higher than the negative control ($P < 0.05$). The DP group showed invasion of only 7.5%, which is different ($P < 0.05$) to that observed in the other two groups. The SE PT13^A rate of colonization in cecal tonsils of the seed group was complete (100%), but was not different to 57.5% of colonization observed in the negative control, although it did differ ($P < 0.05$) from the DP group (25%), which was lower and different ($P < 0.05$) to the negative control. Table 2 shows that at day 15 of age SE PT13^A invasion to liver-spleen in the seed group was 57.5% higher ($P < 0.05$) than the 10% in the negative control and the 12.5% of group supplemented with the defined probiotic. The latter two groups were not different among each other. Table 2 depicts that SE PT13^A colonized 87.5% of cecal tonsils in the seed group, which was significantly higher ($P < 0.05$) to the 27.5% recorded in the negative control group and the 42.5% of the DP group; these two groups did not differ among themselves.

Invasion and colonization of Salmonella spp in poultry treated with different doses of defined probiotic

Table 3 shows that at the eighth day of age there were no differences between groups in the percentage of SE PT13^A isolates from liver-spleen or cecal tonsils. At day 14 of age 34.6% of SE PT13^A was isolated from liver-spleen and 96.1% from cecal tonsils in the positive control group. These ratios are significantly larger ($P < 0.05$) than the group that initially received the DP at day one of age and subsequently received two

por tres ocasiones) se diseñó el siguiente arreglo: Grupo H, al día uno de edad las aves recibieron el PECD *per os*, las aves se desafiaron con SE PT13^A a los siete, 13 y 23 días de edad. Grupo I, se le administró el PECD al día de edad *per os*, a este grupo se le reforzó el tratamiento con el probiótico comercial por agua de bebida a los seis, 12 y 22 días de edad.

Las aves de este grupo se desafiaron con SE PT13^A 24 horas después de haber recibido el PECD como parte del esquema de refuerzo. Grupo J, al día uno de edad se le administró únicamente PBS estéril *per os*, las aves de este grupo se desafiaron con SE PT13^A los días siete, 13 y 23 de edad, respectivamente.

Recuperación de Salmonella spp

Veinticuatro horas después del desafío con SE PT13^A, a las aves procedentes de cada grupo se les aplicó la eutanasia de acuerdo con lo indicado para este fin por la Asociación Estadounidense de Medicina Veterinaria.⁴¹ A partir de cada ave se obtuvieron de manera aséptica muestras combinadas de hígado-bazo y tonsilas cecales, las cuales se sembraron en 10 mL de CT cada una.^{21,40} Las muestras se incubaron durante 24 horas a 37°C. Después de la incubación el caldo se sembró en cajas de AGV con AN/NO. Se incubaron durante 24 horas a 37°C; posteriormente, las cajas se examinaron en busca de colonias lactosa negativas sugerentes de SE PT13^A resistente a NO y AN. De las colonias lactosa negativas se seleccionó 10% de las muestras, se refrigeraron y en un periodo menor a siete días se realizó su identificación bioquímica y serotipificación.³

Análisis estadístico

El porcentaje de aves positivas a SE PT13^A se evaluó a través de la prueba de Ji-cuadrada con un grado de 5% de significancia estadística para alfa.⁴²

Resultados

Invasión y colonización de Salmonella spp en aves tratadas con probiótico de exclusión competitiva definido y no definido

El Cuadro 1 muestra que al día 12 de edad no se registra inhibición de la invasión por SE PT13^A a hígado-bazo o tonsilas cecales por parte de cualquiera de los dos probióticos. Al día 20, el grupo con PECD mostró mayor inhibición ($P < 0.05$) en la invasión a hígado-bazo por SE PT13^A que la mostrada por el testigo positivo. El grupo del PECND no fue diferente

booster doses (at six and 12 days old). This group showed the lowest rate of invasion and colonization of SE PT13^A (4.5% in liver-spleen and 22.7% in cecal tonsils). The group that received a single dose of DP presented 17.2% of liver-spleen invasion and 62.0% of colonization in cecal tonsils, this was not different from the other two groups. There was no difference between groups in the proportion of isolates from SE PT13^A from any organ evaluated at day 24 of age (Table 3).

Safety test and serotyping of samples positive to *Salmonella* spp

Samples tested for bacteriological safety were negative for *Salmonella* spp isolation. Suspicious colonies that grew in BGA were identified by biochemical tests, finding that 100% were mobile *Salmonella* spp. Serotyping tests determined that they corresponded to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (group D1, O: 1,9,12, H: g,m).

Discussion

The probiotics used in this study significantly reduced *Salmonella* infection in internal organs or cecal tonsils of Leghorn birds. DP was more effective at excluding at 20 days of age. Schneitz *et al.*³⁸ obtained an acceptable protection against *Salmonella* infection at day 19 of age by giving an identical dose of DP to one-day-old birds, which showed only 0.4 log₁₀ CFU/g of cecal content, which is lower than the control birds who did not receive it (2.9 log₁₀ CFU/g), and were previously challenged at day 15 of age with a high dose of *S. enterica*, serovar Infantis (SI) (6 × 10⁷ CFU/bird).

In this study the DP group showed decreased SE PT13^A invasion to cecal tonsils at 13 days of age. This trend was observed with the concomitant bacterial translocation and positive isolations from liver and spleen; however, there was no statistical difference with the control group. In this context, Schneitz *et al.*³⁸ found protection since the seventh day of age by applying the DP to one-day-old birds. Although birds in this study had a greater amount of SI regarding that observed in its evaluation after day 19, Schneitz *et al.*³⁸ did find a significant difference between the DP and the control group.

It has been mentioned that undefined probiotics also lower *Salmonella* infection, but in the present study the UDP was unable to decrease colonization of *Salmonella* in the same proportion as did the defined probiotic; even if Orenica *et al.*⁴³ report that the DP was ineffective at the exclusion of *Salmonella* spp when compared with the same undefined probiotic used here.

a los otros dos grupos desafiados. No hubo diferencia entre grupos en los aislamientos de SE PT13^A a partir de tonsilas cecales. Los grupos testigos negativos no presentaron crecimiento de *Salmonella* spp.

Invasión y colonización de *Salmonella* spp en aves tratadas con el probiótico definido criadas en corrales de piso

En el Cuadro 2 se observa que al día 13 de edad, SE PT13^A invadió hasta 75% de hígado-bazo en el grupo semilla, proporción mayor ($P < 0.05$) al 27.5% observado en el testigo negativo; el grupo con PECD mostró una invasión de sólo 7.5%, diferente ($P < 0.05$) a la observada en los otros dos grupos. La tasa de colonización de SE PT13^A en tonsilas cecales del grupo semilla fue completa (100%); sin embargo, no fue diferente al 57.5% de colonización observada en el testigo negativo, aunque sí difirió ($P < 0.05$) del grupo con PECD (25%), que a su vez fue menor y diferente ($P < 0.05$) del testigo negativo. El Cuadro 2 muestra que al día 15 de edad la invasión de SE PT13^A a hígado-bazo en el grupo semilla fue de 57.5%, proporción mayor ($P < 0.05$) al 10% observado en el grupo testigo negativo y al 12.5% del grupo complementado con el probiótico definido; estos dos últimos grupos no fueron diferentes entre sí. En el Cuadro 2 se ve que SE PT13^A colonizó 87.5% de tonsilas cecales del grupo semilla, lo cual fue significativamente mayor ($P < 0.05$) al 27.5% que se registró en el grupo testigo negativo y al 42.5% del grupo con el PECD; estos dos grupos no difirieron entre sí.

Invasión y colonización de *Salmonella* spp en aves tratadas con diferentes dosis del probiótico definido

En el Cuadro 3 se observa que al día ocho de edad no hubo diferencias entre grupos en el porcentaje de aislamientos de SE PT13^A a partir de hígado-bazo o tonsilas cecales. Al día 14 de edad en el grupo testigo positivo se aisló 34.6% de SE PT13^A a partir de hígado-bazo y 96.1% a partir de tonsilas cecales; proporciones significativamente mayores ($P < 0.05$) al grupo que inicialmente recibió al día uno de edad el PECD y que posteriormente recibió dos dosis de refuerzo (a los seis y 12 días de edad); este grupo mostró la menor tasa de invasión y colonización de SE PT13^A (4.5% en hígado-bazo y 22.7% en tonsilas cecales). El grupo que recibió una sola dosis de PECD presentó 17.2% de invasión a hígado-bazo y 62.0% de colonización en tonsilas cecales, éste no fue diferente a los otros dos grupos. Al día 24 de edad no hubo diferencia entre los grupos en la proporción de aislamientos de SE PT13^A a partir de cualquiera de los órganos evaluados (Cuadro 3).

Cuadro 1

EXCLUSIÓN DE *Salmonella enterica* SEROVARIEDAD ENTERITIDIS PT-13^A A LOS DÍAS 12 Y 20 DE EDAD, A PARTIR DE HÍGADO-BAZO Y TONSILAS CECALES DE AVES DE LA RAZA LEGHORN QUE RECIBIERON PREVIAMENTE AL DÍA DE EDAD UN PROBIÓTICO DEFINIDO O UN PROBIÓTICO CON MICROBIOTA NO DEFINIDA

EXCLUSION OF *Salmonella enterica* SEROVAR ENTERITIDIS PT-13^A AT DAYS 12 AND 20 OF AGE, FROM SPLEEN-LIVER AND CECAL TONSILS OF LEGHORN BIRDS THAT RECEIVED A PROBIOTIC WITH DEFINED OR UNDEFINED MICROBIOTA PRIOR TO ONE DAY OF AGE

Group	12 days of age		20 days of age	
	Liver-spleen	Cecal tonsils	Liver-spleen	Cecal tonsils
(A) Control –	0/60* (0.00%)* ^B	0/60 (0.00%) ^B	0/60 (0.00%) ^C	0/60 (0.00%) ^B
(B) Defined probiotic	30/60 (50.0%) ^A	41/60 (68.3%) ^A	13/60 (21.7%) ^B	43/60 (71.7%) ^A
(C) Undefined probiotic	22/60 (36.7%) ^A	41/60 (68.3%) ^A	22/60 (36.7%) ^{AB}	50/60 (57.5%) ^A
(D) Control +	27/60 (45.0%) ^A	51/60 (85.0%) ^A	31/60 (51.7%) ^A	52/60 (86.7%) ^A

*Values in each column with different literal are statistically different, J² (P < 0.05).

**The proportion indicated in the parentheses indicates the degree of invasion to liver-spleen or cecal tonsils 24 hours after challenge with *Salmonella* spp.

Cuadro 2

INVASIÓN A HÍGADO-BAZO Y COLONIZACIÓN DE TONSILAS CECALES DE *Salmonella enterica* SEROVARIEDAD ENTERITIDIS PT-13^A EN AVES DE LA RAZA LEGHORN QUE RECIBIERON UN PROBIÓTICO DEFINIDO AL DÍA DE EDAD Y QUE CONVIVIERON DURANTE 12 O 14 DÍAS CON AVES INOCULADAS CON *Salmonella* AL DÍA 3 DE EDAD Y CON AVES CENTINELA QUE NO RECIBIERON TRATAMIENTO NI DESAFÍO

LIVER-SPLEEN INVASION AND COLONIZATION OF CECAL TONSILS BY *Salmonella enterica* SEROVAR ENTERITIDIS PT-13^A IN LEGHORN BIRDS THAT RECEIVED A DEFINED PROBIOTIC AT ONE DAY OF AGE AND LIVED FOR 12 OR 14 DAYS WITH BIRDS INOCULATED WITH *Salmonella* ON DAY 3 OF AGE AND WITH SENTINEL BIRDS THAT RECEIVED NO TREATMENT OR CHALLENGE

Group	13 days of age*		15 days of age*	
	Liver-spleen	Cecal tonsils	Liver-spleen	Cecal tonsils
E (<i>Salmonella</i> spp)	30/40 (75.0%) ^A	40/40 (100.0%) ^A	23/40 (57.5%) ^A	35/40 (87.5%) ^A
F (Control –)	11/40 (27.5%) ^B	23/40 (57.5%) ^A	4/40 (10.0%) ^B	11/40 (27.5%) ^B
G (Defined probiotic)	3/40 (7.5%) ^C	10/40 (25.0%) ^B	5/40 (12.5%) ^B	17/40 (42.5%) ^B

*Test conducted in floor pens: The bacterial isolation from liver-spleen and cecal tonsils was made ten or 12 days after challenge for all birds.

**The values of the sum of the two replicates in each column with different literal are statistically different by the J² test (P < 0.05). Values in parentheses indicate percentage of invasion to liver-spleen or cecal tonsi.

It was also noted that the birds of the UDP group showed fewer *Salmonella* amounts ($0.48 \log_{10}$ CFU/g of cecal contents) after challenge with 3×10^4 CFU/bird of SE than that observed in the DP group ($5.73 \log_{10}$ CFU/g cecal content), while the positive control presented $7.44 \log_{10}$ CFU/g of SE in cecal contents. In a similar evaluation, Orenca *et al.*⁴³ noted that although the two probiotics exerted a reduction in the number of birds infected with *Salmonella* (UDP 30.0%; DP 26.7%) this was not different from that of the positive control (36.7%). According to the above, the results of Orenca *et al.*⁴³ are similar to those found in a similar date to the first experiment of this study. Furthermore, it should be noted that these authors made their assessment at nine days of age, while in this study evaluation was carried out three days later, when the proportion of *Salmonella* positive birds in liver-spleen showed a better exclusion trend with the UDP treatment. However, this trend was not observed in the number of *Salmonella* positive birds in cecal tonsils, which was similar to the DP group. This difference could be due to the methodology used, as in the present model bacterial cultures enriched with

Prueba de inocuidad y serotipificación de las muestras positivas a *Salmonella* spp

Las muestras de la prueba de inocuidad bacteriológica resultaron negativas al aislamiento de *Salmonella* spp. Las colonias sospechosas que crecieron en AVB fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas; se determinó que 100% correspondía a *Salmonella* spp móvil. En la serotipificación a partir de las mismas muestras, se determinó que éstas correspondieron a *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis (grupo D1; O:1,9,12; H:g,m).

Discusión

Los probióticos utilizados en el presente estudio disminuyen significativamente la infección por *Salmonella* en órganos internos o tonsilas cecales de aves de la raza Leghorn. El PECD fue más efectivo en la exclusión a los 20 días de edad. Al proporcionar una dosis idéntica de PECD a las aves de un día de edad. Schneitz *et al.*³⁸ obtuvieron una protección aceptable contra la infección por *Salmonella* al día 19 de edad, las

Cuadro 3

EFFECTO DE UN PROBIÓTICO CON MICROBIOTA DEFINIDA ADMINISTRADO EN AVES DE LA RAZA LEGHORN AL DÍA DE EDAD EN UNA SOLA DOSIS O CON REFUERZO ADICIONAL^A LOS DÍAS SEIS,* 12* Y 22* DE EDAD, SOBRE LA RECUPERACIÓN DE *Salmonella enterica* SEROVARIEDAD ENTERITIDIS PT-13^A A PARTIR DE HÍGADO-BAZO Y TONSILAS CECALES DE AVES DESAFIADAS PREVIAMENTE
EFFECT OF A PROBIOTIC WITH DEFINED MICROBIOTA ADMINISTERED TO LEGHORN BIRDS AT DAY ONE OF AGE IN A SINGLE DOSE OR ADDITIONAL BOOSTER^A ON DAYS SIX,* 12* Y 22* OF AGE ON THE RECOVERY OF *Salmonella enterica* SEROVAR ENTERITIDIS PT-13^A FROM LIVER-SPLEEN AND CECAL TONSILS OF PREVIOUSLY CHALLENGED BIRDS

Group	8 days**		14 days**		24 days**	
	LS	CT	LS	CT	LS	CT
H Probiotic	7/27*** (25.9%) ^A	23/27 (85.2%) ^A	5/29 (17.2%) ^{AB}	18/29 (62.0%) ^{AB}	10/28 (35.7%) ^A	26/28 (92.8%) ^A
I Booster	6/28 (21.4%) ^A	23/28 (82.1%) ^A	1/22 (4.5%) ^B	5/22 (22.7%) ^B	12/28 (42.8%) ^A	22/28 (78.5%) ^A
J Control + (Without dosage)	8/26 (30.8%) ^A	25/26 (96.1%) ^A	9/26 (34.6%) ^A	25/26 (96.1%) ^A	16/26 (61.5%) ^A	26/26 (100.0%) ^A

*Tests conducted in battery cages: The probiotic dosage was done 24 hours prior to challenge with *Salmonella* spp.

**The bacterial recovery from spleen-liver and cecal tonsils was carried out 24 hours after challenge with *Salmonella* spp.

***Values in each column with different literal are statistically different by Ji² test (P < 0.05). The percentages in the parentheses indicates the degree of invasion to liver-spleen or cecal tonsils.

iodine tetrathionate broth may increase the detection of very small amounts of *Salmonella* CFU, while the quantification of CFU per gram of cecal contents is subjected to greater uncertainty factors in trying to quantify the exact amount of CFU, besides being more complicated, less sensitive and the epizootical evaluation assess only individuals and not populations, so that it is quantitatively less appropriate.^{36,39,40,44} An additional factor that may explain this difference is that the quantification of *Salmonella* bacterial growth in this study was done in the logarithmic phase of higher bacterial growth, which favors the specificity and sensitivity of the test.^{40, 44}

Although the UDP showed protection trend at 12 days old, it was never different from the positive control. This apparent low effectiveness to exclude *Salmonella* by this probiotic was probably due to inadequate establishment of its microbiota in cecum, despite Nurmi and Rantala²⁹ report of appropriate resistance to infection by SI in one-day-old broiler chicks, just 24 hours after NIM administration from adult birds. It was also determined that even if some chicks showed infection after oral challenge, the amount of SI in the cecum was 1×10^2 to 1×10^3 CFU per gram of cecal content instead of 1×10^6 to 1×10^9 CFU that were observed in birds that did not receive microflora from adult birds.

The present study showed a similar trend as the number of isolates from cecal tonsils was lower in the groups receiving the two types of probiotics in contrast to the positive control which showed the greatest amount of isolations, which indicates that probiotics have a tendency to decrease the *Salmonella* colonization in this part of the intestinal tract along with an important process of exclusion. A difference of this study regarding the work of Nurmi and Rantala,²⁹ Schneitz and Hakkinen⁴⁵ and Orenca *et al.*,⁴³ was that evaluations on days 12 and 20 were determined by the number of *Salmonella* positive birds, not by the quantity CFU in blind sacs content.

Nakamura *et al.*³⁹ administered UDP to one-day-old chicks and challenged them after six hours (7.5×10^6 CFU of *Salmonella*/bird), finding that even when elimination of *Salmonella* in feces could not be completely reduced, there was a difference ($P < 0.05$) compared with the positive control, although this difference could be observed until 14 days after probiotic administration, two days after the first evaluation of this study.

The difference between the observed by Nakamura *et al.*³⁹ and the present study was probably due to methodological details (species of *Salmonella* and CFU used in the challenge). These authors identified *Salmonella* from cloacal swabs, while the test performed here was done through direct recovery of *Salmonella*

aves con PECD mostraron únicamente $0.4 \log_{10}$ UFC/g de contenido cecal, lo cual constituye una cantidad menor a las aves testigo que no lo recibieron ($2.9 \log_{10}$ UFC/g) y que fueron desafiadas previamente al día 15 de edad con una dosis alta de *S. enterica*, serovariedad Infantis (SI) (6×10^7 UFC/ave).

En el presente estudio el grupo que recibió PECD mostró al día 13 de edad disminución en la invasión de SE PT13^A a tonsilas cecales, esa tendencia se observó con la concomitante traslocación bacteriana y aislamientos positivos en hígado y bazo; sin embargo, no hubo diferencia estadística con el grupo testigo. en este contexto, Schneitz *et al.*,³⁸ al administrar el PECD en aves de un día de edad, observaron protección desde el día siete de edad; aunque las aves de este estudio mostraron mayor cantidad de SI con respecto a la observada en su evaluación posterior al día 19, Schneitz *et al.*³⁸ sí observaron diferencia significativa entre PECD y el grupo testigo.

Se ha mencionado que los probióticos indefinidos disminuyen también la infección contra *Salmonella*; sin embargo, en el presente estudio el PECND no fue capaz de disminuir la colonización de *Salmonella* en la misma proporción que lo hizo el probiótico definido; aun cuando Orenca *et al.*,⁴³ por ejemplo, mencionan que el PECD fue poco eficaz en la exclusión de *Salmonella* spp cuando lo compararon con el mismo probiótico no definido utilizado aquí.

Asimismo, observaron que las aves del grupo con PECND presentaron menor cantidad de *Salmonella* ($0.48 \log_{10}$ UFC/g de contenido cecal) después del desafío con 3×10^4 UFC/ave de SE que lo observado en las aves del grupo con PECD ($5.73 \log_{10}$ UFC/g de contenido cecal), mientras que el testigo positivo presentó $7.44 \log_{10}$ UFC de SE/g en contenido cecal. En la evaluación proporcional similar a la efectuada en el presente estudio, Orenca *et al.*⁴³ observaron que si bien los dos probióticos ejercen una reducción en el número de aves infectadas por *Salmonella* (PECND 30.0%; PECD 26.7%) ésta no fue diferente a la del testigo positivo (36.7%). De acuerdo con lo anterior, los resultados de Orenca *et al.*⁴³ son similares a los encontrados en la fecha análoga al primer experimento del presente estudio; además, se debe considerar que estos autores efectuaron su evaluación a los nueve días de edad, mientras que en el presente estudio la evaluación se efectuó tres días después, fecha en que la proporción de aves positivas a *Salmonella* en hígado-bazo mostró una tendencia de mejor exclusión con el PECND; sin embargo, esta tendencia no se constató en el número de aves positivas a *Salmonella* en tonsilas cecales, la cual fue similar al grupo complementado con PECD. Esta diferencia se pudo deber a la metodología usada, ya que en el presente modelo los cultivos bacterianos enriquecidos con caldo tetrationato

from internal organs and cecal tonsils, methodology that along with enrichment, shows great potential for exponential growth detection of a small amount of UFC.^{36,39,40} Additionally, Nakamura *et al.*³⁹ recovered *Salmonella* from internal organs at day 22 of age, but found no differences between the UDP group and positive control. These results are consistent with the findings of this study, the UDP taken provoked a slight decrease in SE colonization of internal organs, but it was not different from the positive control, whereas the DP was indeed different.

The undefined probiotic showed the same rate of invasion to internal organs on the two dates evaluated, while the DP shows a gradual increase in protection, which was possibly due to a gradual establishment of its microbiota, although assessment at day 12 did not differ with respect to the positive control, but it did on day 20. This coincides with Barnes *et al.*,²⁵ who determined that the full establishment of the microbiota occurs between three and six weeks of age. According to the aforementioned, the latter determined that the establishment of the microbiota may vary with conditions of health, breeding and feeding rate.

Another reason for the difference in the effectiveness of the probiotics tested is their composition, although it is known in the DP, it may vary in the UDP in amount and type of microorganisms present. Various studies have documented the role that different types of *Lactobacillus* show on their effectiveness in the exclusion of enteric pathogens, a single type of *Lactobacillus* may show different capacities of adhesion, survival, effectiveness or exclusion degree,^{16,17,23,26,32,33} making it likely that each one of the evaluated probiotics, having different microorganisms within its composition provoke interaction of these within the microbiota of the evaluated birds and, test after test, yield different results. This interaction has been little studied, and possibly helps to explain the degree of effectiveness in *Salmonella* exclusion by probiotics. In addition, some researchers have indicated that less than 40% of the microbiota of domestic birds have been grown and identified satisfactorily.^{12, 13,16,27}

The DP managed to obtain a lower number of SE PT13^A positive birds than the positive group and even the UDP group, even though it could not completely exclude *Salmonella* infection, from the epidemiological point of view its action is important because it contributes to reduce the spread of *Salmonella* in poultry treated with probiotics to non-infected birds.^{15,20,29,40}

The defined probiotic colonizes the cecum of birds and inhibits *Salmonella* colonization. According to the manufacturer, the product bacteria were selected based on their ability to adhere to the cecal epithelium,

yodado pueden potenciar la detección de muy pequeñas cantidades de UFC de *Salmonella*, mientras que la cuantificación de UFC por gramo de contenido cecal se encuentra condicionada a factores de mayor incertidumbre al tratar de cuantificar la cantidad exacta de UFC, además de ser más complicada, menos sensible y evaluar de manera epizootiológica sólo individuos y no poblaciones, de manera que es cuantitativamente menos apropiada.^{36,39,40,44} Un factor adicional que puede explicar esta diferencia es que la cuantificación del crecimiento bacteriano de *Salmonella* en el presente estudio se efectúa en la fase logarítmica de mayor crecimiento bacteriano, lo cual favorece la especificidad y sensibilidad de la prueba.^{40,44}

Aunque el PECND mostró tendencia de protección a los 12 días de edad, nunca fue diferente al testigo positivo. Esta aparente baja efectividad para excluir *Salmonella* por parte de este probiótico posiblemente se debió a un inadecuado establecimiento de su microbiota en los sacos ciegos, aun cuando Nurmi y Rantala²⁹ mencionan una resistencia adecuada a la infección por SI en pollitos de engorda de un día de edad, tan sólo 24 horas después de la administración de MNI proveniente de aves adultas. Asimismo, determinaron que aun cuando algunos pollitos mostraron infección después del desafío oral, la cantidad de SI en el ciego fue de 1×10^2 a 1×10^3 UFC por gramo de contenido cecal en lugar de 1×10^6 a 1×10^9 UFC que se observaron en las aves que no recibieron la microbiota proveniente de las aves adultas.

En el presente estudio se mostró una tendencia similar, ya que la cantidad de aislamientos a partir de tonsilas cecales fue menor en los grupos que recibieron los dos tipos de probióticos a diferencia del testigo positivo que mostró mayor cantidad de aislamientos, lo cual indica que los probióticos muestran tendencia a disminuir la colonización por *Salmonella* en esta parte del tracto intestinal, así como un relevante proceso de exclusión. Una diferencia del presente estudio en relación con el trabajo de Nurmi y Rantala,²⁹ Schneitz y Hakkinen⁴⁵ y Orenca *et al.*,⁴³ fue que en las evaluaciones de los días 12 y 20 se determinó el número de aves positivas a *Salmonella* y no la cantidad de UFC en el contenido de sacos ciegos.

Nakamura *et al.*,³⁹ al administrar PECND a pollos de un día de edad y desafiarlos seis horas después (7.5×10^6 UFC/ave de *Salmonella*), determinaron que aun cuando no lograba reducir por completo la eliminación de *Salmonella* en heces, sí hubo diferencia ($P < 0.05$) con respecto al testigo positivo, aunque esta diferencia la pudieron observar hasta 14 días después de administrado el probiótico, dos días después de la primera evaluación del presente estudio.

La diferencia entre lo observado por Nakamura *et al.*³⁹ y el presente estudio posiblemente se debió a

making it likely that its main action occurs in this site and that the exclusionary effects reported by different researchers occur at this level as well.^{15,16,29} This indirectly creates a situation observed in the present study when the difference between the total number of birds infected with *Salmonella* at internal organ level (spleen and liver) was determined regarding the same birds positive to *Salmonella* in cecal tonsils.

Generally, when there were more birds with isolates of *Salmonella* in cecal tonsils, there was proportionally a greater number of infected birds in internal organs (liver, spleen). Likewise, when there were less birds positive in cecal tonsils there were fewer birds infected with *Salmonella* in internal organs.^{21,40,46,47} This shows the relevance of the use of probiotics in commercial poultry. However, according to the results of this study, commercial probiotics are not always the same, although there are several authors who mentioned a high degree of protection from undefined probiotics.^{9,24,31,39,43} Their use represents a risk because the microorganisms that compose them are not fully characterized and may cause an infectious problem, besides the variability of their results is high, possibly due to the heterogeneous composition of the microbiota contained.

Some researchers provide different results when comparing a defined with an undefined probiotic, so in the future a standardized methodology must be established to assess the same premises for each probiotic.⁹

The dosage that included the DP reinforcement in three occasions showed significant exclusion of *Salmonella* after the second week of evaluation. This improvement was probably due to the efficient action of lactic-acid bacteria that promote subsequent colonization of bacteria in the same type and restrictive conditions against growth of other bacteria by altering the intestinal environment, limiting nutrients or blocking intestinal bacterial receptors, which represent different mechanisms documented by several authors.^{9,12,13,15-17}

The significant exclusion observed in the second week was probably due to the quick establishment of the microbiota, which is opposed to that indicated by Barnes *et al.*²⁵ and Nurmi and Rantala,²⁹ who mention that the colonization of microbiota is slow and sometimes lasts four to six weeks after hatching. However, it must be noted that even though the probiotic manufacturer recommends a single application at one day of age, under the dosage schedule of this study the protective effect was achieved since the second week of age, though this effect required at least three applications.

Tellez *et al.*⁴⁷ evaluated a probiotic containing *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus faecium*, administered by spray with specific antibodies against

detalles metodológicos (especie de *Salmonella* y UFC usadas en el desafío). Dichos autores realizaron la determinación de *Salmonella* a partir de hisopos cloacales, mientras que la determinación realizada aquí se hizo a través de la recuperación directa de *Salmonella* en órganos internos y tonsilas cecales, metodología que junto con el método de enriquecimiento muestra un gran potencial para la detección del crecimiento exponencial de una pequeña cantidad de UFC.^{36,39,40} Adicionalmente, Nakamura *et al.*³⁹ recuperaron *Salmonella* de órganos internos al día 22 de edad; sin embargo, no observaron diferencias en el contenido de *Salmonella* entre el grupo tratado con PECND y el testigo positivo. Estos resultados coinciden con los hallazgos del presente estudio; el PECND logró una ligera disminución en la colonización de los órganos internos por parte de SE; sin embargo, no fue diferente al testigo positivo, mientras que con el PECD sí hubo diferencia.

El probiótico no definido muestra la misma tasa de invasión a órganos internos en las dos fechas evaluadas, en tanto que el definido presenta un aumento gradual de protección, lo que se debió posiblemente a un progresivo establecimiento de su microbiota, aunque a los 12 días de evaluación no hubo diferencia estadística respecto del testigo positivo, al día 20 de edad sí la hubo, lo cual coincide con lo observado por Barnes *et al.*,²⁵ quienes determinaron que el establecimiento completo de la microbiota ocurre entre las tres y seis semanas de vida del ave; de acuerdo con lo anterior, estos últimos determinaron que el establecimiento de la microbiota puede variar según las condiciones de higiene, tipo de crianza y alimentación.

Otra razón de la diferencia en la efectividad de los probióticos evaluados es su composición, aunque en el PECD ésta se conoce al estar predeterminada, en el PECND puede variar en cantidad y tipo de microorganismo presente. Diversas investigaciones han documentado el papel que muestran diferentes tipos de *Lactobacillus* sobre su efectividad en la exclusión de patógenos entéricos, un solo tipo de *Lactobacillus* puede mostrar diferentes capacidades de adherencia, sobrevivencia o efectividad en el grado de exclusión que induce,^{16,17,23,26,32,33} por lo cual es factible que cada uno de los probióticos evaluados al contener diferentes microorganismos dentro de su composición propicien la interacción de éstos con la microbiota de las aves evaluadas y resulte diferente ensayo tras ensayo. Esta interacción se ha estudiado poco y posiblemente contribuye a explicar el grado de efectividad en la exclusión de *Salmonella* por los probióticos, adicionalmente algunos investigadores han indicado que menos del 40% de la microbiota de las aves domésticas se ha cultivado e identificado satisfactoriamente.^{12,13,16,27}

SE, ST and *S. heidelberg* at one-day-old chicks, dosed in drinking water during the first five days of age and then two additional doses on days ten and 14 of age. They observed protection against *Salmonella* from day one of age, which was kept until processing of poultry (42 days). When treatment was reinforced in drinking water, the authors were able to reduce up to 2 Log₁₀ of *Salmonella* in the cecum of to the control group, which throughout the study showed a higher amount of *Salmonella* in the gastrointestinal tract. Although these researchers did not include a control group with a single dose of the probiotic at day one of age, the reinforced treatment in drinking water had similar results to the repeat doses group of this study. It is recommended to administer probiotics from day one of age, based on the findings of this study and the time required for the establishment of the probiotic microbiota, since Nurmi and Rantala²⁹ have proved that *Salmonella* can infect birds from the first 24 hours of life. Recent research has shown that the embryo has a microbiota at the time of hatching, which is believed to be acquired through the pores of the shell during the last third of the incubation process.

In contrast to the results of this study, Schneitz and Hakkinen⁴⁵ did not find difference in protection against SI between two treatments similar to those used here. Their first treatment consisted of applying once a defined probiotic analogous to the present study; the second was administered five times to the same birds over a period of two weeks at intervals of two to three days and noted that both treatments worked similarly to reduce the number of *Salmonella* positive birds, while in the present study the booster dose method performed best. These differences probably were caused by the dynamic variation of the probiotic microbiota during its establishment, or by the degree of viability (expiration), variables that are currently not fully understood.

The positive control group was not different from the DP groups regarding the isolates from liver-spleen and cecal tonsils made at eight and 24 days old. This could be linked to the effect of the large number of *Salmonella* used in the inoculum (1×10^8 CFU /bird) because when compared with the doses used for the recreation of the worst scenario of infection in field proposed by Schneitz and Hakkinen⁴⁵ (6.0×10^7 CFU/bird) and Priyankarage *et al.*³⁰ (2.0×10^6 CFU/bird), for some undetermined reason, the DP did not exerted the exclusion expected on the evaluation dates. A method of titration of the inoculum prior to challenge should be considered in future studies with the aim of determining the optimal degree of infection at different probabilistic levels of field challenge.

The administration of DP in one-day-old birds in the safety test on floor, indirectly reduced *Salmonella* infection in the untreated control group, compared with

El PECD logró que la cantidad de aves positivas a SE PT13^A fuera menor al grupo positivo e incluso al PECND; sin embargo, aunque no logró excluir por completo la infección por *Salmonella*, desde el punto de vista epizootiológico su acción es importante, ya que contribuye a disminuir la difusión de *Salmonella* de aves tratadas con probióticos a aves no infectadas.^{15,20,29,40}

El probiótico definido coloniza el ciego de las aves e inhibe la colonización por *Salmonella*; de acuerdo con el fabricante, las bacterias del producto fueron seleccionadas con base en su capacidad de adhesión al epitelio cecal, por lo cual es previsible que su acción principal ocurra en este sitio y que los efectos de exclusión referidos por diferentes investigadores ocurran también a este nivel,^{15,16,29} lo cual provoca una situación indirectamente observada en el presente estudio al determinar la diferencia entre el total de aves infectadas por *Salmonella* a nivel de órganos internos (bazo e hígado) con respecto a las mismas aves positivas a *Salmonella* en tonsilas cecales.

De forma general, cuando hubo mayor número de aves con aislamientos de *Salmonella* en tonsilas cecales proporcionalmente se observó mayor cantidad de aves infectadas en órganos internos (hígado-bazo), a diferencia de cuando existió menor cantidad de aves positivas en tonsilas cecales con menor cantidad de aves infectadas con *Salmonella* en órganos internos.^{21,40,46,47} Lo anterior muestra la relevancia del uso de los probióticos en la avicultura comercial; sin embargo, de acuerdo con los resultados del presente estudio, los probióticos comerciales no siempre son iguales, aunque existen diferentes autores que mencionan un alto grado de protección por parte de los probióticos de tipo indefinido,^{9,24,31,39,43} su uso representa un riesgo, ya que los microorganismos que lo integran no están completamente caracterizados y pueden dar origen a un problema infeccioso, además la variabilidad de sus resultados es alta, posiblemente debido a la composición heterogénea de la microbiota que contienen.

Al comparar un probiótico definido con otro indefinido, algunos investigadores proporcionan resultados distintos, por lo cual en lo futuro se debe plantear una metodología estandarizada capaz de evaluar bajo las mismas premisas cada uno de los probióticos utilizados.⁹

La dosificación que contempló el reforzamiento con PECD por tres ocasiones mostró exclusión significativa de *Salmonella* después de la segunda semana de evaluación, ésta mejora posiblemente se debió a la acción eficiente de bacterias de tipo ácido-lácticas que favorecen la subsiguiente colonización de bacterias de este mismo tipo y que promueven condiciones restrictivas para el crecimiento de otro tipo de bacterias al modificar el ambiente intestinal, limitar nutrientes

the seed group inoculated with *Salmonella* at day three of age. This suggests that the microbiota contained in the defined probiotic showed rapid horizontal transmission, since *Salmonella* inoculation in the seed group was done at day three of age. In this context, the microbiota may have colonized the intestine of untreated birds with the probiotic before they were infected with *Salmonella* from the seed group. However, by not having a negative control group that had been in total isolation without living together the first three days before the challenge with the seed group, this statement can not conclusively verified with the methodology here used.⁴⁰

Although the degree of protection against *Salmonella* could be assessed in the DP group, in the control group transmission of *Salmonella* was only evaluated from the seed group since day three until evaluation dates. Snoeyenbos *et al.*²⁴ determined the transmission of microflora from the fifth day of age and although the exact conditions under which a primary culture possess adequate exclusion effects, have not been established, some progress has been done. Starvric⁴⁸ observed that birds of one day of age treated with a probiotic from adult birds, were useful as donors to collect beneficial microbiota just six hours after administration of the product. However, according to Snoeyenbos *et al.*,²⁴ *Salmonella* can be released in significant amounts 18 hours after inoculation, so that the microbiota could colonize the chicken before the onset of release of *Salmonella* and horizontal transmission, which is a good perspective for evaluating the action of probiotics administered from the hatchery.

By comparing the degree of infection in seed, control and DP groups, the latter presented a lower number of birds infected with *Salmonella*, which agrees with the results of Nava⁴⁰ and Snoeyenbos *et al.*²⁴ It is feasible that a certain amount of microbiota passed from DP group, according to Snoeyenbos *et al.*²⁴ and Nava,⁴⁰ this group received the probiotic three days before *Salmonella* inoculation to the seed group. The decline in isolations performed at 13 days of age from liver-spleen in the control group, was probably lower regarding the seed group, due to this early transmission of microbiota, which, although feasible, can not be verified. Another possibility is that in the seed group *Salmonella* was not transmitted properly during the evaluation period (ten and 12 days). This indicates that the pathogenicity of the strain used (SE PT13^A) was different to the one used by Nava.⁴⁰ One way to check whether the microbiota is transmitted to the control group would be to carry out a discrimination analysis using 16S of rRNA as specific marker for microbial populations that invade at cecum level in this group before their contact with the seed group,^{26,27} or to verify the number of *Salmonella* CFU in stool day after day after inoculation of the seed group.

Even though the 13-day-old *Salmonella* isolates

o al ocupar receptores bacterianos en intestino, que representan mecanismos documentados por diferentes autores.^{9,12,13,15-17}

La exclusión significativa observada en la segunda semana posiblemente se debió a que la microbiota se estableció rápidamente, lo cual se contrapone a lo indicado por Barnes *et al.*²⁵ y Nurmi y Rantala,²⁹ quienes mencionan que la colonización de la microbiota es lenta y llega a tardar hasta cuatro o seis semanas después de la eclosión. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que aunque el fabricante del probiótico recomienda una sola aplicación al día de edad, bajo el esquema de dosificación del presente estudio el efecto protector se logró desde la segunda semana de edad, aunque para lograr este efecto se requirió de al menos tres aplicaciones del producto.

Al evaluar un probiótico que contenía *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus faecium*, administrado por aspersión junto con anticuerpos específicos contra SE, ST y *S. heidelberg* al día de edad, dosificados en el agua de bebida durante los primeros cinco días y después dos tomas adicionales a los días diez y 14 de edad, Téllez *et al.*⁴⁷ observaron protección contra *Salmonella* desde el día uno de edad, que se conservó hasta el procesamiento de las aves (42 días); al reforzar el tratamiento en el agua de bebida, los autores lograron reducir hasta 2 Log₁₀ de *Salmonella* en sacos ciegos con respecto del grupo testigo, el cual a lo largo del estudio mostró mayor cantidad de *Salmonella* en el tracto gastrointestinal. Aun cuando estos investigadores no incluyeron un grupo testigo con una sola dosis del probiótico al día de edad, en el tratamiento con reforzamiento del probiótico en agua de bebida obtuvieron resultados similares a los del grupo de redosificación del presente estudio. Con base en los hallazgos del presente estudio y en el tiempo requerido para el establecimiento de la microbiota del probiótico, se recomienda que la administración de éstos se efectúe desde el primer día de edad, ya que Nurmi y Rantala²⁹ han probado que *Salmonella* puede infectar a las aves desde las primeras 24 horas de vida. En investigaciones recientes se ha observado que el embrión posee una microbiota al momento de la eclosión, la cual se cree que es adquirida a través de los poros del cascarón durante el último tercio del proceso de incubación.

En contraposición a los resultados del presente estudio, Schneitz y Hakkinen⁴⁵ no observaron diferencia en la protección contra SI entre dos tratamientos similares a los empleados aquí, su primer tratamiento consistió en aplicar una sola vez un probiótico definido análogo al del presente estudio; el segundo lo administraron cinco veces en las mismas aves durante un periodo de dos semanas con intervalos de dos a tres días de aplicación y observaron que los dos tratamientos funcionaron de manera similar al disminuir la cantidad de aves positivas a *Salmonella*, mientras que en el presente estudio el

from cecal tonsils in the defined probiotic group were different from the seed and control groups, respectively, two days after the isolates from liver-spleen and cecal tonsils were only different to the seed group. It is possible that certain amount of the probiotic was transferred to the seed group in those three days prior to inoculation. It is also possible that the latter group at that age, had shown some degree of protection due to non-specific resistance, which probably agrees with Duchet-Suchaux *et al.*³⁷ report related to the intrinsic genetic factor of the breed.

The degree of invasion (liver, spleen) and colonization (cecal tonsils) by *Salmonella* in the seed group at 15 days old, is proportionally less than the assessment made two days earlier, even when the inoculum of *Salmonella* was the same, which possibly was due to birds excluding *Salmonella* in greater numbers as they mature both physiologically and immunologically.^{9,28,35,38} Although the probiotic and control groups did not differ from each other, they show the greatest number of positive *Salmonella* birds than those observed at day 13 of age. Even though the DP group was different to the seed group, at 15 days of age it showed higher percentage of positive birds than those in the control group, specifically at the cecal tonsils level, indicating that the probiotic did not protect as well as it did two days earlier, or that in these replicates there was loss of microbiota or inefficient establishment of DP since day one of age.

Snoeyenbos *et al.*²⁴ showed that the groups treated with probiotics protected birds from 12 days of age, after growing from one day old on contaminated litter with SI, in contrast to birds that did not receive probiotics and who lived in the same experimental pen. While the present study the amount of *Salmonella* in the group without probiotic fell along with the group that did receive it, the mechanism by which this infection is reduced is not yet well clarified. It is possible to infer that the microbiota contained in the DP could have been transmitted horizontally in a short period, or in minimum amounts that were able to decrease the *Salmonella* invasion of internal organs.^{24,25,35,36,40} Competitive exclusion promoted by probiotics is an element of control against colonization by enteric pathogens in commercial poultry; repeat doses of probiotic booster are better than a single dose, and if probiotics are administered on time, they decrease horizontal transmission of *Salmonella*.

Acknowledgements

The Programa de Becas para la Elaboracion de Tesis de Licenciatura (PROBETEL), of the Universidad Nacional Autónoma de México, is thanked for the support given to Lourdes Gonzalez Soto during the

que mejor funcionó recibió la dosis de refuerzo. Estas diferencias posiblemente se debieron a la variación dinámica presentada por la microbiota del probiótico durante su periodo de establecimiento, o a su grado de viabilidad (caducidad), variables que actualmente no se encuentran completamente estudiadas.

En los aislamientos de hígado-bazo y tonsilas cecales efectuados día los días ocho y 24 de edad, el grupo testigo positivo no fue diferente a los grupos tratados con PECD, lo cual pudo estar ligado al efecto de la gran cantidad de *Salmonella* utilizada en el inóculo (1×10^8 UFC/ave), ya que al compararla con las dosis empleadas para la recreación del peor escenario de infección en campo propuesto por Schneitz y Hakkinen⁴⁵ (6.0×10^7 UFC/ave) y por Priyankarage *et al.*³⁰ (2.0×10^6 UFC/ave), por alguna razón sin determinar, el PECD no ejerció la exclusión esperada en las fechas evaluadas; en lo futuro debe considerarse una metodología de titulación del inóculo previa al desafío con la finalidad de determinar el grado óptimo de infección a diferentes niveles probabilísticos de desafío de campo.

En la prueba de protección en piso, la administración del PECD en aves de un día de edad logró disminuir de forma indirecta la infección por *Salmonella* en el grupo testigo no tratado, en comparación con el grupo semilla inoculado con *Salmonella* al día tres de edad, lo cual sugiere que la microbiota contenida en el probiótico definido mostró rápida transmisión horizontal, ya que la inoculación con *Salmonella* en el grupo semilla se efectuó al día tres de edad; en este contexto, la microbiota pudo haber colonizado el intestino de las aves no tratadas con el probiótico antes de que éstas fueran infectadas por la *Salmonella* proveniente del grupo semilla. Sin embargo, al no contar con un grupo testigo negativo que hubiera estado bajo condiciones de aislamiento total sin convivir los tres primeros días antes del desafío con el grupo semilla, con la metodología empleada aquí, no se puede comprobar fehacientemente este planteamiento.⁴⁰

Aunque en el grupo con PECD pudo evaluarse el grado de protección contra *Salmonella*, en el grupo testigo únicamente se analizó la transmisión de *Salmonella* a partir del grupo semilla del día tres hasta las fechas de evaluación. Snoeyenbos *et al.*²⁴ determinaron la transmisión de microbiota a partir del día cinco de edad y aunque no se han establecido con exactitud las condiciones para que un cultivo primario posea efectos adecuados de exclusión, existen algunos avances, Starvric⁴⁸ observó que aves de un día de edad tratadas con un probiótico proveniente de aves adultas, sirvieron como donadoras para recolectar microbiota benéfica tan sólo después de seis horas posteriores a la administración del producto. Sin embargo, de acuerdo con el estudio de Snoeyenbos *et al.*,²⁴ la

preparation of this study. The authors thank Ing. Alejandro Romero Martinez del Sobral, Director General of the Investigación, Desarrollo Integral y Salud group, as well as Dr. Jose Luis Aviles Galvan, Director of Avicola of Incubadora Mexicana S. A. de C. V for the valuable support in the donation of the birds used in this study. Special thanks go to Dr. Carlos G. Gutierrez Aguilar, for his valuable advice on writing and shaping of this manuscript.

Referencias

1. MAHÉ A, BOUGEARD S, HUNEAU-SALAÜN A, LE BOUQUIN S, PETETIN I, ROUXEL S. Bayesian estimation of flock-level sensitivity of detection of *Salmonella* spp., Enteritidis and Typhimurium according to the sampling procedure in French laying-hen houses. *Prev Vet Med* 2008;84:11-26.
2. GUARD-PETTER J. The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. *Environ Microbiol* 2001;3:421-430.
3. URQUIZA BO. Situación actual de la Salmonelosis Aviar. Memorias de las IX Jornadas Médico Avícolas; 2003 febrero 19-21; Universidad Nacional Autónoma de México. México (DF): División de Educación Continua y Departamento de Producción Animal: Aves. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2003:112-119.
4. SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y RECURSOS HIDRÁULICOS. Norma Oficial Mexicana. NOM -005 -ZOO-1993: Campaña nacional contra Salmonelosis Aviar. México (D.F.): SARH, 1994.
5. RABSCH W, HARGIS BM, TSOLIS RM, KINGSLEY RA, HINZ KH, TSCHÄPE, BÄUMLER AJ. Competitive exclusion of *Salmonella enteritidis* by *Salmonella gallinarum* in poultry. *Emerg Infect Dis* 2000;6:443-448.
6. HALD T, VOSE D, WEGENER HC, KOUPEEV T. A Bayesian approach to quantify the contribution of animal-food sources to human salmonellosis. *Risk Anal* 2004;24:255-269.
7. GUTIÉRREZ-GOGCO L, MONTIEL-VÁZQUEZ E, AGUILERA-PÉREZ P, GONZÁLEZ-ANDRADE M. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud en México. *Sal Púb Méx* 2000;42:95.
8. SECRETARÍA DE SALUD. DIRECCIÓN GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA. Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Aparato Digestivo. Serie en Línea: 2008 semana 12. Consultado día 27 de octubre de 2009. México. Disponible en URL: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletín/2008/sem21/pdf/cua4.pdf>
9. REVOLLEDO L, FERREIRA AJP, MEAD GC. Prospects in *Salmonella* control: Competitive exclusion, probiotics, and enhancement of avian intestinal immunity. *J Appl Poult Res* 2006;15:341-351.
10. JOHANSEN SA, GRIFFITH RW, WESLEY IV, SCANES CG. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colonization of the crop in the domestic turkey: Influence of probiotic and prebiotic treatment (*Lactobacillus acidophilus* and lactose). *Avian Dis* 2004;48:279-286.

Salmonella puede liberarse en cantidades significativas desde las 18 horas posteriores a su inoculación, por lo que la microbiota podría colonizar al pollito antes de que la *Salmonella* comience a liberarse y transmitirse de manera horizontal, lo cual constituye una buena perspectiva para la evaluación de la acción de los probióticos administrados desde la planta de incubación.

Al comparar el grado de infección en los grupos semilla, testigo y con PECD, éste presentó menor número de aves infectadas con *Salmonella*, lo cual coincide con los resultados de Nava⁴⁰ y Snoeyenbos *et al.*²⁴ Es factible que se haya transmitido cierta cantidad de microbiota a partir del grupo con PECD, ya que de acuerdo con lo propuesto por Snoeyenbos *et al.*²⁴ y Nava,⁴⁰ este grupo recibió el probiótico tres días antes de inocular la *Salmonella* al grupo semilla; la disminución en aislamientos efectuados a los 13 días de edad a partir de hígado-bazo del grupo testigo, posiblemente fue menor con respecto a los del grupo semilla, debido a esta transmisión temprana de microbiota, lo cual, aunque es factible, no es posible verificarlo. Otra posibilidad es que la *Salmonella* del grupo semilla no se transmitió adecuadamente durante el periodo de evaluación (diez y 12 días), ello indica que la patogenicidad de la cepa empleada (SE PT13^A) fue diferente a la utilizada por Nava.⁴⁰ Una manera de corroborar si la microbiota se transmite al grupo testigo sería efectuar un análisis de discriminación utilizando como marcador la 16S de ARNr específico de las poblaciones microbianas que invaden a nivel cecal a este grupo antes de su contacto con el grupo semilla,^{26,27} o bien verificar la cantidad de UFC de *Salmonella* presente en heces día tras día después de la inoculación del grupo semilla.

Aun cuando a los 13 días de edad los aislamientos de *Salmonella* de tonsilas cecales en el grupo con el probiótico definido fueron diferentes a los grupos semilla y testigo, respectivamente, dos días después los aislamientos en hígado-bazo y tonsilas cecales fueron únicamente diferentes en relación con el grupo semilla. Es posible que cierta cantidad del probiótico se haya transferido al grupo semilla en esos tres días previos a su inoculación; es factible también que este último grupo a esa edad, haya mostrado cierto grado de protección debida a resistencia inespecífica, lo cual probablemente de acuerdo con lo estudiado por Duchet-Suchaux *et al.*³⁷ se relaciona con el factor genético intrínseco de la estirpe.

El grado de invasión (hígado-bazo) y colonización (tonsilas cecales) por *Salmonella* en el grupo semilla a los 15 días de edad, es proporcionalmente menor que en la evaluación efectuada dos días antes, aun cuando el inóculo de *Salmonella* fue el mismo, lo cual posiblemente se debió a que las aves excluyen a la *Salmonella* en mayor cantidad conforme van madurando tanto fisiológica

11. FULTON RM, NERSESSIAN BN, REED WM. Prevention of *Salmonella enteritidis* infection in commercial ducklings by oral chicken egg-derived antibody alone or in combination with probiotics. *Poult Sci* 2002;81:34-40.
12. LAN PTN, BINH LT, BENNO Y. Impact of two probiotic *Lactobacillus* strains feeding on fecal lactobacilli and weight gains in chicken. *J Gen Appl Microbiol* 2003;49:29-36.
13. KOENEN ME, KRAMER J, VAN DER HULST R, HERES L, JEURISSEN SHM, BOERSMA WJA. Immunomodulation by probiotic lactobacilli in layer- and meat-type chickens. *Br Poult Sci* 2004; 45:355-366.
14. AKBAR MR, HAGHIGHI HR, CHAMBERS JR, BRISBIN J, READ LR, SHARIF S. Expression of antimicrobial peptides in cecal tonsils of chickens treated with probiotics and infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15:1689-1693.
15. STERN NJ, COX NA, BAILEY JS, BERRANG ME, MUSGROVE MT. Comparison of mucosal competitive exclusion and competitive exclusion treatment to reduce *Salmonella* and *Campylobacter* spp colonization in broiler chickens. *Poult Sci* 2001; 80:156-160.
16. EHRMANN MA, KURZAK P, BAUER J, VOGEL RE. Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *J Appl Microbiol* 2002; 92:966-975.
17. LA RAGIONE RM, NARBAD A, GASSON MJ, WOODWARD MJ. *In vivo* characterization of *Lactobacillus johnsonii* F19785 for use as a defined competitive exclusion agent against bacterial pathogens in poultry. *Lett in Appl Microbiol* 2004; 38:197-205.
18. GIL DE LOS SANTOS JR, STORCH OB, GIL-TURNES C. *Bacillus cereus* var. Toyoi and *Saccharomyces boulardii* increased feed efficiency in broilers infected with *Salmonella enteritidis*. *Br Poult Sci* 2005; 46:494-497.
19. TSAI CC, HSIH HY, CHIU HH, LAI YY, LIUC JH, YU B *et al*. Antagonistic activity against *Salmonella* infection *in vitro* and *in vivo* for two *Lactobacillus* strains from swine and poultry. *Inter J Food Microbiol* 2005; 102:185-194.
20. FRITTS CA, KERSEY JH, MOTL MA, KROGER EC, YAN E, SIJ *et al*. *Bacillus subtilis* C-3102 (Calsporin) improves live performance and microbiological status of broiler chicken. *J Appl Poult Res* 2000; 9:149-155.
21. REVOLLEDO L, FERREIRA CS, FERREIRA AJ. Prevention of *Salmonella typhimurium* colonization and organ invasion by combination treatment in broiler chicks. *Poult Sci* 2009;88:734-743.
22. VAN COILLIE E, GORIS J, CLEENWERCK I, GRIJSPEERDT K, BOTTELDOORN N, VAN IMMERSEEL F. Identification of lactobacilli isolated from the cloaca and vagina of laying hens and characterization for potential use as probiotics to control *Salmonella enteritidis*. *J Appl Microbiol* 2007;102:1095-1106.
23. LIN WH, YU B, JANG SH, TSEN HY. Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe* 2007; 13:107-113.
24. SNOEYENBOS GH, WEINACK OM, SMYER FC. Protecting chicks and poults from *Salmonellae* by oral

como inmunológicamente.^{9,28,35,38} Aunque los grupos testigo y probiótico no son diferentes entre sí, muestran mayor número de aves positivas a *Salmonella* que las observadas al día 13 de edad; sin embargo, aunque el PECD fue diferente al grupo semilla, a los 15 días de edad mostró mayor porcentaje de aves positivas que las observadas en el grupo testigo, específicamente a nivel de tonsilas cecales, lo cual indica que el probiótico no protegió tan adecuadamente como lo hizo dos días antes, o bien en estas réplicas hubo pérdida de microbiota o ineficiente establecimiento del PECD desde el día uno de edad.

Snoeyenbos *et al.*²⁴ mostraron que los grupos tratados con probióticos protegieron a las aves desde los 12 días de edad, después de crecer desde el primer día de edad sobre cama contaminada con SI, en contraste con las aves que no recibieron probióticos y que convivieron en el mismo corral experimental. Si bien en el presente estudio la cantidad de *Salmonella* en el grupo que no recibió el probiótico, disminuyó a la par del grupo que sí la recibió, el mecanismo por medio del cual esta infección se reduce aún no se encuentra bien esclarecido. Es posible inferir que la microbiota contenida en el PECD se pudo haber transmitido horizontalmente en un corto periodo, en cantidades que aunque mínimas fueron capaces de disminuir la invasión a órganos internos por *Salmonella*.^{24,25,35,36,40} La exclusión competitiva promovida por los probióticos es un elemento más de control contra la colonización por patógenos entéricos en las aves comerciales; la redosificación con un probiótico es mejor que una sola dosis y si los probióticos se administran a tiempo disminuyen la transmisión horizontal por *Salmonella*.

Agradecimientos

Se agradece al Programa de Becas para la Elaboración de Tesis de Licenciatura (PROBETEL), de la Universidad Nacional Autónoma de México, el apoyo otorgado a Lourdes González Soto durante la elaboración del presente estudio. Los autores agradecen al Ing. Alejandro Romero Martínez del Sobral, Director General del grupo Investigación, Desarrollo Integral y Salud Animal, así como al Dr. José Luis Avilés Galván, Director Avícola de Incubadora Mexicana, S. A. de C. V., el valioso apoyo en la donación de las aves utilizadas en el presente estudio. Un agradecimiento especial al Dr. Carlos G. Gutiérrez Aguilar, por su invaluable asesoría en la escritura y conformación del presente manuscrito.

administration of "normal" gut microflora. *Avian Dis* 1977;22:273-287.

25. BARNES EM, IMPERY CS, COOPER MD. Manipulation of the crop and intestinal flora of the newly hatched chick. *Clin Nutr* 1980;33:2426-2433.

26. LAN PTN, SAKAMOTO M, BENNO Y. Effects of two probiotic *Lactobacillus* strains on jejunal and cecal microbiota of broiler chicken under acute heat stress condition as revealed by molecular analysis of 16S rRNA genes. *Microbiol Immunol* 2004;48:917-929.
27. SELIM ASM. Molecular techniques for analyzing chicken microbiota. *Biotechnology* 2006;5:53-57.
28. HAGHIGHI HR, GONG J, GYLES CL, HAYES MA, ZHOU H, SANEI B *et al*. Probiotics stimulate production of natural antibodies in chickens. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:975-980.
29. NURMI EV, RANTALA M. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature*. 1973;241:210.
30. PRIYANKARAGE N, SILVA SSP, GUNAWARDANA GA, PALLIYAGURU MWCD, WEERASINGHE WMPB, FERNANDO GKC *et al*. Effect of different probiotics against a lethal dose of *Salmonella* challenge in broiler chickens. *Br Poult Sci* 2004; Suppl.1 45:S43-S45.
31. AL-ZENKI SF, AL-NASSER AY, AL-SAFFAR AE, ABDULLAH FK, AL-BAHOUE ME, AL-HADDAD AS *et al*. Effects of using a chicken-origin competitive exclusion culture and probiotic cultures on reducing *Salmonella* in broilers. *J Appl Poult Res* 2009;18:23-29.
32. REID G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:3763-66.
33. PASCUAL M, HUGAS M, BADIOLA JI, MONFORT JM, GARRIGA M. *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella enteritidis* colonization in chickens. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:4981-4986.
34. BARNES EM, MEAD GC, BARNUM DA, HARRY EG. The intestinal flora of the chicken in the period 2-6 weeks of age with particular reference to the anaerobic bacteria. *Poult Sci* 1972;13:311-326.
35. ZIPRIN RL, CORRIER DE, DELOACH JR. Control of established *Salmonella typhimurium* intestinal colonization with *in vivo*-passaged anaerobes. *Avian Dis* 1993;37:183-188.
36. CORRIER DE, NISBET DJ, SCALAN CM, HOLLISTER A, DELOACH JR. Control of *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chicks with a continuous fowl characterized mixed culture of cecal bacteria. *Poult Sci* 1995;74:916-924.
37. DUCHET-SUCHAUX M, MOMPART F, BERTHELOT F, BEAUMONT C, LÉCHOPIER P, PARDON P. Differences in frequency, level, and duration of cecal carriage between four outbred chicken lines infected orally with *Salmonella enteritidis*. *Avian Dis* 1997;41:559-567.
38. SCHNEITZ C, KIISKINEN T, TOIVONEN V, NÄSI M. Effect of Broilact® on the physicochemical conditions and nutrient digestibility in the gastrointestinal tract of broilers. *Poult Sci* 1998;77:426-432.
39. NAKAMURA A, OTA Y, MIZUKAMI A, ITO T, NGWAI B, ADACHI Y. Evaluation of Aviguard, a commercial competitive exclusion product for efficacy and after-effect on the antibody response of chicks to *Salmonella*. *Poult Sci* 2002; 81:1653-1660.
40. NAVA MG. Efecto de un producto de exclusión competitiva comercial (Preempt™) sobre la mortalidad y transmisión horizontal de *Salmonella gallinarum* en pollo de engorda (tesis de licenciatura). México DF: Universidad Nacional Autónoma de México, 2000.
41. ANDREWS EJ, BENNET BT, DERRELL CJ, HOUP KA, PASCOE PJ, ROBINSON GW *et al*. 1993 Report of the American Veterinary Medicine Association panel on euthanasia. *J Am Vet Med Assoc* 1993; 202: 229-249.
42. MONTGOMERY DC. Design and analysis of experiments. Belmont, CA: John Wiley & Sons, Inc, 1991: 45-81.
43. ORENCIA MB, VIZMANOS MFC, PADILLA MA. Efficacy of two preparations for controlling cecal colonization of *Salmonella* by competitive exclusion in broiler chicks. *Philipp J Vet Med* 2001; 38:75-78.
44. SNOEYENBOS GH, WEINACK MO, SMYER FC. Further studies on comparative exclusion for controlling *Salmonellae* in chicks. *Avian Dis* 1979; 23:904-914.
45. SCHNEITZ C, HAKKINEN M. Comparison of two different types of competitive exclusion products. *Lett Appl Microbiol* 1998; 26:338-341.
46. SNOEYENBOS GH, SOERJADI SA, WEINACK OM. Gastrointestinal colonization by *Salmonella* and pathogenic *Escherichia coli* in monoxenic and aloxenic chicks and poults. *Avian Dis* 1982; 26:266-275.
47. TELLEZ G, PETRONE VM, ESCORCIA M, MORISHITA TY, COBB CW, VILLASEÑOR L. Evaluation of avian-specific probiotic and *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, and *Salmonella heidelberg*-specific antibodies on cecal colonization and organ invasion of *Salmonella enteritidis* in Broilers. *J Food Protect* 2001;64:287-291.
48. STARVRIC S. Microbial colonization control of chicken intestine using defined cultures. *Food Tech* 1987; 41:93-98.