

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Efecto de tres promotores de crecimiento sobre los
parámetros productivos en pollos de engorde desafiados
experimentalmente con clostridium perfringens**

TESIS

Para optar el título profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Vania Lisset Quispe Avellaneda

Lima – Perú

2014

Para mis padres: José Luis y Domitila.

Agradezco a la Dra Eliana Icochea por el apoyo, dedicación y tiempo brindados en la realización de la presente tesis. Al Dr. Pablo Reyna por sus buenos consejos y a todo el equipo del Laboratorio de Patología Aviar.

INDICE

INDICE.....	i
RESUMEN.....	iii
SUMARY.....	iv
LISTA DE CUADROS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
I. INTRODUCCION.....	1
II. REVISION BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Morfofisiología del aparato digestivo del ave.....	3
2.2 Microflora intestinal.....	5
2.3 Enfermedades entéricas.....	7
2.4 Clostridiasis o Enteritis Necrótica.....	7
2.4.1 Impacto sobre los parámetros productivos y económicos.....	8
2.4.2 <i>Clostridium perfringens</i>	9
2.4.3 Epidemiología.....	10
2.4.4 Factores de riesgo.....	11
2.4.5 Signos clínicos.....	15
2.4.6 Lesiones macroscópicas.....	15
2.4.7 Lesiones microscópicas.....	17
2.4.8 Patogénesis.....	17
2.5 Promotores de crecimiento.....	18
2.5.1 Antibióticos promotores de crecimiento (APC).....	18
2.5.2 Enzimas.....	20
2.5.2.1 Tipos de enzimas usadas en nutrición animal.....	22
2.5.3 Fitobióticos.....	23
2.5.4 Probióticos.....	25
2.5.5 Prebióticos.....	25
2.5.6 Otros promotores de crecimiento.....	26
III.-MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1 Lugar de estudio.....	28
3.2 Materiales.....	28

3.2.1 Animales.....	28
3.2.2 Alimento.....	28
3.2.3 Promotores de crecimiento.....	28
3.2.4 Desafío.....	29
3.2.5 Equipos.....	29
3.2.6 Vacunas.....	29
3.2.7 Programa estadístico.....	29
3.3 Metodología.....	29
3.3.1 Diseño experimental.....	29
3.3.1.1 Tamaño muestral.....	29
3.3.1.2 Diseño del estudio.....	30
3.3.1.3 Desafío experimental.....	31
3.3.1.4 Evaluación de parámetros productivos.....	32
3.3.2 Análisis de datos.....	33
3.3.3 Manejo general de los animales.....	33
IV.- RESULTADOS.....	35
4.1 Peso corporal promedio.....	35
4.2 Ganancia de peso.....	36
4.3 Consumo de alimento.....	36
4.3.1 Consumo semanal promedio por ave.....	36
4.3.2 Consumo acumulado promedio por ave.....	36
4.4 Conversión de alimento.....	38
4.5 Índice de eficiencia productivo Europeo.....	38
4.6 Uniformidad.....	39
4.7 Mortalidad Acumulada.....	39
V.- DISCUSIÓN.....	40
VI.- CONCLUSIONES.....	46
VIII. BIBLIOGRAFIA CITADA.....	47

RESUMEN

El presente estudio comparó los principales parámetros productivos de pollos de engorde suplementados con promotores de crecimiento con actividad anticlostridial en la dieta, se desarrolló en las instalaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima -Perú. Se emplearon 575 aves distribuidas en 5 grupos de 115 animales con 5 repeticiones cada uno. G1 fue el grupo desafiado y tratado con lisozima encapsulada, G2 fue desafiado y tratado con fitobiótico (*Humulus lupulus*), G3 fue desafiado y tratado con Zinc bacitracina, G4 fue el control positivo sin promotor y desafiado y G5 fue el control negativo sin promotor y sin desafío. Se realizaron dos desafíos con *Eimeria* vía oral y agua de bebida (14 y 22 días) y un desafío con *Clostridium perfringens* (10^8 UFC/mL) vía oral a los 26 días. Los resultados mostraron que las aves de G1 y G2 ,tuvieron 56 y 42 g mas de peso corporal que G4. La mayor ganancia de peso promedio lo obtuvo G2 (2570.82 g). El mayor consumo acumulado lo presentó G4 (4797.82 g), G1 el menor (4676.12 g). La mejor conversión alimenticia la alcanzó G1 (1.78), seguido de G2 (1.79).El índice de eficiencia productivo Europeo arrojó una mejor eficiencia para G1 (349.16).Comparando G1 y G2 con G3 se obtuvo un 4.65% y 3.60% más de eficiencia productiva respectivamente. Sin embargo,el análisis de varianza de los parámetros productivos (peso promedio, ganancia de peso, índice de conversión alimenticia, consumo de alimento y el índice de eficiencia Europeo) en los cinco grupos del estudio no mostraron diferencia significativa entre ellos ($p>0.05$). Los resultados permiten concluir que la suplementación con productos alternativos a Zinc bacitracina tales como las lisozimas encapsuladas y fitobióticos (*Humulus lupulus*) mejoran el rendimiento productivo de los pollos de engorde bajo condiciones de reto de clostridios.

Palabras clave: promotor de crecimiento, *Clostridium perfringens*, parámetros productivos, pollos de engorde.

SUMMARY

This study compared the main productive parameters of broilers supplemented with growth-promoting activity anticlostridial diet, developed on the facilities of the Faculty of Veterinary Medicine of the Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Peru. 575 birds divided into 5 groups of 115 animals with 5 repetitions each were used. Group G1 was challenged and treated with encapsulated lysozyme, G2 was challenged and treated with phytobiotics (*Humulus lupulus*), G3 was challenged and treated with zinc bacitracin, G4 was the positive control without promoter and challenged and G5 was the negative control without promoter and unchallenged. Two challenges with *Eimeria* oral and drinking water (14 to 22 days) and *Clostridium perfringens* challenge (10^8 CFU / mL) at 26 days oral route were performed. The results showed that birds of G1 and G2 were 56 and 42 g of body weight more than G4. The greater weight gain average was obtained by G2 (2570.82 g). G4 had the highest cumulative consumption introduced (4797.82 g), G1 the lowest (4676.12 g). G1 the best feed conversion (1.78), followed by G2 (1.79). The European productive efficiency index showed a better efficiency for G1 (349.16) Comparing G1 and G2 against G3, obtained 4.65% and 3.60% over respectively production efficiency. However, analysis of variance of the production parameters (average weight, weight gain, feed conversion rate, feed intake and European efficiency index) in the five study groups showed no significant difference between them ($p > 0.05$). The results suggest that supplementation with alternative products such as Bacitracin Zinc and phytobiotics encapsulated lysozyme (*Humulus lupulus*) improve the productive performance of broiler chickens under clostridia challenging conditions.

Keywords: growth promoter, *Clostridium perfringens*, production parameters, broilers.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Toxinotipos y enfermedades causadas por <i>Clostridium perfringens</i> (adaptado de Songer, 2010).....	10
Cuadro 2:Distribución de los grupos por tratamiento y desafío.....	31
Cuadro 3:Peso corporal promedio por semana hasta los 42 días de edad.....	35
Cuadro 4:Ganancia de peso promedio por semana y hasta los 42 días de edad.....	36
Cuadro 5:Consumo semanal promedio por ave (en gramos) por cada grupo.....	37
Cuadro 6:Consumo promedio de alimento acumulado (en gramos) por cada grupo.....	37
Cuadro 7:Índice de conversión alimenticia por semana por grupo.....	38
Cuadro 8:Parámetros productivos e índice de eficiencia productivo Europeo por grupo a los 42 días.....	38
Cuadro 9:Uniformidad por semana hasta los 42 días de edad.....	39
Cuadro 10:Mortalidad total (%) registrada hasta la sexta semana en los 5 grupos experimentales.....	39

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: a, b y c) típicas lesiones de enteritis necrótica en su forma aguda, observadas en el intestino delgado de pollos de engorde; d) lesiones observadas en la forma subclínica, las flechas señalan la zonas de necrosis focalizada (modificado de Opengart, 2008; Van Immerseel *et al.*, 2009).....16
- Figura 2: a) Severa lesión necrótica en el yeyuno; b) hígado con colangiohepatitis (modificado de Johansson, 2006).....16

I.-INTRODUCCIÓN

La Clostridiasis es una enfermedad frecuentemente observada en la avicultura comercial. Las lesiones necróticas en el tracto intestinal de pollos están asociadas a la proliferación de la bacteria anaerobia *Clostridium perfringes* siendo comúnmente aceptado que este patógeno es el causante de la Clostridiasis. Esta enfermedad, económicamente relevante, está caracterizada por el descenso del apetito, retardo del crecimiento, aumento del índice de conversión alimenticia, diarrea y una alta tasa de mortalidad en brotes agudos (Mitsch *et al.*, 2004). Los antibióticos y otras sustancias antibacteriales usadas como promotores de crecimiento y anticoccidiales pueden prevenir los efectos patógenos de la Clostridiasis (Martel *et al.*, 2004).

Los antibióticos promotores de crecimiento (APC) son sustancias químicas o biológicas que son agregadas al alimento de los animales de granja, con el objetivo de mejorar el crecimiento de los pollos de engorde, mejorar la utilización del alimento y de esta forma obtener mayor productividad y resultados económicos (Perić *et al.*, 2009). Los APC se empezaron a usar en producción animal en la década de los años cincuenta, en Estados Unidos y otros países, mostrando efectos benéficos en la eficiencia productiva en cerdos y pollos. Posteriormente, estudios mostraron que el consumo de estos APC podían generar en el animal resistencia al antibiótico usado y que incluso los genes de resistencia al antibiótico podían también ser transmitidos de la microflora animal a la humana (Dibner y Richards, 2005).

Basados en las experiencias de Suiza, Dinamarca, Alemania y Holanda; los Estados Unidos decidieron en el 2006 prohibir el uso de antibióticos promotores de crecimiento (APC) en el alimento de animales destinados a consumo humano. Observaciones de campo en Europa mostraron varios problemas en la industria avícola tras la prohibición de los APC. Estos problemas se evidenciaron en los parámetros productivos (peso corporal e índice de conversión alimenticia), niveles de amoníaco, humedad de la cama en las instalaciones y el estado sanitario de las aves (desordenes entéricos debido e infecciones principalmente clostridiales) (Hafez, 2011).

Luego de la prohibición del uso de APC en alimentos para la industria avícola y los problemas suscitados por ello, se buscaron sustancias alternativas para reemplazarlos. Hoy en día, existen varios grupos de aditivos que tienen efecto positivo en el crecimiento e índice de conversión alimenticia en pollos, tales como: probióticos, prebióticos, enzimas, acidificantes, antioxidantes y aditivos fitobióticos (Perić et al., 2009). De estos últimos, algunos aceites esenciales han demostrado que pueden restringir la colonización y proliferación de *Clostridium perfringens* (Mitsch et al., 2004).

En el Perú varios estudios han evaluado, con resultados no muy claros, el efecto de la suplementación de diferentes promotores de crecimiento, en lugar de antibióticos (ácidos orgánicos y extractos vegetales) en la dieta de pollos de engorde (Shiva et al., 2012; Gonzáles et al., 2013), sin embargo no existe ningún reporte de trabajos de experimentación que haya evaluado el efecto de promotores de crecimiento sobre clostridios bajo condiciones de reto experimental. Es por ello que el objetivo de este estudio fue el de comparar los efectos de la suplementación de tres diferentes promotores de crecimiento con actividad anticlostridial sobre los parámetros productivos de pollos de engorde desafiados con un inóculo de *Clostridium perfringens*.

II.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Morfofisiología del aparato digestivo del ave

El intestino es un órgano complejo y muy importante que forma parte del tracto gastrointestinal. En él, se da el paso de los nutrientes que sirven de base para el metabolismo, mantenimiento y crecimiento del animal, además de los recursos necesarios para el adecuado funcionamiento y desarrollo del sistema inmune, óseo y nervioso (Ferket, 2000). El tracto gastrointestinal realiza dos funciones básicas: a) Adquisición y asimilación de nutrientes; b) Mantenimiento de una barrera protectora contra las infecciones microbianas y virales (Croom, 2000). Así, el desarrollo y la salud del tracto gastrointestinal son claves para la productividad de todos los animales de granja, incluyendo a las aves de corral. Por lo tanto, una pobre salud entérica, puede afectar adversamente la digestión de alimentos, la motilidad intestinal, la absorción de nutrientes. Asimismo, una pobre nutrición y calidad de alimento pueden aumentar la susceptibilidad del ave a desórdenes entéricos (Ferket, 1996; Hafez, 1999).

Existen muchos factores que pueden influenciar el adecuado funcionamiento del intestino y por ende la producción. Entre estos factores podemos mencionar la salud del intestino, los estímulos inmunitarios, el medio ambiente, la nutrición, el tipo y la calidad de los ingredientes de la ración, la presencia de toxinas, el equilibrio de la microflora, las secreciones endógenas, la motilidad, y los aditivos. Se puede considerar que las funciones digestivas constituyen los factores limitantes para el

rendimiento de los animales de producción. En esencia, la producción de pollos de engorde consiste en la transformación de los ingredientes de la dieta en carne. La economía de esta industria exige una buena salud intestinal para lograr las metas en lo que se refiere a tasa de crecimiento y eficiencia alimenticia (Dekich, 1996).

Después de la eclosión, el intestino delgado del pollo bebé es anatómicamente inmaduro. El desarrollo del intestino continúa luego del nacimiento, incrementando su peso más rápido que el resto de la masa corporal. La maduración del intestino delgado del pollito bebé conlleva a cambios moleculares, bioquímicos (fisiológicos) y morfológicos durante las dos primeras semanas de vida, sin embargo, los cambios más dramáticos ocurren dentro de las primeras veinticuatro horas. Los cambios fisiológicos están relacionados con el aumento de la producción de enzimas pancreáticas y digestivas intestinales. Los cambios morfológicos implican aumentos en longitud intestinal, la altura y densidad de las vellosidades, por lo tanto un aumento en el número de enterocitos, células caliciformes y entero-endócrinas (Geyra *et al.*, 2001).

El período inmediato a la eclosión está caracterizado por una transición nutricional. Esta transición está acompañada del rápido desarrollo físico y funcional del tracto gastrointestinal. El pollo recién nacido pasa del uso de la yema, rica en lípidos, al alimento exógeno rico en carbohidratos y proteínas (Uni *et al.*, 2003). La presencia de los nutrientes en la luz intestinal es capaz de estimular el crecimiento de las vellosidades y las criptas. Se ha señalado que el crecimiento de las vellosidades del duodeno, es casi completa para el día siete post-nacimiento mientras que el desarrollo del yeyuno e íleon continúa hasta el día 14 (Uni *et al.*, 1999).

El bazo y el tejido linfoide asociado a intestino (GALT) son estructuras importantes para la generación de la respuesta inmune adaptativa en pollos adultos. Sin embargo, en neonatos, estos órganos no están completamente desarrollados. La organización estructural final del bazo y los GALTs (tales como las tonsilas cecales y placas de Peyer) se producen durante la primera semana de vida del pollo (Jeurissen *et al.*, 1989; Mast y Goddeeris, 1999). Así mismo, otros estudios demostraron que el desarrollo de los GALTs es concomitante con la estructura y desarrollo funcional del tejido

intestinal (Bar-Shira *et al.*, 2003; Friedman y Bar-Shira, 2005). Además, la maduración inmune completa se obtiene al final de la segunda semana de vida, lo cual se demostró por la expresión de genes de citoquinas y producción de anticuerpos. Por lo tanto, la inmunidad adaptativa en el pollo parece madurar hacia la segunda semana de vida (Bar-Shira *et al.*, 2003).

En contraste a los mamíferos, el desarrollo de GALT en los pollos se produce en la vida temprana ya que las crías son inmediatamente expuesto a un ambiente intestinal típico de los adultos (Bar-Shira *et al.*, 2003). Además, el cambio del uso de la yema a nutrientes en forma de derivados (alimentación exógena) conduce al desarrollo funcional y estructural rápido del intestino en los pollos (Geyra *et al.*, 2001; Sklan, 2001). Así, el desarrollo funcional del intestino como órgano digestivo y de absorción parece estar estrechamente relacionada con su desarrollo como un órgano linfoide importante (Thompson *et al.*, 1998). Estudios previos han demostrado que ambos procesos son concomitantes tanto en aves como en mamíferos. Es decir, se ha demostrado que la relación ocurre entre el contenido intestinal, enterocitos, leucocitos intraepiteliales y los leucocitos de la lámina propia (Friedman y Bar-Shira, 2005).

2.2 Microflora intestinal

La microflora del tracto digestivo de los pollos no es aun bien conocida. La población de microorganismos es de una compleja variedad y tamaños y está formada por una mezcla de una gran variedad de bacterias y protozoos, de los cuales los microorganismos predominantes son las bacterias. Esta microflora está presente a lo largo del tracto digestivo y las que se encuentran en el buche y el ciego son las más complejas. El tipo, número y actividad metabólica de los microorganismos se ven afectados por numerosos factores tales como el individuo, edad del animal, medio ambiente y dieta (Gabriel *et al.*, 2006). El perfil microbiano intestinal puede ser alterado por diversos factores. Los cambios en la composición de dieta, la microflora y a su vez, la interacción entre ambas puede afectar el desarrollo intestinal, la arquitectura de la mucosa y la composición del moco del intestino (Apajalahti *et al.*, 2004).

Dado que las diferentes especies de bacterias tienen variadas preferencias por los substratos y diferentes requerimientos nutricionales, la composición química del alimento determina la

composición de la microflora intestinal (Apajalahti *et al.*, 2004). Las bacterias producen varios metabolitos que pueden ser útiles o perjudiciales para el hospedero. La interacción entre las bacterias y el epitelio gastrointestinal lleva a la modificación estructural y funcional del tracto digestivo. Las bacterias perjudiciales pueden disminuir la digestión de los lípidos y modificar la digestión de los carbohidratos y proteínas, además de tener un efecto negativo para las vitaminas. Sin embargo, las bacterias benéficas pueden proteger al ave de bacterias patógenas y desarrollan el sistema inmune intestinal (Gabriel *et al.*, 2006).

Los microorganismos del tracto gastrointestinal pueden generalmente ser divididos en potencialmente patógenos o benéficos. Las bacterias patógenas pueden estar envueltas en infecciones localizadas o sistémicas, putrefacción intestinal y formación de toxinas. Mientras, que algunos microorganismos intestinales pueden tener efectos benéficos como la producción de vitaminas, estimulación del sistema inmune a través de mecanismos no patogénicos e inhibición del crecimiento o establecimiento de grupos microbianos nocivos (Jeurissen *et al.*, 2002).

La microflora intestinal está compuesta de 10^7 a 10^{11} bacterias por gramo de contenido intestinal. Por medio de estudios moleculares se han logrado identificar en la flora cecal al menos 640 especies de bacterias, representando a 140 géneros. Más de la mitad de estas 640 especies pertenecen a géneros que hasta ese momento eran desconocidos para la ciencia (Apajalahti *et al.*, 2004; Bjerrum *et al.*, 2006). La microflora del intestino delgado del ave se establece dentro de las primeras dos semanas de vida, mientras, la flora cecal, la cual está compuesta en su mayoría por bacterias anaerobias obligadas, requieren al menos 30 días para su desarrollo (Amit-Romach *et al.*, 2004).

Existe una relación cercana entre la microflora intestinal y el desarrollo o mantenimiento del sistema inmune intestinal (Salminen *et al.*, 1998, Gabriel *et al.*, 2006). Hoy en día se sabe que la microflora intestinal juega un rol importante en la mantención de la homeostasis intestinal, la cual es crítica para el mantenimiento óptimo de la salud aviar (Kyungwoo, 2010).

Ciertas porciones del intestino están asociadas a específicas especies microbianas. En el tracto superior predominan los anaerobios facultativos, mientras en el ciego se encuentran principalmente

anaerobios obligados (Gabriel *et al.*, 2006). Un estudio realizado en pollos de engorde alimentados con soya y maíz (sin aditivos), se examinó la flora de estos, mediante el secuenciamiento de genes del ARN ribosomal 16s. Encontraron, que en el íleon hasta el 70 % de bacterias estaba relacionado a *Lactobacillus*, y el resto pertenecían a *Clostridiaceae* (11%), *Streptococcus* (6.5%), *Enterococcus* (6.5%). Sin embargo, en el ciego se encontró que el 65% estaba relacionado a *Clostridiaceae* y el resto a *Fusobacterium* (14%), *Lactobacillus* (8%) y *Bacteroides* (5%) (Lu *et al.*, 2003).

2.3 Enfermedades entéricas

Los desórdenes entéricos son una de los principales grupos de enfermedades que afectan a la avicultura. Estas enfermedades causan grandes pérdidas económicas debido al aumento de mortalidad, pérdida de ganancia de peso, incremento en los costos de medicación y aumento de la conversión alimenticia. Varios patógenos, tales como virus, bacterias, hongos y parásitos, están incriminados como posibles causas de los desórdenes entéricos, bien sean solos, en sinergismo con diferentes microorganismos o asociados con causas no infecciosas, tales como factores alimenticios o de manejo. Bajo condiciones de campo, sin embargo, es difícil determinar si la causa real de los desórdenes entéricos en la avicultura es debida a una infección o un origen no infeccioso (Hafez, 2001).

Los agentes infecciosos pueden introducirse y expandirse entre las granjas avícolas por diferentes rutas (vertical u horizontal). Así, en edades tempranas, las mayores causas de problemas entéricos están relacionadas a transmisiones infecciosas verticales tales como salmonelosis, colibacilosis y un mal manejo en la incubación (Hafez, 1999; Hafez, 2005; Bermúdez y Stewart-Brown, 2008).

2.4 Clostridiosis o Enteritis Necrótica

La enteritis necrótica (NE) clínica, puede ser definida como una enfermedad principalmente de pollos jóvenes, causada por *Clostridium perfringens* del tipo A y tipo C asociada a toxinas. La enfermedad es también conocida como enteritis clostridial y enterotoxemia. Esta enfermedad fue descrita por primera vez por Parish en 1961, quien reprodujo la enfermedad con cepa de *Clostridium welchii* (*C. perfringens*). Posteriormente la enfermedad ha sido reportada en la mayoría de partes del mundo donde existe la avicultura (Opengart, 2008). La infección clínica se caracteriza por tener una

presentación súbita, alta mortalidad y necrosis de la membrana mucosa del intestino delgado. Además de la forma clínica aguda, también se han descrito la forma leve y subclínica. La forma aguda e hiperaguda, puede ser la más dramática infección clínica bacteriana en pollos (Porter, 1998).

La Clostridiasis ha sido reproducida experimentalmente en pollos, pavos y codornices. En infecciones experimentales de pollos de engorde la incidencia de la enfermedad puede variar desde 1.3 -37.3% hasta incluso 62% en pollos SPF (del inglés: *specific-pathogen-free*). La infección experimental en pollos se puede realizar utilizando varios métodos, como la de criar pollos en lugares con camas donde la enfermedad ha ocurrido antes, mediante alimento contaminado con *Clostridium perfringens* e inoculando de forma endovenosa, oral o intraduodenal, al *Clostridium perfringens*, sus toxinas o una combinación de ambas (Opengart, 2008).

La infección experimental también ha sido lograda realizando la combinación del *Clostridium perfringens* con otros agentes infecciosos y otros factores de riesgo. Así, se ha logrado producir la infección mediante la dosificación de ooquistes esporulados de *Eimeria spp.* y la forma vegetativa de cultivos de *Clostridium perfringens* o por alimento contaminado con ambos. Otros han combinado varios factores de riesgo para producir la enfermedad, como por ejemplo, la inclusión de trigo y harina de pescado en la dieta junto un reto de coccidias y *Clostridium*; la inmunosupresión inducida por retos al virus de Gumboro, lo cual permite que la enfermedad se presente de manera más severa (Opengart, 2008).

2.4.1 Impacto sobre los parámetros productivos y económicos

Hay pocos estudios que han evaluado la significancia económica de las manifestaciones clínicas de la Clostridiasis. El impacto económico a nivel mundial de la enteritis necrótica se calcula en dos billones de dólares al año (Porter, 1998). El costo asociado con la prevención de Clostridiasis ha sido estimado aproximadamente en \$0.05 por pollo en los Estados Unidos (Van Immerseel *et al.*, 2004). Mientras es difícil determinar la prevalencia de la forma subclínica de la infección, se ha demostrado que afecta el ritmo de crecimiento y aumenta la conversión alimenticia (Lovland y Kaldhusdal, 2001), además de causar altos niveles de decomiso de pollos debido a la hepatitis resultante. Los lotes con niveles altos de *Clostridium perfringens* asociado a hepatitis tienen una performance más baja

(Lovland y Kaldhusdal, 1999). En países donde la práctica del uso de antibióticos en el alimento para aumentar el crecimiento ha sido prohibida la incidencia y por lo tanto la importancia económica de la forma clínica y subclínica de la Clostridiasis ha aumentado (Opengart, 2008).

2.4.2 *Clostridium perfringens*

La enteritis necrótica es causada principalmente por *Clostridium perfringens* tipo A, con ocasionales casos de infección causados por el tipo C (Long *et al.*, 1974). Actualmente se sabe que cepas específicas del tipo A producen la enteritis necrotizante (Songer, 2010).

El *Clostridium perfringens* es un habitante común del tracto gastrointestinal de los animales de sangre caliente, sin embargo, algunos toxinotipos están asociados a distintas enfermedades. Es una bacteria anaerobia, formadora de esporas, Gram positiva, motil por una fimbria tipo IV (Songer, 2010). Perteneció al género *Clostridium*, el cual está compuesto por aproximadamente 150 especies filogenéticamente heterogéneas que no representan un taxón coherente (Songer y Miskimmins, 2005). Aparecieron al inicio de la evolución de la vida y de hecho se sugiere que es la raíz del árbol de la vida de las eubacterias gram positivas. Estos organismos producen alrededor de 20 proteínas tóxicas, de las cuales, las principales son las llamadas toxina alfa, beta, iota y épsilon. La producción de estas toxinas divide a la especie en 5 toxinotipos (Cuadro 1) (Songer, 2010). Así, el *Clostridium perfringens* tipo A, produce principalmente la toxina alfa (fosfolipasa C) y es el mayor grupo asociado a Clostridiasis en pollos (Wages y Opengart, 2003).

El *Clostridium perfringens*, en pollos de engorde es el responsable de una enfermedad entérica aguda llamada Clostridiasis o enteritis necrótica. Además de la forma aguda, también se puede presentar la forma subclínica, caracterizada por una necrosis focal del intestino, una Clostridiasis asociada a colangiohepatitis o necrosis fibrinoide del hígado (Engstrom *et al.*, 2003). Además, de la importancia económica por las pérdidas que genera, la Clostridiasis en la avicultura también contribuye a un riesgo en la Salud Pública a través de la cadena alimentaria (Hughes *et al.*, 2008), siendo el género *Clostridium* una de las bacterias patógenas más frecuentemente aisladas en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en seres humanos (Van Immerseel *et al.*, 2004).

Cuadro 1: Toxinotipos y enfermedades causadas por *Clostridium perfringens* (adaptado de Songer, 2010)

Toxinotipo	Enfermedad	Toxina
A	Intoxicación alimentaria, enteritis necrótica en pollos, enterotoxemia en cordero, enterocolitis necrótica neonatal porcina, enteritis hemorrágica neonatal bovina	Alfa
B	Disentería en corderos, enteritis crónica ovina, enteritis hemorrágica bovina/equina	Alfa, Beta, Épsilon
C	Enteritis hemorrágica en pollos, enterotoxemia hemorrágica o necrótica en lechones, corderos, cabras, potros, enterotoxemia aguda en ovejas	Alfa, Beta
D	Enterotoxemia ovina, enterocolitis caprina, enterotoxemia bovina (terneros y posiblemente adultos)	Alfa, Épsilon
E	Enterotoxemia neonatal bovina (posiblemente ovina)	Alfa, Iota

2.4.3 Epidemiología

Los brotes de enteritis necrótica han sido reportados en pollos de entre 2 semanas a 6 semanas de edad. La mayoría de reportes de enteritis necrótica se han reportado de pollos de engorde de 2 a 5 semanas de edad criados en cama húmeda fibrosa. Sin embargo también han sido reportados casos de enteritis necrótica en líneas comerciales de 3 a 6 semanas de edad criadas en piso, en líneas comerciales de reemplazo criadas en jaulas de 12 a 16 semanas (Opengart, 2008). La enteritis necrótica ha sido reportada también en pavos de 7 a 12 semanas de edad (Gazdzinski y Julian, 1992), y en pavos con infecciones concurrentes de ascáridos y coccidiosis (Opengart, 2008).

El *Clostridium perfringens* puede ser transmitido por diversos medios. Las principales formas de transmisión incluyen las heces, el suelo, el polvo, alimento contaminado, desperdicios contaminados y contenido intestinal (Craven, 2000; Opengart, 2008). En muchos brotes de enteritis necrotizante, tanto el alimento como los desperdicios han sido implicados como fuente de infección. Las moscas domésticas también han demostrado ser un vector mecánico, y tal vez también un vector biológico (Opengart, 2008). El *Clostridium perfringens* también se puede diseminar por las incubadoras comerciales, cascarones, plumón de la incubadora y las cajas donde transportan los pollitos (Craven *et al.*, 2001).

2.4.4 Factores de riesgo

a) Coccidiosis

Uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de la enteritis necrotizante es una infección concurrente con coccidias, en particular por las especies de *Eimeria* (Hermans y Morgan 2007; Collier *et al.*, 2008). El daño a la mucosa intestinal por los merozoitos y esporozoitos junto con la reducción del pH y el incremento del tiempo de tránsito del contenido intestinal, permiten el establecimiento y proliferación del *Clostridium perfringens*. La cantidad de *Clostridium perfringens* en el intestino delgado y ciego en las aves con coccidiosis aguda es mucho mayor con respecto a las aves que no presentan coccidias. La tasa de adhesión del *Clostridium perfringens* a la mucosa del ciego es mucho mayor cuando está asociada a *Eimeria*, que cuando está solo. La tasa de mortalidad en aves infectadas de forma natural con *Clostridium perfringens* y *Eimeria spp*, es comúnmente mayor en al menos 25% con respecto a las aves libres de *Eimeria* (Drew *et al.*, 2004).

Los parásitos protozoarios del género *Eimeria* se multiplican en el tracto gastrointestinal causando daño en el tejido. El daño en el intestino causado por las eimerias, genera una interrupción del proceso digestivo, deficiente absorción de nutrientes, reducción de la ganancia de peso e incremento de la susceptibilidad a otros agentes infecciosos y la tasa de mortalidad. A pesar de que *Eimeria tenella* no induce lesiones en el intestino delgado, la coccidiosis cecal que genera puede aumentar la eliminación del *Clostridium perfringens* por parte del ave a su medio (Pattinson, 2008). La severidad de las lesiones depende mayormente de la extensión y del número de ooquistes ingeridos por el ave (McDougald, 2008; Williams, 2005).

Las eimerias colonizan el intestino delgado y rompen las células epiteliales, como consecuencia de las etapas intracelulares de su ciclo de vida (Williams, 2005). Las proteínas plasmáticas se filtran a la luz intestinal a través del revestimiento epitelial dañado, y estas pueden ser utilizadas como sustrato de crecimiento por cepas de *Clostridium perfringens* (Van Immerseel *et al.*, 2009). Por otra parte, la infección con coccidia induce una respuesta inflamatoria mediada por células T que estimula la mucogénesis intestinal, la cual genera una ventaja de crecimiento al *Clostridium perfringens* ya que puede utilizar el moco como un sustrato (Collier *et al.*, 2008).

b) Dieta

Otro factor de riesgo importante es establecido por la dieta. La dieta es un factor importante que puede brindar un medio favorable a un crecimiento descontrolado del *Clostridium perfringens*. La manipulación de la dieta puede afectar la población del *Clostridium perfringens* en el tracto gastrointestinal, pudiendo incrementar la tasa de eliminación fecal del *Clostridium perfringens* (Craven, 2000). La incidencia de enteritis necrótica en aves alimentadas con dieta basadas en trigo o cebada es 6 veces mayor y la mortalidad es 6 veces mayor que las aves alimentadas con maíz (Kaldhusdal y Skjerve, 1996), esto debido en parte a la disponibilidad de nutrientes para el *Clostridium perfringens* con este tipo de dietas (Songer, 2010).

Los cereales en grano pueden influir en la presentación de la enteritis necrotizante. La inclusión en la dieta de cereales como el trigo, la cebada y el centeno que son ricos en polisacáridos no amiláceos hidrosolubles pueden predisponer o exacerbar los brotes de enteritis necrotizante. En pollos alimentados con una dieta de trigo, la severidad de la enteritis necrotizante fue reducida con la adición de fibra dietaria y carbohidratos complejos (Branton *et al.*, 1997). Así, las dietas basadas en maíz pueden contribuir a la prevención de Clostridiasis, sin embargo, el mecanismo por el cual se genera este efecto sobre la Clostridiasis, aún no está establecido (Opengart, 2008).

La proteína dietaria también puede influenciar en el desarrollo de la enteritis necrótica. Las raciones que contienen altos niveles de proteína, específicamente proteína de derivada de fuente animal (harina de pescado, carne, harina de huesos y harina de plumas) y que son ampliamente utilizados en la avicultura, pueden predisponer a las aves a enteritis necrótica (Wilkie *et al.*, 2005). Según estudios, al parecer los altos contenidos del aminoácido glicina en las proteínas de origen animal (la cual es mayor en proteínas de origen animal con respecto a las proteínas de origen vegetal) pueden desencadenar la proliferación del *Clostridium perfringens* y la sobre regulación de los genes que controlan la producción de sus toxinas, lo cual sugiere que altos niveles de glicina pueden ser un factor predisponente para la Clostridiasis (Dahiya *et al.*, 2005; Opengart, 2008). Además, también se ha documentado una correlación significativa entre la glicina dietaria y el número de *Clostridium*

perfringens y *Lactobacillus* en el íleo y ciego de pollos de engorde (Dahiya *et al.*, 2005; Wilkie *et al.*, 2005).

El mecanismo por el cual estos factores predisponen el crecimiento del *Clostridium perfringens* y la incidencia de la enteritis necrótica aun no es entendido. Al parecer estos factores generan condiciones que estimulan la secreción de moco intestinal, el cual induce la proliferación de bacterias mucolíticas dentro de la luz intestinal, estas bacterias proveen de un sustrato favorable para la proliferación del *Clostridium perfringens* (Opengart, 2008). Este efecto fue observado cuando en un estudio en el que se administraba tilosina a los pollos, estos mostraron una disminución cuantitativa del *Clostridium perfringens* en sus intestinos, debido a que la tilosina reducía el porcentaje de bacterias mucolíticas en la luz intestinal (Collier *et al.*, 2003).

Otros componentes de la dieta también pueden influir en el desarrollo de la enteritis necrotizante. Las fuentes de lípidos también tienen un efecto en la población del *Clostridium perfringens*. Las grasas de origen animal aumentan el conteo de *Clostridium perfringens*, en comparación con los aceites vegetales. Incluso la forma física del alimento puede incidir en la enteritis necrótica. Por ejemplo, los alimentos que contienen mezclas de partículas de diferentes tamaños (gran cantidad de partículas pequeñas y algunas partículas grandes) pueden predisponer más a la enteritis necrótica, en comparación a un alimento con uniformidad de partículas (Timbermont *et al.*, 2011).

c) Estrés y manejo

Cualquier factor que cause estrés en pollos de engorde podría predisponerlos a la enteritis necrótica. Cualquier forma de estrés puede alterar el medio ambiente intestinal, de tal forma que el riesgo de inducción de enteritis necrótica sería elevado (McDevitt *et al.*, 2006). La alteración en el régimen de alimentación (el cambio de una dieta de inicio a una dieta de crecimiento), esta frecuentemente asociada con enteritis necrótica. Además, agentes inmunosupresores, tales como el virus de la anemia infecciosa, virus de la enfermedad de Gumboro o Marek, reducen la resistencia a

infecciones intestinales y pueden incrementar la severidad de la enfermedad. También, una alta densidad de aves puede predisponer a la enteritis necrotizante (Timbermont *et al.*, 2011).

El manejo es asumido como un factor importante en enfermedades multifactoriales como la Clostridiosis. El manejo es una parte integral de una enfermedad, generalmente designado como “el factor granja” (Pattinson, 2008). Factores tales como los de uso de cama altamente fibrosa, densidad alta en la crianza y cambios en los programas alimenticios pueden producir estrés intestinal y predisponer a la Clostridiosis (Opengart, 2008). Por ejemplo, el riesgo de Clostridiosis es bajo, cuando las aves están criadas en jaulas o baterías u otros tipos de pisos que minimizan el contacto de las aves con las heces (Pattinson, 2008).

d) Cepas de Clostridium perfringens

El intestino de aves con enteritis necrótica contiene un gran número de *Clostridium perfringens* en el contenido intestinal en comparación con el contenido intestinal de pollos sanos. Sin embargo, la sola presencia del *Clostridium perfringens*, aun en grandes cantidades no son suficientes para producir enteritis necrótica. De hecho, no todas las cepas de *Clostridium perfringens* son capaces de inducir la enteritis necrótica, ellos necesitan tener un factor de virulencia específico del hospedero que le permite ser patógeno para los pollos. El *Clostridium perfringens* no es capaz de sintetizar 13 aminoácidos, por lo tanto un incremento en la disponibilidad de estos nutrientes le permitiría una extensa proliferación, que llevarían a un aumento en la producción de toxinas y generar la enteritis necrótica. Sin embargo, es esencial que esté presente una cepa patogénica para pollos (Timbermont *et al.*, 2011).

e) Inmunidad maternal baja

Existen estudios que sugieren, que un nivel de anticuerpos maternos bajos contra *Clostridium perfringens* está asociado con un aumento en el riesgo de presentar Clostridiosis en pollos de engorde. Estos estudios plantean que las aves son particularmente susceptibles durante el tiempo en el cual los anticuerpos maternos han disminuido y el nivel de producción activa de anticuerpos específicos es aún bajo. También se sugiere que pollos nacidos de gallinas jóvenes tienen menos niveles de

anticuerpos maternos contra *Clostridium perfringens* en comparación a las nacidas de madres mayores (Pattinson, 2008).

2.4.5 Signos clínicos

a) Forma clínica

Los signos clínicos que normalmente se observan en brotes de enteritis necrótica incluyen, severa depresión, pérdida del apetito, resistencia al movimiento, diarrea, plumas erizadas. La forma clínica es muy corta y a menudo solo se encuentran las aves muertas sin ningún signo previo de enfermedad. El curso de la enfermedad es normalmente hiperagudo, con muertos en un lapso de 1 a 2 horas y con tasas de mortalidad que pueden superar el 50% (Van Immerseel *et al.*, 2004; Opengart, 2008; Songer, 2010; Timbermont *et al.*, 2011).

b) Forma subclínica

La forma subclínica de la enfermedad se ha convertido en la más prevalente. En esta forma, la enteritis necrótica usualmente no presenta signos y no hay pico de mortalidad. El daño intestinal crónico lleva a pérdidas en la producción, debido a la pobre absorción, reducción de la ganancia de peso y un aumento en el índice de conversión alimenticia (Kaldhusdal *et al.*, 2001). En la infección subclínica, el daño intestinal, permite a la bacteria llegar al ducto biliar y sistema portal, colonizando el hígado y produciendo colangiohepatitis (Timbermont *et al.*, 2011).

2.4.6 Lesiones macroscópicas

Las lesiones macroscópicas están restringidas básicamente al intestino delgado, principalmente en el yeyuno e íleon (**Figura 1 y 2a**). Sin embargo, las lesiones también pueden ser observadas en el hígado y el riñón (**Figura 2b**). En la necropsia el duodeno, yeyuno e íleon y a veces también el ciego, se observan comúnmente con paredes delgadas, friables y llenas de gas. Se observa la mucosa con una necrosis confluyente en gran parte del intestino delgado, cubierto con una membrana o pseudomembrana diftérica de un color que va del gris marrón al amarillo verdoso, que en aves es

descrita como “toalla turca” (**Figura 1**) (Van Immerseel *et al.*, 2004; Opengart, 2008; Songer, 2010; Timbermont *et al.*, 2011). Las manchas de sangre también han sido descritas, pero la hemorragia no es una característica prominente. Las lesiones en la enfermedad subclínica es observada en forma de úlceras en la superficie de la mucosa, con un material descolorido y amorfo que esta adherido a la superficie de la mucosa (**Figura 1**) (Kaldhusdal y Hofshagen, 1992).

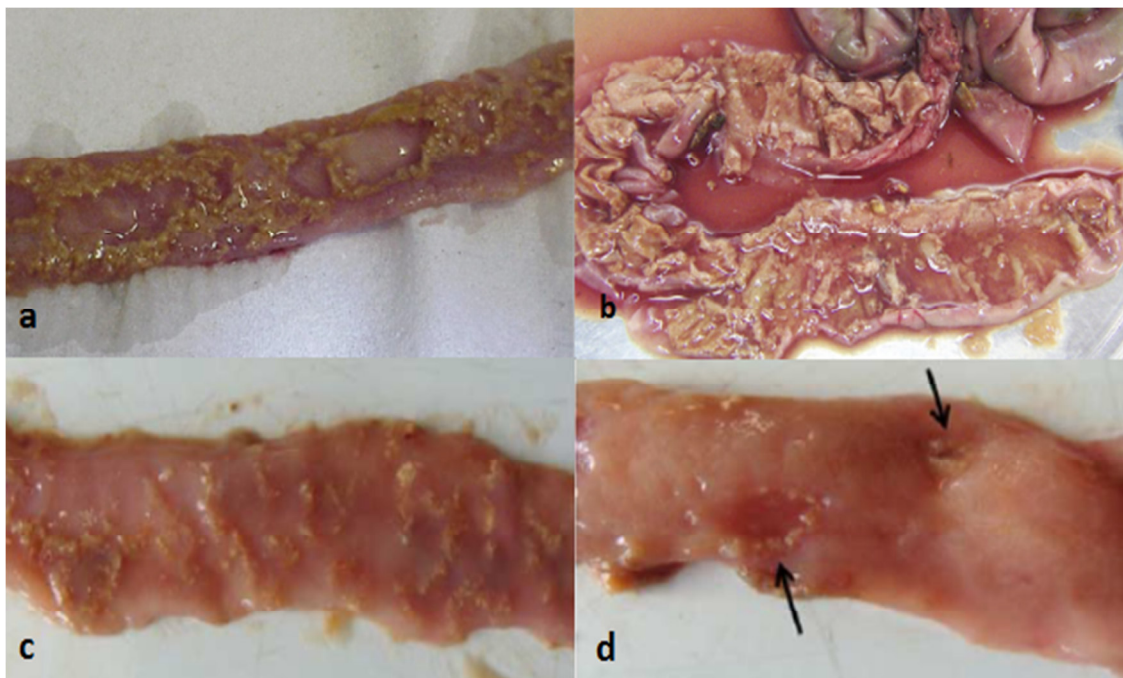


Figura 1: a, b y c) típicas lesiones de enteritis necrótica en su forma aguda, observadas en el intestino delgado de pollos de engorde; d) lesiones observadas en la forma subclínica, las flechas señalan la zonas de necrosis focalizada (modificado de Opengart, 2008; Van Immerseel *et al.*, 2009).

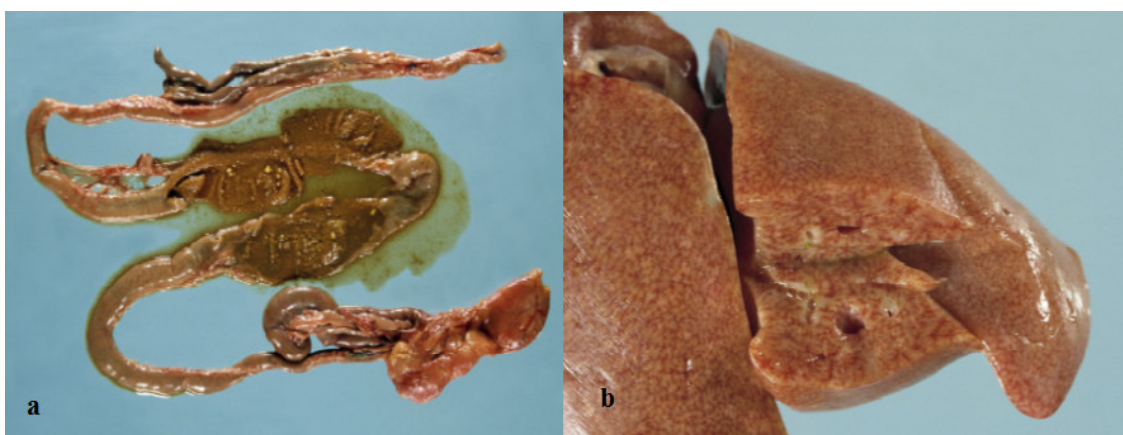


Figura 2: a) Severa lesión necrótica en el yeyuno; b) hígado con colangiohepatitis (modificado de Johansson, 2006)

2.4.7 Lesiones microscópicas

Los cambios microscópicos en la infección se caracterizan principalmente por una severa necrosis de la mucosa intestinal, con una gran cantidad de fibrina mezclada con detritos celulares adheridos a la mucosa necrótica. Las lesiones en los estadios iniciales de la infección se desarrollan en el ápice de las vellosidades y se caracterizan por el desprendimiento del epitelio y colonización de la lámina propia expuesta por parte de bacilos, todo esto acompañado por necrosis coagulativa. Las áreas de necrosis se encuentran rodeadas por heterófilos. Las lesiones avanzan progresivamente desde el ápice de las vellosidades hacia las criptas. La necrosis se puede extender hasta la capa submucosa y muscular del intestino. En muchos brotes se observan en los intestinos los estadios sexual y asexual de las coccidias (Opengart, 2008; Timbermont *et al.*, 2011).

2.4.8 Patogénesis

La patología en la enteritis necrotizante está asociada con la producción y liberación de las toxinas alfa y beta en el intestino por parte del *Clostridium perfringens*. Existe un debate sobre el evento que inicia la producción de toxinas y la importancia del número relativo de clostridios dentro del intestino de aves sanas y enfermas. Estudios han encontrado que el *Clostridium perfringens* es la principal bacteria anaerobia en tracto intestinal de pollos saludables y su población está determinada por el estado de salud del ave. Aunque el evento que lleva a la producción de toxinas aun no es claro, se sabe que las toxinas inducen los signos clínicos y las lesiones características de la enteritis necrotizante (Opengart, 2008).

La toxina alfa es una esfingomielinasa fosfolipasa C que hidroliza los fosfolípidos de las membrana celulares y promueve la desorganización de la mucosa. La hidrólisis de la membrana celular de los enterocitos induce la cascada del ácido araquidónico que luego induce la producción de mediadores inflamatorios, como los leucotrienos, prostaciclina, factor de agregación plaquetaria y tromboxanos (Bunting *et al.*, 1997). Estos mediadores producen la vasoconstricción, agregación de plaquetas y disfunción del músculo cardíaco, llevando a una muerte aguda. La toxina beta induce la necrosis hemorrágica de la mucosa intestinal (Van Immerseel *et al.*, 2004; Opengart, 2008).

2.5 Promotores de crecimiento

Los promotores de crecimiento son sustancias químicas y biológicas que son adicionadas al alimento con el objetivo de mejorar el crecimiento de los pollos de carne, en busca de mejorar la utilización del alimento y de esta manera obtener mejores resultados productivos y financieros. El efecto positivo puede ser expresado a través del aumento del apetito, mejor conversión alimenticia, estimulación del sistema inmune, aumento de la vitalidad y regulación de la microflora intestinal (Perić *et al.*, 2009).

2.5.1 Antibióticos promotores de crecimiento (APC)

El término Antibiótico Promotor de Crecimiento (APC) es usado para describir cualquier medicina que destruye o inhibe el crecimiento de bacterias y es administrado a dosis subterapéuticas. Se considera que estos fármacos mejoran la calidad de los productos animales, con una carne de porcentaje bajo en grasa y alto en proteína. Otro efecto benéfico del uso de APCs incluye el control de patógenos zoonóticos, tales como la *Salmonella*, *Campilobacter*, *Escherichia coli* y enterococos (FAO, 2004).

El efecto de los antibióticos como promotores de crecimiento fue descubierto en 1940, cuando se observó que los animales alimentados con micelios secos de *Streptomyces aureofaciens* conteniendo residuos de clortetraciclina mejoraban su crecimiento. Los APCs se empezaron a usar en producción animal en la década de los años cincuenta, en Estados Unidos y otros países, mostrando efectos benéficos en la eficiencia productiva en cerdos y pollos (Dibner y Richards, 2005). En Estados Unidos el FDA (The United States Food and Drug Administration) aprobó el uso de los antibióticos como aditivos en la alimentación animal sin prescripción veterinaria en 1951 (Jones y Ricke, 2003). Posteriormente, estudios mostraron que el uso de estos APC podía generar resistencia al antibiótico usado y que incluso los genes que producen resistencia a antibióticos pueden ser transmitidos de la microflora animal a la humana (Dibner y Richards, 2005).

Los antibióticos han sido usados como suplemento alimenticio por más de cincuenta años en los alimentos avícolas. El mecanismo de acción de los antibióticos como promotores de crecimiento está relacionado a las interacciones de estos con la población microbiana intestinal (Dibner y Richards,

2005; Niewold, 2007). La mayoría de APC actúan modificando la flora intestinal, que está asociada a una pobre salud y reducción de performance de los animales (Bedford, 2000). Sin embargo, en años recientes se ha incrementado la preocupación sobre el uso de los antibióticos como suplementos alimenticios a niveles sub terapéuticos en la avicultura debido a la emergencia de bacterias resistentes a múltiples drogas (Wray y Davies, 2000).

a) Bacitracina

La bacitracina es un antibiótico polipeptídico cíclico básico, producido por cepas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis*. La bacitracina comercial es una mezcla de polipéptidos que solo varían en un aminoácido y comúnmente se le asocia con el zinc, ya que es más estable que la bacitracina sola. Este antibiótico mejora las tasas de crecimiento y de conversión alimenticia en pollos, cerdos y bovinos (Capitán-Vallvey *et al.*, 2001). Este antibiótico actúa en la síntesis de la pared celular bacteriana, inhibiendo la desfosforilación de la C₅₅-isoprenil pirofosfato, enzima que es requerida para la regeneración de la pared bacteriana (Stone y Strominger, 1971).

La zinc bacitracina es ampliamente usada en el alimento para pollos en todas las fases (inicio, crecimiento y acabado). Este antibiótico mejora la conversión alimenticia y ganancia de peso, presumiblemente por la alteración de la composición y actividad de la microflora. (Collier *et al.*, 2003; Knarreborg *et al.*, 2002). Así, el consumo de zinc bacitracina aumenta el peso corporal del pollo en un 10,8% y reduce la conversión alimenticia con un 31% de aumento en la captación de grasa abdominal (Abdulrahim, 1999). Esta práctica puede modificar la flora intestinal y crear una presión selectiva a favor de la resistencia bacteriana (Aarestrup, 2000; Singer y Hofacre, 2006).

El uso de zinc bacitracina dietaria, se ha encontrado que altera la composición bacteriana del intestino delgado en pollos de engorde, que son tanto benéficos como negativos para el crecimiento del pollo (Pedroso *et al.*, 2006). En un estudio se mostró que la zinc bacitracina y salinomicina solas o en combinación reducen significativamente el número de *Clostridium perfringens* y *Lactobacillus salivarius* que producen la disminución del crecimiento del pollo de engorde por la competición de nutrientes o mala absorción de las grasas. Sus experimentos también han demostrado que el zinc

bacitracina puede reducir significativamente el número de bacterias coliformes en el ileon y aumentar las actividades de amilasa y lipasa, lo que aumenta la tasa de crecimiento (Engberg *et al.*, 2000).

2.5.2 Enzimas

Las enzimas son uno de los muchos tipos de proteínas que poseen los sistemas biológicos. Su característica esencial es la de catalizar la velocidad de reacción, pero sin ser alterarse ella misma por la reacción. Las enzimas están involucradas en todas las vías anabólicas y catabólicas de la digestión y el metabolismo. Las enzimas son catalizadores muy específicos que actúan sobre un, a lo sumo, limitado grupo de compuestos conocidos como sustratos. Otra característica importante de las enzimas, es que la velocidad con la cual cataliza una reacción, incrementa cuando la concentración del sustrato incrementa, pero en el momento donde ya no hay más respuesta, se dice que la enzima está saturada (Khattak *et al.*, 2010).

Todos los animales usan enzimas para digerir sus alimentos. Estos se producen, ya sea por el mismo animal o por microorganismos de la microflora en el intestino. Sin embargo, el proceso digestivo no es 100% eficiente, los cerdos y pollos, por ejemplo, no pueden digerir entre el 15-25% del alimento, ya que el alimento contiene ingredientes indigestibles, factores antinutricionales que interfieren con el normal proceso de digestión o al animal le falta alguna enzima específica que digiera ciertos componentes en el alimento. La suplementación del alimento con enzimas específicas mejora el valor nutricional de los ingredientes del alimento, incrementando la eficiencia de la digestión (Bedford y Partridge, 2010).

Las enzimas agregadas en el alimento ayudan a digerir los factores antinutricionales (fibras, fitatos) que están presentes en muchos ingredientes del alimento. Estos factores antinutricionales pueden interferir con el normal proceso de la ingestión, resultando en la disminución de la producción de huevos, carne y eficiencia alimenticia. Las enzimas aumentan la disponibilidad de almidones, proteínas, aminoácidos y minerales tales como el fósforo y el calcio. Además, las enzimas se pueden usar en animales jóvenes, que no producen una adecuada cantidad de enzimas para ingerir los diferentes ingredientes del alimento. Las enzimas al ser proteínas, no dejan ningún tipo de residuos en la carne o huevos (Bedford y Partridge, 2010).

Las enzimas descomponen los polisacáridos no amiláceos (NSP). Los NSPs son carbohidratos poliméricos que difieren en su composición y estructura con la del almidón y poseen entrecruzamientos químicos entre ellos, por lo tanto, no son bien digeridos por las aves de corral y aumentan la viscosidad intestinal. Las enzimas en la industria de la alimentación han sido en su mayoría utilizadas para que las aves de corral neutralicen los efectos de la viscosidad generada por los NSPs de cereales como la cebada, trigo y centeno. Los NSPs reducen la digestión y la absorción de todos los nutrientes en la dieta, especialmente la grasa y la proteína. Las enzimas agregadas al alimento descomponen estos NSPs, disminuyendo la viscosidad intestinal y eventualmente mejorando la digestibilidad de los nutrientes (Khattak *et al.*, 2010).

El uso de enzimas para alimentación animal genera varios beneficios. Estos beneficios incluyen: reducción de la viscosidad del alimento, de modo que el pasaje de nutrientes sea mayor y proporcione menos sustrato y menos tiempo para que los microorganismos fermentadores proliferen, mejorando la digestión y absorción de nutrientes, especialmente de las grasas y proteínas, lo cual lleva a la producción de más carne o huevos por kilogramo de alimento, reduciendo así los costos (Bedford y Partridge, 2010). Genera un mejor medio ambiente, ya que al mejorar la absorción de nutrientes se reduce la producción de excretas y de nitrógeno y fósforo. Ayuda a mantener la salud intestinal, mejorando la digestibilidad de nutrientes, ya que hay menos nutrientes disponibles en el intestino que pueden ser aprovechados por bacterias patógenas (Odetallah *et al.*, 2005 y Wang *et al.*, 2005; Bedford y Partridge, 2010).

Estudios realizados por diferentes autores mostraron que los problemas de coccidiosis (factor predisponente a Clostridiasis) podrían prevenirse por el uso de enzimas. Las aves alimentadas con una dieta a base de trigo con y sin suplementación de glicanasa mostraron muy diferentes respuestas al desafío de coccidia. En el grupo control el crecimiento fue deprimido por 52,5%, mientras en el grupo al que se le suministró enzimas en el alimento, la tasa de crecimiento disminuyó en sólo 30,5% y a su vez poseía un mejor score de lesiones (Bedford, 1995; Khattak *et al.*, 2006). Las enzimas que pueden degradar los NSP también reducirían la proliferación de bacterias patógenas tales como *Clostridium perfringens* (Jackson *et al.*, 2003).

El efecto positivo de la administración de enzimas en la dieta depende de muchos factores. Tales factores incluyen la cantidad y calidad del alimento incluido en la mezcla, nivel y tipo de enzimas así como condiciones de engorde (Cowieson *et al.*, 2006). Algunas investigaciones indican que se obtienen mejores resultados con la utilización de dos o más enzimas en la ración y que incluso el tratamiento físico al que se someten los alimentos que contienen las enzimas influyen en su desempeño (Silversides y Bedford, 1999; Chesson, 2001).

2.5.2.1 Tipos de enzimas usadas en nutrición animal

Las enzimas se categorizan de acuerdo al sustrato sobre el que ellos actúan. En la actualidad, los tipos de enzimas usados en nutrición animal son usados para digerir fibra, proteínas, almidón y fitatos.

a) Carbohidrasas: Degradan los carbohidratos en azúcares simples. En nutrición animal ellos pueden ser categorizados ampliamente en dos grandes grupos: las enzimas cuyo sustrato son los polisacáridos no amiloides (fibra) y las enzimas cuyos sustratos son los almidones. Del primer grupo tenemos a la xilanasas y las β -glucanasas, que son las más usadas, además también se usan las β -manasas, pectinasas y α -galactosidasas. En el segundo grupo tenemos a las amilasas.

b) Proteasas: Son enzimas que digieren proteínas y que son usadas en la nutrición animal para digerir las proteínas almacenadas en diferentes componentes de las plantas y antinutrientes proteínicos en proteínas vegetales. En el primer caso tenemos a las semillas de las plantas leguminosas, principalmente las semillas de soya, que contienen altas cantidades de proteínas almacenadas; y en el segundo caso tenemos los inhibidores de tripsina (el cual se encuentra en la proteína vegetal cruda e inhiben a la tripsina, la cual sirve para digerir proteínas) y las lectinas (Bedford y Partridge, 2010).

c) Fitatas: La gran parte del fósforo que deriva de los ingredientes de las plantas se encuentra en forma de fitatos, el cual se encuentra almacenado principalmente en la semillas de las plantas, formando complejos con minerales (fósforo y calcio), proteínas y almidones. Los pollos al no producir fitasas que rompan a los fitatos no pueden aprovechar los nutrientes que estos contienen, por lo que la

adición de fitasas en la dieta de pollos puede mejorar la disponibilidad y absorción de nutrientes (Bedford y Partridge, 2010).

d) Lisozimas: Son proteínas con propiedades antibióticas naturales y están presentes en un gran número de secreciones en animales y es considerado un componente importante del sistema inmune innato. La lisozimas ejercen su actividad antibiótica mediante la hidrólisis de los enlaces β -1,4-glucosídicos entre el ácido N-acetilneuramínico y la N-acetilglucosamina de la pared bacteriana de peptidoglucano, siendo más efectivas con una gran variedad de bacterias Gram + (Phillips, 1966). Estudios han demostrado que la adición de lisozimas en la dieta de pollos puede reducir significativamente la concentración de *Clostridium perfringens* en el íleon, inhibir el crecimiento excesivo de *E. coli* y *Lactobacillus* en esta sección del intestino y mejorar la actividad de la lisozima intestinal en el duodeno, mejorando así el índice de conversión alimenticia en los pollos (Liu et al., 2010).

2.5.3 Fitobióticos

Muchas plantas tienen propiedades beneficiosas multifuncionales. Los efectos beneficiosos son producidos por derivados obtenidos a partir de componentes bioactivos específicos, los cuales son en su mayoría metabolitos secundarios, tales como los terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y politerpenos), compuestos fenólicos (taninos), glucósidos, alcaloides (presentes como alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres y lactonas (Huyghebaert *et al.*, 2011). Hay una gran cantidad de variaciones en la composición de estos compuestos, debido a factores biológicos (especies de plantas, ubicación y condición de las cosechas), la industria manufacturera (extracción, destilación y estabilización) y las condiciones de almacenamiento (luz, temperatura, la tensión de oxígeno y el clima) (Huyghebaert *et al.*, 2011).

Los aditivos fitobióticos influyen en la mejora del consumo y conversión de alimento, la digestibilidad y aumento de peso de pollos de engorde (Ertas *et al.*, 2005). Los mecanismos de acción de estos aditivos no están totalmente claros. Sin embargo, algunos extractos de plantas parecen que

influyen en la digestión y secreción de enzimas digestivas y además muestran actividad antibiótica, antiviral y antioxidante (Ertas *et al.*, 2005; Cross *et al.*, 2007).

En los estudios en los que se adicionaron fitobióticos en la nutrición de pollos aún no han mostrado resultados concluyentes. Algunos autores expresan una importancia significativa en la performance de los pollos de engorde (Ertas *et al.*, 2005; Cross *et al.*, 2007, Perić *et al.*, 2008), mientras que otro grupo de autores sostienen que si bien tiene un efecto positivo aumento de peso, el consumo de alimento o la conversión alimenticia, también genera una disminución en la calidad de la carcasa, puesto que puede aumentar la cantidad de tejido graso en el abdomen (Ocak *et al.*, 2008).

Los diferentes resultados obtenidos en los estudio del efecto de los fitobióticos en el rendimiento de los pollos tienen un carácter multifactorial. Entre los diferentes factores se pueden mencionar los siguientes: 1) tipo y parte de la planta empleada y sus propiedades físicas; 2) el tiempo de cosecha; 3) método de preparación del aditivo; 4) la compatibilidad de otros componentes del alimento (Yang *et al.*, 2009). Además, también hay que considerar la calidad de los pollos de carne, su estado de salud y las condiciones de la granja. Por lo tanto, el efecto positivo de los fitobióticos puede ser variable. Así, considerando resultados previos, los investigadores afirman que este grupo de aditivos poseen un gran potencial, pero la combinación y la dosis deben de ser adecuadamente seleccionadas (Perić *et al.*, 2009).

Se ha estudiado la actividad de fitobióticos en contra de *Clostridium perfringens*. En un estudio en el cual se utilizaron diferentes productos obtenidos de *Backhous iacitriodora* (“mirto limón”), se demostró la actividad antibiótica in vitro de esta planta contra varias bacterias, incluyendo *Clostridium perfringens* (Wilkinson *et al.*, 2003). En un estudio de campo en pollos de engorde, se evaluó el efecto de 2 preparados de aceites esenciales (timol, eugenol, curcumina, piperina y carvacrol) mezclados con el alimento y el conteo fecal de *Clostridium perfringens*. En este estudio se logró reducir el conteo fecal de *Clostridium perfringens* en las muestras obtenidas de pollos tratados con los aceites esenciales, indicando esto, que pueden ser de ayuda en la prevención de la Clostridiosis (Mitsch *et al.*,

2004). Sin embargo, se requieren mayores estudios para demostrar la eficacia in vivo de productos derivados de plantas con actividad antimicrobiana (Ertas *et al.*, 2005).

2.5.4 Probióticos

Los probióticos son microorganismos individuales o en grupo que tienen un efecto favorable en el hospedero ya que mejoran las características de la microflora intestinal (Fuller, 1989). Los microorganismos que pertenecen al grupo de los probióticos son ciertas especies de bacterias hongos y levaduras, pudiendo ser clasificados como especies colonias (*Lactobacillus sp.*, *Enterococcus ssp.* y *Streptococcus sp.*) y especies libres no colonizadoras (*Bacillus* y *Saccharomyces cerevisiae*) (Perić *et al.*, 2009).

Los probióticos muestran varios mecanismos de acción. Uno de estos mecanismos es la acción antagonica hacia bacterias patógenas mediante la secreción de productos que inhiben su desarrollo, tales como bacteriocinas, ácidos orgánicos y peróxido de hidrogeno. Otro mecanismo se conoce como exclusión competitiva, el cual es la competencia por el lugar de adherencia en la mucosa del intestino delgado, por lo que los microorganismos patógenos son excluidos del tracto digestivo. También existe la competencia de los probióticos con los microorganismos patógenos por las sustancias nutritivas presentes en el tracto digestivo (Patterson y Burkholder, 2003).

Los probióticos tienen varios efectos positivos en la producción. Estos efectos se ven reflejados en la reducción de riesgos de enfermedades, mejora en la función del sistema inmune y una significativa influencia en las características morfo-funcionales del intestino (Perić *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009). Todo ello se ve reflejado en el crecimiento del pollo, en la mejora del índice de conversión alimenticia y reducción de la mortalidad (Perić *et al.*, 2009).

2.5.5 Prebióticos

Los prebióticos son definidos como componentes/ingredientes no digeribles que tienen un efecto positivo en el hospedero ya que estimulan selectivamente el crecimiento o activación de uno o un limitado número de especies bacterianas que ya residen en tracto intestinal y por lo tanto mejoran la salud del huésped (Gibson y Roberfroid, 1995). Los principales componente que pertenecen al grupo

de prebióticos son los oligosacáridos: fructo-oligosacaridos (FOS), gluco-oligosacaridos y los manano-oligosacaridos (Perić *et al.*, 2009).

Los prebióticos tienen ventaja sobre los probióticos, ya que ellos promueven el crecimiento de bacterias útiles las cuales ya han estado en el huésped y se adaptan a todas las condiciones medioambientales del intestino (Yang *et al.*, 2009). Los efectos favorables de la adición de prebióticos en el alimento se ven reflejado en el antagonismo hacia microorganismos patógenos, competición con los patógenos, la estimulación de la reacción de enzimas, reducción de la producción de compuestos amoniacales y fenólicos y el incremento de la resistencia a la colonización (Perić *et al.*, 2009).

2.5.6 Otros promotores de crecimiento

a) Acidificantes: los acidificantes han sido utilizados en la avicultura por largo tiempo, en diferentes formas y combinaciones, las cuales están en constante cambio. Los acidificantes reducen el pH del alimento, y de esta forma actúa como un agente conservante y previene la contaminación microbiológica del alimento y del tracto digestivo de los pollos. Los acidificantes mejoran el consumo de alimento, mejoran el índice de conversión alimenticia e incrementan la ganancia de peso. Tanto el ácido fórmico y el ácido fumárico, solos o en combinaciones han demostrado tener efectos benéficos en las aves (Perić *et al.*, 2009).

b) Antioxidantes: a este grupo pertenecen las sustancias que funcionan como antioxidantes, como la vitamina E, el selenio, carotenoides, etc. El selenio forma parte de la enzima glutatión peroxidasa, la cual previene formación de radicales libres, los cuales son muy perjudiciales para la célula (Perić *et al.*, 2009). Por ello el selenio y otros antioxidantes tienen un efecto favorable en la calidad de la carne de pollo. Se ha establecido un mejor efecto protector del selenio cuando este está en su forma orgánica en comparación con una forma inorgánica. Uno de los conceptos más aceptados en cuanto a la preservación de las propiedades sensoriales de la carne, es la adición de antioxidantes (tales como el selenio y la vitamina E) directamente al alimento de los animales o durante el procesamiento de los mismos (Surai, 2002).

c) **Simbióticos:** los simbióticos son una combinación principalmente de probióticos y prebióticos, así como también de otras sustancias promotoras de crecimiento, las cuales al ser administradas juntas exhiben un efecto conjunto en la salud del tracto digestivo, digestibilidad y productividad de los pollos. Las investigaciones han mostrado que el uso combinado de promotores de crecimiento es a menudo más eficiente en relación al uso individual de cada uno de ellos (Li *et al.*, 2008). En este caso, así como en los otros promotores de crecimiento, el efecto benéfico de su aplicación dependerá de diversos factores (Perić *et al.*, 2009).

III.-MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de estudio

La crianza de las aves se realizó en el galpón experimental del Laboratorio de Producción Avícola y las necropsias en el Laboratorio de Patología Aviar, ambos ubicados en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; la cual está ubicada en el distrito de San Borja, provincia de Lima.

3.2 Materiales

3.2.1 *Animales*

Se utilizaron 575 pollos de engorde de sexo macho de la línea Cobb Vantress 500.

3.3.2 *Alimento*

Se usó un alimento comercial conteniendo una dieta estándar de maíz-soya para pollos de engorde, conteniendo un promotor de crecimiento de acuerdo a lo especificado para cada tratamiento.

3.2.3 *Promotores de crecimiento*

Promotores de crecimiento usados en el alimento:

- Lisozima encapsulada
- Fitobiótico (*Humulus lupulus*)
- Zinc Bacitracina

3.2.4 Desafío

Las aves fueron desafiadas con cepas de Eimerias y posteriormente con *Clostridium perfringens*. Para el desafío de coccidias, se usó 3220 dosis de una vacuna viva no atenuada conteniendo 2,5 – 2,9 x 10⁵ Oocistos / 1000 dosis de cuatro cepas de Eimerias (*Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima*, *Eimeria necatrix* y *Eimeria tenella*). Además, para el desafío de clostridios se usaron 960 mL de un inoculo conteniendo 108 UFC/mL de *Clostridium perfringens*.

3.2.5 Equipos

Para la crianza se usaron los siguientes equipos: comederos tipo tolvas, bebederos automáticos tipo “Plasson”, campanas de calefacción a gas, mallas divisorias, arpilleras, cercos de nordex, termómetros ambientales, balanza electrónica con exactitud de 10 g, guantes de látex y una Cámara digital.

3.2.6 Vacunas

Se emplearon vacunas contra la enfermedad de Marek, Bronquitis infecciosa (H120) y enfermedad de Newcastle.

3.2.7 Programa estadístico

Se empleó para el análisis de datos el programas estadístico Stata 11.1 (Stata Corp), trabajándose con un microprocesador AMD Sempron, 1800 MHz (9 x 200) 3200+.

3.3 Metodología

3.3.1 Diseño experimental

3.3.1.1 Tamaño muestral

El tamaño muestral para este estudio fue calculado utilizando la fórmula de Diferencia de Medias, tomando como parámetro la Ganancia de Peso.

$$n = 2 \left(\frac{Z(\alpha) + Z(\beta) \cdot S}{m_1 - m_2} \right)^2$$

Dónde:

n = Tamaño de muestra requerido

$Z(\alpha)$ = Valor tabular de Z para el 95% de confianza

$Z(\beta)$ = Valor de la T de Student para el 80% de potencia de la prueba

S = Desviación Estándar esperada

m_1 = Media esperada del peso del tratamiento 1

m_2 = Media esperada del peso del tratamiento 2

$m_1 - m_2$ = Diferencia entre las dos medias esperadas

Para el presente trabajo se utilizó lo siguientes valores:

$Z(\alpha) = 1.96$

$Z(\beta) = 0.84$

$S = 250$ g

$m_1 = 2800$ g

$m_2 = 2630$ g

$m_1 - m_2 = 170$ g

Obteniéndose un $n=34$, como mínimo número de aves por tratamiento. Sin embargo, por razones de logística se emplearon 15 aves por cada tratamiento, teniéndose un total de 575 aves.

3.3.1.2 Diseño del estudio

Las 575 aves fueron distribuidas en un diseño completamente aleatorio en 5 grupos experimentales de 115 aves con 5 repeticiones de 23 aves cada una (Cuadro 2). Las aves fueron criadas en un área de 1.5m x 1.5 m por cada corral, obteniéndose así una densidad de 10 aves por m², sobre piso de cemento con cama de viruta de madera. Los tratamientos fueron identificados como: G1, G2, G3, G4 y G5; de acuerdo al siguiente programa:

Cuadro 2: Distribución de los grupos por tratamiento y desafío

Grupo	Tratamientos	Dosis del tratamiento	Desafío con <i>Eimeria spp.</i>	Desafío con <i>Clostridium spp.</i>
G1	Lisozima encapsulada	0.5Kg/TM	14 y 22 días	26 días
G2	Fitobiótico (<i>Humulus lupulus</i>)	1Kg/TM	14 y 22 días	26 días
G3	Zinc Bacitracina	0.5Kg/TM	14 y 22 días	26 días
G4	Control Positivo	-	14 y 22 días	26 días
G5	Control Negativo	-	Sin desafío	Sin desafío

Las aves fueron alimentadas con un alimento comercial estándar conteniendo un promotor de crecimiento de acuerdo a lo especificado para cada tratamiento. El agua y alimento fueron suministrados *ad libitum*, siguiendo un programa de 3 fases de alimentación:

- Dieta de inicio (0-10 días de edad).
- Dieta de crecimiento (11-22 días de edad).
- Dieta de acabado (23-42 días de edad).

En todas las aves se llevó a cabo el programa de vacunación que se indica a continuación:

- Día 1: en la planta de incubación contra la enfermedad de Marek, Bronquitis Infecciosa (H120) y enfermedad de Newcastle.
- Día 13: en las unidades de experimentación las aves fueron revacunadas contra la enfermedad de Newcastle.
- Además, las aves de todos los grupos recibieron como anticoccidial diclazuril (0.2Kg/TM) en el alimento hasta los 21 días de edad.

3.3.3.3 *Desafío experimental*

a) *Desafío experimental con cepas de Eimeria*

Con el fin de producir un daño al epitelio intestinal para la colonización posterior con cepas de *Clostridium spp.*, se realizaron dos desafíos con cepas de cuatro especies *Eimeria* de pollos. El desafío se realizó simultáneamente vía oral y en agua de bebida a todas las aves de los grupos G1, G2,

G3 y G4. El primer desafío fue realizado a los 14 días de edad, con una vacuna viva contra coccidia conteniendo oocistos de *Eimeria acervulina*, *Eimeria máxima*, *Eimeria necatrix* y *Eimeria tenella*, usando una doble dosis de vacuna ($2,5 - 2,9 \times 10^5$ Oocistos / 1000 dosis). El segundo desafío se llevó a cabo a los 22 días de edad, esta vez con cinco dosis de la misma vacuna usada en el primer desafío ($2,5 - 2,9 \times 10^5$ Oocistos / 1000 dosis).

b) Desafío experimental con cepas de *Clostridium spp.*

El desafío experimental fue hecho en forma individual a cada ave de los grupos G1, G2, G3 y G4, con 2 mL de un inóculo de *Clostridium perfringens* con un título de 10^8 UFC/mL. aplicado por vía oral a los 26 días de edad.

3.3.3.4 Evaluación de parámetros productivos

a) Peso corporal promedio: Fueron pesadas el 100% de las aves de cada grupo desde el primer día y luego semanalmente hasta el final del estudio. Fue obtenido sumando los pesos individuales y dividiendo el resultado entre el número de aves que conforman cada grupo.

b) Ganancia de peso: Se determinó por semana y por grupo.

c) Consumo de alimento: Fue registrado el consumo semanal y acumulado de cada grupo hasta el final del experimento.

d) El índice de conversión alimenticia (ICA): Es la cantidad de alimento requerido para producir un kilogramo de peso vivo por ave. Fue evaluado semanalmente.

$$\text{I.C.A} = \frac{\text{Consumo acumulado (Kg) x ave}}{\text{Peso (Kg) x ave}}$$

e) Porcentaje de mortalidad acumulada: Fue calculada al término del estudio.

$$\text{Mortalidad} = \frac{\text{Número de aves muertas X 100}}{\text{Número total de aves}}$$

f) Índice de Eficiencia Productivo Europeo (I.E.P.E): Evalúa el rendimiento productivo integral de cada grupo al final del estudio y considera todos los parámetros.

$$\text{I.E.P.E} = \frac{\text{Viabilidad\%} \times \text{Peso vivo promedio (Kg)} \times 100}{\text{I.C.A} \times \text{Edad a la saca}}$$

Donde Viabilidad = 100% - % de Mortalidad

g) Uniformidad: Se obtuvo tomando como base el registro de los pesos corporales, se determinó el porcentaje de aves cuyo peso estuvo entre el 10% mayor y 10% menor del peso promedio .

$$U = \frac{(\text{Peso promedio} \pm 10\%)}{100}$$

3.3.2 Análisis de datos

Los valores de la ganancia de peso, consumo de alimento, índice de conversión alimenticia e índice de eficiencia productiva europea, fueron registrados para cada semana de la crianza. Los valores obtenidos en la sexta semana de crianza, para cada parámetro productivo, fueron analizados con la prueba de ANOVA de un factor, para saber si existe o no diferencia significativa entre los grupos. Para ello se usó el programa estadístico Stata 11.1 (StataCorp).

3.3.3 Manejo general de los animales

La fase experimental se llevó a cabo entre el 09 de Noviembre y el 21 de Diciembre del 2011. Todas las aves fueron criadas a galpón abierto en un mismo ambiente sobre piso de cemento, con cama de viruta de madera y cortinas externas para controlar la temperatura ambiental. Para las divisiones de los corrales se usaron mallas metálicas firmemente colocadas.

Para el inicio de la crianza, las aves fueron criadas en un cerco de nordex hasta los 12 días de edad, en los cuales se les mantuvo con luz las 24 horas del día, alimentándolos en comederos planos lineales y ofreciéndoles agua en bebederos tipo “tonguito”. El día de la recepción de los pollitos se realizó el pesaje cada uno de ellos y de la misma manera se realizó semanalmente hasta los 42 días, coincidiendo con el momento de la saca. Los pesos fueron registrados en forma individual y promedio grupal.

El control de la temperatura ambiental se logró con el manejo diario de las cortinas en las horas de mayor calor (11 am – 3 pm) y por el uso de un “cielo raso” que fue colocado hasta los 21 días. A partir del día 21 se usaron comederos tipo tolva y bebederos tipo “Plasson”, administrándose agua *ad libitum* y alimento dos veces al día. Durante toda la campaña se realizó constantemente la limpieza al interior del galpón, además, se realizaron evaluaciones diarias de las aves en sus respectivos corrales (5 a 6 veces por día).

En los días posteriores a los desafíos, tanto de coccidias como de *Clostridium spp.*, las aves fueron evaluadas diariamente, en busca de algún signo clínico, mortalidad o lesión, hasta el día 42 de edad. Esta evaluación tomó en cuenta aves postradas, depresión, diarrea, heces con sangre, de color naranja (disbacteriosis), plumaje erizado y despigmentación en las patas.

IV.- RESULTADOS

4.1 Peso corporal promedio

Para cada grupo el peso corporal promedio fue obtenido sumando los pesos individuales y dividiendo el resultado entre el número de aves de cada grupo. Al final del experimento (sexta semana) se observó que las aves del grupo uno, tratadas con lisozimas encapsuladas (G1) fueron las que obtuvieron un ligero mayor peso promedio (2634.05 g) con respecto a los demás grupos. Así, el grupo con el segundo mejor peso corporal promedio fue el G2 (2620.26). El grupo con menor peso fue el control positivo G4 desafiado y sin promotor (2578.04 g). (Cuadro 3)

Cuadro 3: Peso corporal promedio por semana hasta los 42 días de edad

Edad (días)	Peso corporal (g)				
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
0	49.74	49.43	49.83	49.22	49.65
7	147.32	144.53	146.17	144.70	145.46
14	394.17	383.68	395.98	387.06	392.32
21	759.75	767.95	767.00	744.72	764.60
28	1297.90	1323.18	1321.22	1311.34	1326.21
35	1999.91	1988.33	1974.78	1975.74	1996.35
42	2634.05	2620.26	2582.11	2578.04	2615.04

4.2 Ganancia de peso

La ganancia de peso, fue calculada por cada semana y por cada grupo sumando las ganancias individuales y dividiendo el resultado entre el número de aves de cada grupo. Al final del experimento (sexta semana) se observó que las aves de G2, tratadas con fitobiótico, fueron las que obtuvieron una mayor ganancia de peso promedio (2570.82 g) con respecto a los demás grupos, aunque, con una diferencia bastante pequeña con respecto al grupo control negativo, que fue el segundo con mayor ganancia de peso promedio (2565.39 g). El grupo con la menor ganancia de peso promedio fue el control positivo G4 con 2528.82 g. (Cuadro 4).

Cuadro 4: Ganancia de peso promedio por semana y hasta los 42 días de edad

Edad (días)	Ganancia de peso (g)				
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
7	97.58	95.09	96.35	95.48	95.81
14	344.43	334.24	346.16	337.84	342.67
21	710.01	718.52	717.42	695.5	714.95
28	1248.16	1273.75	1271.4	1262.12	1276.56
35	1950.17	1938.9	1924.26	1926.53	1946.7
42	2548.31	2570.82	2532.28	2528.82	2565.39

4.3 Consumo de alimento

4.3.1 Consumo semanal promedio por ave

Es el consumo promedio de alimento que tuvo cada grupo se evaluo en cada una de las seis semanas que duro el experimento (Cuadro 5).

4.3.2 Consumo acumulado promedio por ave

Es el consumo promedio acumulado de alimento que tuvo cada grupo se evaluo al final de las seis semanas que duro el experimento. El grupo con un mayor consumo acumulado fue el grupo control

positivo G4 (4797.82 g), aunque, al igual que en los otros parametros evaluados, esta diferencia fue pequeña. El segundo grupo con mayor consumo fue el grupo control negativo G5 con 4753.24 g, el grupo con menor consumo acumulado fue el G1, tratado con lizozima encapsulada, con 4676.12 g (Cuadro 6).

Cuadro 5: Consumo semanal promedio por ave (en gramos) por cada grupo

Edad (días)	Consumo de alimento (g)				
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
7	159.78	167.32	161.09	165.87	159.78
14	364.48	366.56	366.17	367.74	363.17
21	625.83	629.66	626.96	622.57	624.7
28	932.14	938.1	949.59	954.36	939.13
35	1176.48	1189	1219.58	1230.11	1231
42	1417.41	1404.97	1391.28	1457.17	1435.46

Cuadro 6: Consumo promedio de alimento acumulado (en gramos) por cada grupo

Edad (días)	Consumo de alimento (g)				
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
7	159.78	167.32	161.09	165.87	159.78
14	524.26	533.88	527.26	533.61	522.96
21	1150.09	1163.65	1154.22	1156.18	1147.65
28	2082.23	2101.75	2103.81	2110.54	2086.78
35	3258.71	3290.75	3323.39	3340.65	3317.78
42	4676.12	4695.72	4714.67	4797.82	4753.24

4.4 Conversión de alimento

El índice de conversión alimenticia (ICA) se define como la cantidad de alimento requerido para producir un kilogramo de peso vivo por ave. El grupo con mejor conversión de alimento fue el G1 con un ICA de 1.78, seguido de G2 con un ICA de 1.79, mientras la peor ICA lo presentó G4, con 1.86. Al igual que en los otros parámetros evaluados, las diferencias entre los grupos fueron numéricamente similares (Cuadro 7).

Cuadro 7: Índice de conversión alimenticia por semana por grupo

Edad (días)	ICA				
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
7	1.09	1.16	1.10	1.15	1.10
14	1.33	1.39	1.33	1.38	1.33
21	1.51	1.52	1.50	1.55	1.50
28	1.61	1.59	1.59	1.61	1.57
35	1.63	1.66	1.68	1.69	1.66
42	1.78	1.79	1.83	1.86	1.82

4.5 Índice de Eficiencia Productivo Europeo (I.E.P)

El índice de eficiencia productivo Europeo (I.E.P.E), es aplicable al final del proceso productivo, por lo que se realizó al final del experimento (Cuadro 8). La mejor eficiencia fue obtenida por G1 (349.16) y la peor eficiencia por G4 (327.04).

Cuadro 8: Parámetros productivos e índice de eficiencia productivo Europeo por grupo a los 42 días

Edad (días)	Peso corporal (g)	Ganancia diaria (g)	Viabilidad	ICA	IEE
Grupo 1	2634	62.71	99.1	1.78	349.16
Grupo 2	2620	62.38	99.1	1.79	345.36
Grupo 3	2582	61.47	99.1	1.83	332.91
Grupo 4	2578	61.38	99.1	1.86	327.04
Grupo 5	2615	62.26	100.0	1.82	342.10

4.6 Uniformidad

Cuadro 9: Uniformidad por semana hasta los 42 días de edad

Edad (días)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
0	90.43%	86.09%	84.35%	90.43%	86.09%
7	78.26%	76.25%	80.00%	86.96%	85.22%
14	73.91%	77.11%	77.39%	73.04%	80.00%
21	74.78%	77.11%	76.52%	74.78%	78.26%
28	67.55%	68.18%	78.12%	79.29%	73.00%
35	74.24%	71.00%	75.46%	79.87%	77.00%
42	74.48%	80.00%	75.94%	83.36%	82.22%

4.7 Mortalidad acumulada

La mortalidad acumulada se registró al término del estudio (Cuadro 10), hasta el final del estudio fue muy baja habiéndose registrado solo una ave muerta en cada uno de los grupos G1, G2, G3 y G4, mientras, que G5 (control negativo) no se registró mortalidad alguna.

Cuadro 10: Mortalidad total (%) registrada hasta la sexta semana en los 5 grupos experimentales

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Mortalidad	1	1	1	1	0
% Mortalidad	0.87%	0.87%	0.87%	0.87%	0.00%
Causa	Muerte súbita	Muerte súbita	Muerte súbita	Muerte súbita	

V.- DISCUSIÓN

La enteritis necrotizante es una enfermedad infecciosa de pollos y gallinas causada por el *Clostridium perfringens*, puede presentarse en forma clínica aguda o subclínica. La forma aguda cursa con una alta tasa de mortalidad, mientras que la forma subclínica se caracteriza por afectar principalmente los parámetros productivos (Van Immerseel *et al.*, 2004). Durante los últimos años la incidencia de esta enfermedad se incrementó en aquellos lugares en los que fue prohibido el uso de antibióticos promotores de crecimiento. Es por ello que se han realizado y aun se realizan estudios en busca de mejores alternativas que reemplacen el uso de los antibióticos promotores de crecimiento en el control de la enteritis necrótica (Peric *et al.*, 2009).

La evaluación de los parámetros productivos es una buena medida del efecto negativo de esta enfermedad, sin embargo en pollos de engorde estos parámetros son comúnmente afectados por infecciones subclínicas de coccidias y clostridios. El principal motivo por el cual las empresas avícolas utilizan promotores de crecimiento en la dieta de las aves, es para controlar las infecciones clínicas o subclínicas por Clostridios. En el presente estudio, con el fin de reproducir una enteritis necrótica en las aves y poder evaluar mejor la actividad de los promotores de crecimiento usados, se realizó un desafío con cepas de *Clostridium perfringens* aisladas en el laboratorio; sin embargo el desafío solo ocasionó una infección subclínica (Clostridiosis), simulando mejor la forma más frecuente de infección intestinal por clostridios observada en campo.

Los resultados de nuestro estudio al final del experimento (sexta semana) mostraron que las aves de los grupos G1 (lisozimas encapsuladas.) y G2 (fitobiótico, *Humulus lupulus*), tuvieron 56 y 42 g mas de peso corporal que G5 (no tratado y desafiado), respectivamente. A su vez comparado con G3 (Zin Bacitracina), tuvieron 52 y 38g mas de peso corporal respectivamente. El grupo con menor peso (2578.04 g) fue G4 (control positivo desafiado y sin promotor).

Igualmente con respecto a la ganancia de peso al final del experimento, se observó que las aves de G2, fueron las que obtuvieron una mayor ganancia de peso promedio (2570.82 g) con respecto a los demás grupos, aunque, con una diferencia pequeña con respecto al grupo control negativo (G5), que fue el segundo con mayor ganancia de peso promedio (2565.39 g). El grupo con la menor ganancia de peso promedio fue el control positivo (G4) con 2528.82 g.

El menor consumo de alimento influyó en el grupo G1 el cual presentó la mejor conversión alimenticia (1.78), seguido de G2 (1.79), mientras la peor conversión la presentó el G4 con 1.86. Al igual que en los otros parámetros evaluados, las diferencias entre los grupos fueron pequeñas.

El índice de eficiencia productivo Europeo (I.E.P.E), aplicado al final del proceso productivo, arrojó una mejor eficiencia para G1 (349.16) habiéndose obtenido un 6.76% de mejor rendimiento en este grupo en comparación a G4 (control positivo sin promotor). El grupo con la segunda mejor eficiencia fue G2 obteniéndose un 5.30 % de mejor rendimiento con respecto al control positivo (G4). Comparando G1 y G2 con el tratamiento convencional (Zinc bacitracina –grupo G3) se obtuvo un 4.65% de mejor rendimiento en G1 y 3.60% en G2, evidenciando la ventaja competitiva de estos aditivos sobre el promotor clásico.

Sin embargo, el análisis de varianza (ANOVA) de los parámetros productivos obtenidos (peso promedio, ganancia de peso, índice de conversión alimenticia, consumo de alimento y el índice de eficiencia Europeo) en los cinco grupos del estudio (un grupo tratado con lisozima encapsulada, un fitobiótico, zinc bacitracina, un control positivo y un control negativo) no mostraron diferencia significativa entre ellos ($p > 0.05$). Estos resultados aunque no significativos evidencian el efecto positivo del uso de estos promotores naturales sobre los parámetros productivos de las aves. Estos

resultados son similares a los obtenidos por Asmat (2013) y Gonzales (2011) quienes evaluaron aditivos naturales comparando con zinc bacitracina, pero sin que las aves sean sometidas a un reto experimental.

La lisozima es una proteína con propiedades antibióticas que se presenta en un gran número de secreciones animales y es considerada un importante componente del sistema inmune innato, siendo más efectiva contra bacterias Gram + (Phillips, 1966). Se ha demostrado que la adición de lisozima en la dieta de los pollos, puede reducir el número de *Clostridium perfringens*, mejorar la actividad de la lisozima intestinal y por lo tanto mejorar los parámetros productivos en los pollos (Liu *et al.*, 2010). El producto empleado en G1 es una lisozima encapsulada que se puede agregar en el alimento de los pollos y que ha demostrado dar una protección igual a una medicación por antibióticos al momento de controlar la enteritis necrótica (Berkhout, 2010). En nuestro estudio dentro de los grupos tratados, G1 con lisozima encapsulada obtuvo los mejores parámetros, peso corporal, I.C.A y I.E.P.E, pudiéndose apreciar un efecto positivo aunque no significativo ($p > 0.05$) del producto como promotor y por ende en los parámetros productivos evaluados con respecto a los demás grupos tratados.

Otro de los promotores de crecimiento usados en el estudio fue el fitobiótico (G2), el cual es un preparado que contiene tres ingredientes principales: germen de trigo (15%), maíz (50%) y lúpulo (35%). Este último, el lúpulo (*Humulus lupulus*) posee un ácido amargo llamado lupulona, el cual ha demostrado tener un potente poder antibiótico y en diferentes experimentos ha mostrado ser efectivo en la reducción del número de *Clostridium perfringens* en el contenido intestinal de los pollos (Siragusa *et al.*, 2008; Jurkovich *et al.*, 2011; Tillman *et al.*, 2011). Por lo explicado en párrafos anteriores, en nuestro experimento se pudo apreciar un efecto positivo aunque no significativo ($p > 0.05$) del producto sobre los parámetros productivos evaluados con respecto a los demás grupos tratados con otros promotores de crecimiento y desafiados con *Clostridium perfringens*.

La zinc bacitracina es un antibiótico polipeptídico cíclico (Capitán-Vallvey *et al.*, 2001) que actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana y es ampliamente usada en el alimento para pollos en todas las fases (inicio, crecimiento y acabado). Este antibiótico mejora la conversión

alimenticia y ganancia de peso, presumiblemente por la alteración de la composición y actividad de la microflora (Collier *et al.*, 2003; Knarreborg *et al.*, 2002).

No siempre es posible inducir experimentalmente una infección clínica por clostridios en pollos de engorde, con este fin existen varios modelos experimentales, sin embargo ninguno es universalmente aceptado debido a que la enteritis necrótica es de origen multifactorial, en su presentación entran en juego varios factores predisponentes, el más importante lo constituyen las infecciones por coccidias, pero también intervienen otros factores: nutricionales (alimento con altas cantidades de proteínas de origen animal, alimento con poca digestibilidad), estado inmunitario de las aves, factores de virulencia de las cepas de *Clostridium perfringens* usadas, preparación del inóculo de *Clostridium perfringens* para el desafío (tipo del medio de cultivo, tiempo de incubación, la cantidad de bacterias para el desafío) y los métodos de desafío (mezclar el inóculo con el alimento, o la administración oral del inóculo) (Shojadoost *et al.*, 2012).

Como se ha mencionado el principal factor predisponente para la Clostridiosis es una previa infección por coccidias, en especial las especies intestinales (Hermans y Morgan, 2007; Collier *et al.*, 2008). En el estudio, previo al desafío con *Clostridium perfringens*, se realizaron 2 desafíos con coccidias, uno al día 14 y el otro al día 22. El desafío fue realizado con una vacuna conteniendo oocistos esporulados no atenuados de cuatro especies de *Eimeria* (*Eimeria acervulina*, *Eimeria máxima*, *Eimeria necatrix* y *Eimeria tenella*); el primer desafío fue a doble dosis de la vacuna por ave, mientras que en el segundo desafío se realizó con cinco veces la dosis de vacuna por ave. Probablemente debido a la adición involuntaria de diclazuril en el alimento (0.2 kg/TM) de las aves del experimento hasta el día 21 de edad, no se tuvo el éxito esperado en la colonización de clostridios. El diclazuril es un anticoccidial altamente eficaz contra *Eimeria spp.* (Conway *et al.*, 2002; European Medicines Agency, 2013), se usa para el tratamiento y prevención de coccidiosis en pollos de engorde, gallinas de postura y pavos. Se caracteriza por su amplia distribución en los tejidos, por tener una vida media prolongada y por eliminarse por las heces, tanto en aves como en mamíferos (Božić *et al.*, 2012). El diclazuril es tan efectivo como anticoccidial que incluso las aves tratadas con él no llegan a desarrollar inmunidad contra las coccidias (Conway *et al.*, 2002), posee una vida media de eliminación

prolongada de 43-65 horas (Plumb, 2011), por lo que su administración en el alimento hasta el día 21 de edad, pudo haber mantenido un efecto anticoccidial hasta incluso el día 24 del experimento, 2 días después del segundo desafío con coccidias, evitando que estas colonicen el intestino y por lo tanto reduciendo uno de los principales factores predisponentes para la colonización de *Clostridium perfringens*.

El manejo es otro de los factores importantes a tomar en consideración en la presentación de enteritis necrótica. Factores tales como el uso de cama altamente fibrosa y húmeda, densidad alta en la crianza y cambios bruscos en los programas alimenticios pueden producir estrés intestinal y predisponer a la Clostridiosis (Opengart, 2008). En el experimento, las condiciones de crianza fueron en general buenas, con un área de 2.25 m² para los 23 pollos, lo que equivale a una baja densidad poblacional (10 pollos/m² en cada repetición). Además las aves del estudio tuvieron un manejo adecuado de temperatura y humedad ambiental y una cama seca de viruta de madera de acuerdo al manual de la Guía de Manejo del Pollo de Engorde para la línea Cobb-Vantress Inc. (Cobb-Vantress, 2008). Estas buenas prácticas en el manejo redujeron el estrés que pudieron haber tenido las aves, sobre todo en los momentos en los que se realizaron los desafíos, además, de permitirles un buen y adecuado desarrollo del sistema inmune. Esto se reflejó principalmente en el grupo control positivo (G4), puesto que a pesar de haber sido desafiados al igual que los grupos tratados, se lograron parámetros más bajos, pero sin diferencias significativas con respecto a los parámetros productivos de los grupos tratados.

Se ha reportado que una dieta de trigo, cebada y centeno, los cuales son ricos en polisacáridos no amiláceos indigeribles solubles en agua, son un factor predisponente para la enteritis necrótica, debido a que aumentan la viscosidad de la ingesta (Annett *et al.*, 2002). Este aumento produce un aumento en el tiempo de tránsito del alimento en el intestino, además, los polisacáridos no amiláceos interactúan con las glicoproteínas de la superficie epitelial, aumentando la producción de mucinas. En desafíos experimentales con *Clostridium perfringens*, las aves alimentadas con cebada y trigo presentan mayor mortalidad con respecto a las aves alimentadas con maíz (Riddell y Kong, 1992). En nuestro estudio el principal ingrediente del alimento fue el maíz, el cual no posee los complejos

carbohidratos presentes en el trigo y la cebada, que son considerados un factor de riesgo para el desarrollo de enteritis necrótica. Este sería otro factor importante que no causó el stress intestinal necesarios para que los promotores utilizados muestren su eficiencia frente a la salud intestinal de las aves. Es probable que de haberse presentado estos factores las ventajas productivas obtenidas con la adición de los promotores naturales utilizados hubieran sido más evidentes.

VI.- CONCLUSIONES

- Los dos grupos tratados con lisozimas encapsuladas (G1) y el fitobiótico *Humulus lupulus* (G2) lograron los mejores parámetros productivos, sin embargo sin diferencias significativas ($p>0.05$) y esto fue debido a que la crianza de pollos de engorde en óptimas condiciones de manejo y bioseguridad, no permitió causar el stress intestinal necesario para que estos dos productos naturales utilizados muestren su máxima eficiencia como promotores de crecimiento.
- Los resultados del estudio permiten concluir que la suplementación de las aves con productos alternativos a Zinc bacitracina tales como las lisozimas encapsuladas (G1) y fitobióticos *Humulus lupulus* (G2) mejoran el rendimiento productivo de los pollos de engorde bajo condiciones de reto de clostridios, convirtiéndose estos en una buena alternativa de reemplazo a los antibióticos promotores de crecimiento.

VII. BIBLIOGRAFIA CITADA

1. Aarestrup FM. 2000. Occurrence, selection and spread of resistance to antimicrobial agents used for growth promotion for food animals in Denmark. *APMIS Suppl* 101:1–48.
2. Abdulrahim SM. 1999. Effect of *Lactobacillus acidophilus* and zinc bacitracin as dietary additives for broiler chickens. *British Poultry Science* 40(1): 91-94.
3. Amit-Romach E, Sklan D, Uni Z. 2004. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. *Poultry Science* 86:1093-1098.
4. Annetta CB, Vistea JR, Chirino-Trejob M, Classenc HL, Middleton DM, Simkoa E. 2002. Necrotic enteritis: Effect of barley, wheat and corn diets on proliferation of *Clostridium perfringens* type A. *Avian Pathology* 31(6): 598-601.
5. Apajalahti J, Kettunen A, Graham H. 2004. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *World's Poultry Science Journal* 60:223-232.
6. Bar-Shira E, Sklan D, Friedman A. 2003. Establishment of immune competence in the avian GALT during the immediate post-hatch period. *Dev. Comp. Immunol* 27: 147–157.
7. Bedford MR, Partridge GG. 2010. *Enzymes in farm animal nutrition*. 2^a ed. Reino Unido: CABI. 331 p.
8. Berkhout N. 2010. Encapsulated lysozyme to replace antibiotics. *World Poultry*. [Internet], [09 noviembre 2013].

- Disponible en: <http://www.worldpoultry.net/Home/General/2010/2/Encapsulated-lysozyme-to-replace-antibiotics-WP007101W/>
9. Bermudez AJ, Stewart-Brown B. 2008. Principles of disease prevention: diagnosis and control. Estados Unidos: Iowa State University Press. 5-42 p.
 10. Bjerrum L, Engberg R, Leser T, Jensen B. 2006. Microbial Community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. Poultry Science 85: 1151–64.
 11. Branton SL, Lott BD, Deaton JW, Maslin WR, Austin FW, Pote LM, Keirs RW, Latour MA, Day EJ. 1997. The effect of added complex carbohydrates or added dietary fiber on necrotic enteritis lesions in broiler chickens. Poultry Science 76: 24–28.
 12. Božić Đ, Bilandžić N, Varenina I, Kolanović BS. 2012. Diclazuril - application, pharmacokinetics and toxicology. Veterinarska Stanica 43: 473–484.
 13. Bunting M, Lorant DE, Bryant AE, Zimmerman GA, McIntyre TM, Stevens DL, Prescott SM. 1997. Alpha toxin from *Clostridium perfringens* induces proinflammatory changes in endothelial cells. J. Clin. Invest 100: 565–574.
 14. Capitán-Vallvey LF, Navas N, Titos A, Checa R. 2001. Determination of the antibiotic zinc bacitracin in animal food by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. Chromatographia 54: 15–20.
 15. Chesson A. 2001. Non-starch polysaccharide degrading enzymes in poultry diets: influence of ingredients on the selection of activities. World's Poultry Science Journal 57: 251–263.
 16. Cobb-Vantres. 2008. Guía de manejo del pollo de engorde. Estados Unidos: Cobb-Vantress Inc 70 p.
 17. Collier CT, Klis JD, Deplancke B, Anderson DB, Gaskins HR. 2003. Effects of tylosin on bacterial mucolysis, *Clostridium perfringens* colonization, and intestinal barrier function in a chick model of necrotic enteritis. Antimicrob. Agents Chemother 47: 3311–3317.

18. Collier CT, Hofacre CL, Payne AM, Anderson DB, Kaiser P, Mackie RI, Gaskins HR. 2008. Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting *Clostridium perfringens* growth. *Vet. Immunol. Immunopathol* 122: 104–115.
19. Conway DP, Mathis GF, Lang M. 2002. The use of diclazuril in extended withdrawal anticoccidial programs: Efficacy against *Eimeria spp.* in broiler chickens in floor pens. *Poultry Science* 81: 349–352.
20. Cowieson AJ, Acamovic T, Bedford MR. 2006. Using the precision-feeding bioassay to determine the efficacy of exogenous enzymes—a new perspective. *Animal Feed Science and Technology* 129: 149–158.
21. Craven SE. 2000. Colonization of the intestinal tract by *Clostridium perfringens* and fecal shedding in diet-stressed and unstressed broiler chickens. *Poultry Science* 79: 843–849.
22. Craven SE, Stern NJ, Bailey JS, Cox NA. 2001. Incidence of *Clostridium perfringens* in broiler chickens and their environment during production and processing. *Avian Diseases* 45: 887–896.
23. Croom J, Edens F, Ferket P. 2000. The impact of nutrient digestion and absorption on poultry performances and health. En: *Proceedings 27th annual Carolina poultry nutrition conference and soybean meal symposium*. Carolina Del Norte.
24. Cross DE, McDevitt RM, Hillman K, Acamovic T. 2007. The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. *British Poultry Science* 48, 496-506.
25. Dahiya JP, Hoehler D, Wilkie DC, Van Kessel AG, Drew MD. 2005. Dietary glycine concentration affects intestinal *Clostridium perfringens* and lactobacilli populations in broiler chickens. *Poultry Science* 84: 1875–1885.
26. Dekich M. 1996. Overview of enteric diseases field problems in chickens. En: *American Association of Avian Pathologists ed. Enteric disease control: Symposium program* : American

- Association of Avian Pathologists, 39th Annual Meeting, Louisville, Ky, Julio 21, 1996. 1^a ed. Estados Unidos: Omni Press. 22-30 p.
27. Dibner J, Richards J. 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. *Poultry Science* 84:634–643.
28. Drew MD, Syed NA, Goldade BG, Laarveld B, Van Kessel AG. 2004. Effects of dietary protein source and level on intestinal populations of *Clostridium perfringens* in broiler chickens. *Poultry Science* 83: 414–420.
29. Engberg RM, Hedemann MS, Leser TD, Jensen BB. 2000. Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers. *Poultry Science* 79: 1311–1319.
30. Engstrom B, Fermer C, Lindberg A, Saarinen E, Gunnarsson A. 2003. Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. *Vet. Microbiology* 94: 225-235.
31. Ertas ON, Güler T, Çiftçi M, Dalkiliç B, Simsek ÜG. 2005. The effect of an essential oil mix derived from oregano, clove and anise on broiler performance. *International Journal of Poultry Science* 4, 879-884.
32. European Medicines Agency. 2013. European public MRL assessment report (EPMAR) Diclazuril extension to poultry. Reino Unido. 8 p.
33. [FAO] Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. 2004. Assessing quality and safety of animal feeds. Roma: FAO. 152 p.
34. Ferket P. 1996. Nutritional effects on enteric disorders. En: American Association of Avian Pathologists ed. Enteric disease control: Symposium program : American Association of Avian Pathologists, 39th Annual Meeting, Louisville, Ky, July 21, 1996. 1^a ed. Estados Unidos: Omni Press. 17-21 p.

35. Ferket P. 2000. Practical nutritional perspective on gut health and development. En: Proceedings 27th annual Carolina poultry nutrition conference and soybean meal symposium. Carolina Del Norte.
36. Friedman A, Bar-Shira, E. 2005. Effects of nutrition on development of immune competence in chicken's gut-associated lymphoid system. World's Poultry Science Association (WPSA): 247–255 p.
37. Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriology* 66: 365–378.
38. Gabriel I, Lessire M, Mallet S, Guillot JF. 2006. Microflora of the digestive tract: critical factors and consequences for poultry. *World's Poult. Sci. J* 62:499–511.
39. Gazdzinski P, Julian RJ. 1992. Necrotic enteritis in turkeys. *Avian Diseases* 36: 792-798.
40. Geyra A, Uni Z, Sklan D. 2001. Enterocyte dynamics and mucosal development in the posthatch chick. *Poultry Science* 80:776–782.
41. Gibson GR, Roberfroid MB. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr* 125: 1401–1412.
42. Gonzáles A, Icochea E, Reyna P, Guzmán J, Cazorla M, Lúcar J, Carcelén F, San Martín V. 2013. Efecto de la suplementación de ácidos orgánicos sobre los parámetros productivos en pollos de engorde. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú* 24: 32–37.
43. Hafez H. 1999. Poultry meat and food safety: pre- and post-harvest approaches to reduce food bornepathogens. *World Poult Sci J* 55: 269-280.
44. Hafez H. 2000. Enteric diseases in turkeys. En: VIII Scientific Conference: Alimentary tract diseases of birds - etiology, diagnostics and control. *Polonia* 66 (12):524-527.
45. Hafez H. 2005. Governmental regulations and concept behind eradication and control of some important poultry diseases. *World Poultry Science J* 61: 569-581.

46. Hafez H. 2011. Enteric diseases of poultry with special attention to *Clostridium perfringens*. Pak Vet J31 (3):175-184.
47. Hermans PG, Morgan KL. 2007. Prevalence and associated risk factors of necrotic enteritis on broiler farms in the United Kingdom; a cross-sectional survey. Avian Pathol 36: 43–51.
48. Hughes L, Hermans P, Morgan K. 2008. Risk factors for the use of prescription antibiotics on UK broiler farms. J.Antimicrob. Chemother 61: 947-952.
49. Jackson ME, Anderson DM, Hsiao HY, Mathis GF, Fodge DW. 2003. Beneficial effect of b-mannanase feed enzyme on performance of chicks challenged with *Eimeria sp.* and *Clostridium perfringens*. Avian Diseases 47: 759–763.
50. Jeurissen D, Janse E, Koch G, Boer G. 1989. Postnatal development of mucosa-associated lymphoid tissues in chickens. Cell Tissue Res 258: 119–124.
51. Jeurissen S, Lewis F, Van der Klis JD, Mroz Z, Rebel JM, TerHurne A. 2002. Parameters and techniques to determine intestinal health of poultry as constituted by immunity, integrity, and functionality. Curr.IssuesIntest. Microbiol 3:1–14.
52. Johansson A. 2006. *Clostridium perfringens* the causal agent of necrotic enteritis in poultry. Tesis Doctoral. Uppsala, Suecia: Universidad de Uppsala.44 p.
53. Jones FT, Ricke SC. 2003. Observations on the history of the development of antimicrobials and their use in poultry feeds. Poult. Sci 82:613–617.
54. Jurkovich V, Szénási K, Kovács P, Könyves L, Brydl E, Kutasi J, Bata Á. 2011. Prevention of necrotic enteritis of poultry with herbal preparations. Tribun EU: 463–465 p.
55. Kaldhusdal M, Hofshagen M. 1992. Barley inclusion and avoparcin supplementation in broiler diets. 2. Clinical, pathological, and bacteriological findings in a mild form of necrotic enteritis. Poultry Science 71: 1145–1153.

56. Kaldhusdal M, Skjerve E. 1996. Association between cereal contents in the diet and incidence of necrotic enteritis in broiler chickens in Norway. *Preventive Veterinary Medicine* 28: 1–16.
57. Kaldhusdal M, Schneitz C, Hofshagen M, Skjerve E. 2001. Reduced incidence of *Clostridium perfringens*-associated lesions and improved performance in broiler chickens treated with normal intestinal bacteria from adult fowl. *Avian Diseases* 45: 149.
58. Khattak FM, Pasha TN, Hayat Z, Mahmud A. 2010. Enzymes in poultry nutrition. *J. Anim. Poultry Science* 16(1-2): 2006.
59. Knarreborg A, Simon M A, Engberg RM, Jensen BB, Tannock GW. 2002. Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. *Appl. Environ. Microbiol* 68:5918–5924.
60. Kyungwoo L, Hyun S, Lillehoj, Gregory R. 2010. Direct fed microbials and their impact on the intestinal microflora and immune system of chickens. *J. Poultry Science* 47:106-114.
61. Li X, Qiang L, Xu C. 2008. Effects of supplementation of fructooligosaccharide and/or *Bacillus subtilis* to diets on performance and on intestinal microflora in broilers. *Archiv fur Tierzucht* 51, 1: 64-70.
62. Liu D, Guo Y, Wang Z, Yuan J. 2010. Exogenous lysozyme influences *Clostridium perfringens* colonization and intestinal barrier function in broiler chickens. *Avian Pathology* 39: 17–24.
63. Long JR, Barnum DA, Pettit JR. 1974. Necrotic Enteritis in Broiler Chickens II. Pathology and Proposed Pathogenesis. *Can J Comp Med* 38: 467–474.
64. Lovland A, Kaldhusdal M. 1999. Liver lesions seen at slaughter as an indicator of necrotic enteritis in broiler flocks. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 24: 345–351.
65. Lu J, Idris U, Harmon B, Hofacre C, Maurer JJ, Lee MD. 2003. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Appl Environ Microbiol* 69: 6816–6824.

66. Martel A, Devriese L, Cauwerts K, De Gussem K, Decostere A, Haesebrouck F. 2004. Susceptibility of *Clostridium perfringens* strains from broiler chicken to antibiotics and anticoccidials. *Avian Pathol* 33: 3-7.
67. Mast J, Goddeeris B. 1999. Development of immune competence of broiler chickens. *Vet. Immunol. Immunopathol* 70: 245–256.
68. McDevitt R, Brooker Jd, Acamovic T, Sparks N. 2006. Necrotic enteritis; a continuing challenge for the poultry industry. *World's Poultry Science Journal* 62: 221–247.
69. McDougald LR .2008. Protozoal Infections. En: Saif YM, eds. *Diseases of Poultry*. 12^a ed. Estados Unidos: Iowa State University Press. 974–991 p.
70. Mitsch P, Zitterl-Eglseer K, Kohler B, Gabler C, Losa R, Zimpernik I. 2004. The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens. *Poultry Science* 83: 669–675.
71. Niewold TA. 2007. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. *Poultry Science* 86:605–609.
72. Ocak N, Erener G, Burak AKF, Sungu M, Altop A, Ozmen A. 2008. Performance of broilers fed diets supplemented with dry peppermint (*Menthapiperita L.*) or thyme (*Thymus vulgaris L.*) leaves as growth promoter source. *Czech Journal of Animal Science* 53, 4:169-175.
73. Odetallah, NH, Wang JJ, GarlichJD, Shih JC. 2005. Versazyme supplementation of broiler diets improves market growth performance. *Poultry Science* 84: 858–864.
74. Opengart K. 2008. Clostridial Diseases. En: Saif YM, eds. *Diseases of Poultry*. 12a Ed. Estados Unidos: Iowa State University Press. 865-899 p.
75. Patterson JA, Burkholder KM. 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Science* 82: 627–631.
76. Pattinson M.2008. *Poultry Diseases*. 6^a ed. Reino Unido: Saunders Ltd. 206 p.

77. Perić L, Žikić D, Lukić M. 2009. Application of alternative growth promoters in broiler production. Institute for Animal Husbandry. Belgrade-Zemun. Biotechnology in Animal Husbandry 25 (5-6): 387-397.
78. Phillips DC. 1966. The three-dimensional structure of an enzyme molecule. Sci. Am 215: 78–90.
79. Plumb DC. 2011. Plumb's veterinary drug handbook: Desk. 7a. Ed. Estocolmo: Wiley. 1208 p.
80. Porter RE. 1998. Bacterial enteritides of poultry. Poultry Science 77: 1159–1165.
81. Riddell C, Kong XM. 1992. The influence of diet on necrotic enteritis in broiler chickens. Avian Diseases 36(3): 499.
82. Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau MC, Roberfroid M, Rowland I. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. British Journal of Nutrition 80:S147-S171.
83. Shiva, C, Bernal S, Sauvain M, Caldas J, Kalinowski J, Falcón N, Rojas R. 2012. Evaluación del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) y extracto deshidratado de jengibre (*Zingiber officinale*) como potenciales promotores de crecimiento en pollos de engorde. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú 23: 160–170.
84. Shojadoost B, Vince AR, Prescott JF. 2012. The successful experimental induction of necrotic enteritis in chickens by *Clostridium perfringens*: a critical review. Veterinary Research 43: 74.
85. Silversides FG, Bedford MR. 1999. Effect of pelleting temperature on the recovery and efficacy of a xylanase enzyme in wheat-based diets. Poultry science 78: 1184-1190.
86. Singer RS, Hofacre CL. 2006. Potential impacts of antibiotic use in poultry production. Avian Dis 50:161–172.
87. Siragusa GR, Haas GJ, Matthews PD, Smith RJ, Buhr RJ, Dale NM, Wise MG. 2008. Antimicrobial activity of lupulone against *Clostridium perfringens* in the chicken intestinal tract jejunum and caecum. J. Antimicrob. Chemother 61: 853–858.

88. Sklan D. 2001. Development of the digestive tract of poultry. 2001. *World's Poult. Sci. J* 57:415–427.
89. Songer JG, Miskimmins DW. 2005. Clostridial abomasitis in calves: Case report and review of the literature. *Anaerobe* 11: 290-294.
90. Songer JG. 2010. Enteric clostridia. En: Gyles ed. *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 4^a ed. Estados Unidos. Iowa: John Wiley & Sons 211-231 p.
91. Stone KJ, Strominger JL. 1971. Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C55-Isoprenyl pyrophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 3223–3227.
92. Surai P. 2002. Selenium in poultry nutrition 2. Reproduction, egg and meat quality and practical applications. *World's Poultry Science Journal* 58: 431–450.
93. Thompson F, Catto-Smith A, Moore D, Davidson G, Cummins A. 1998. Epithelial growth of the small intestine in human infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr* 26: 506–512.
94. Timbermont L, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F, 2011. Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. *Avian Pathol* 40: 341–347.
95. Tillman GE, Haas GJ, Wise MG, Oakley B, Smith MA, Siragusa GR. 2011. Chicken intestine microbiota following the administration of lupulone, a hop-based antimicrobial. *FEMS Microbiology Ecology* 77: 395–403.
96. Uni Z, Noy Y, Sklan D. 1999. Posthatch development of small intestinal function in the poult. *Poultry Science* 78:215–222.
97. Uni Z, Tako E, Gal-Garber O, Sklan D. 2003. Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo. *Poultry Science* 82:1747–1754.
98. Van der Sluis W. 2000. Clostridial enteritis is an often underestimated problem. *World Poult* 16:42–43.

99. Van Immerseel F, De Buck J, Pasmans F, Huyghebaert G, Haesebrouck F, Ducatelle R. 2004. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian Pathol* 33 (6): 537-549.
100. Van Immerseel F, Rood JI, Moore RJ, Titball RW. 2009. Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. *Trends Microbiol* 17: 32–36.
101. Wang Z R, Qiao SY, Lu WQ, Li DF. 2005. Effects of enzyme supplementation on performance, nutrient digestibility, gastrointestinal morphology, and volatile fatty acid profiles in the hindgut of broilers fed wheat-based diets. *Poultry Science* 84: 875–881.
102. Wilkie DC, Van Kessel AG, White L, Laarveld B, Drew MD. 2005. Dietary amino acids affect intestinal *Clostridium perfringens* populations in broiler chickens. *Can. J. Anim. Sci* 85:185–193.
103. Wilkinson JM, Hipwell M, Ryan T, Cavanagh HMA. 2003. Bioactivity of *Backhousiacitriodora*: antibacterial and antifungal activity. *J. Agric. Food Chem.* 51: 76–81.
104. Williams RB .2005. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: Rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. *Avian Pathol* 34:159–180.
105. Wray C, Davies RH. 2000. Competitive exclusion - An alternative to antibiotics. *Vet. J* 59: 107-108.
106. Yang Y, Iji P A, Choct M. 2009. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. *World's Poultry Science Journal* 65: 97-114.