

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA



**INFORME FINAL DEL TRABAJO DE INTEGRACION CURRICULAR,
MODALIDAD TESIS**

TEMA:

“INFLUENCIA DEL PROBIÓTICO ECOBIOL® (*Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940) SOBRE LA CARGA BACTERIANA Y RESPUESTA INMUNITARIA DE POLLOS COBB”

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCION DEL TÍTULO DE
INGENIERAS EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORAS:

TIFANNY MISHHELL HARO HERNÁNDEZ
EVELIN VANESSA OTAVALO OTAVALO

DIRECTORA:

Ing. ANDREA JAZMIN CHILQUINGA QUISPE MSc.

**Ibarra – Ecuador
2024**



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA**

**AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN
A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

La Universidad Técnica del Norte dentro del proyecto Repositorio Digital Institucional, determinó la necesidad de disponer de textos completos en formato digital con la finalidad de apoyar los procesos de investigación, docencia y extensión de la Universidad.

Por medio del presente documento dejo sentada mi voluntad de participar en este proyecto, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	1005353311		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Haro Hernández Tiffany Mishell		
DIRECCIÓN:	Ibarra, calle Las Lajas y San Luis		
EMAIL:	tmharo@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:	062632218	TELÉFONO MÓVIL:	0984958641
DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	1728210889		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Otavalo Otavalo Evelin Vanessa		
DIRECCIÓN:	Cayambe, calle Manuela Cañizares y Gabriela Mistral		
EMAIL:	evotavaloo@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:	-	TELÉFONO MÓVIL:	0999104939
DATOS DE LA OBRA			
TÍTULO:	INFLUENCIA DEL PROBIÓTICO ECOBIOL® (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CECT 5940) SOBRE LA CARGA BACTERIANA Y RESPUESTA INMUNITARIA DE POLLOS COBB		
AUTOR (ES):	Haro Tiffany, Otavalo Evelin		
FECHA: DD/MM/AAAA	23/07/2024		
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO			
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO		
TITULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniera en Biotecnología		
ASESOR /DIRECTOR:	MSc. Andrea Chilinguina / MSc. Pedro Barba		

AUTORIZACIÓN DE USO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD

Nosotras Tiffany Mishell Haro Hernández y Evelin Vanessa Otavalo Otavalo, con cédulas de ciudadanía Nro. 1005353311 y 1728210889 respectivamente, en calidad de autores y titulares de los derechos patrimoniales de la obra o trabajo de integración curricular descrito anteriormente, hacemos entrega del ejemplar respectivo en formato digital y autorizamos a la Universidad Técnica del Norte, la publicación de la obra en el repositorio digital institucional y uso del archivo digital en la biblioteca de la Universidad con fines académicos, para ampliar la disponibilidad del material y como apoyo a la educación, investigación y extensión; en concordancia con la Ley de Educación Superior Artículo 144.

Ibarra, a los 23 Días del mes de julio del 2024

LOS AUTORES:



Tiffany Mishell Haro Hernández
1005353311



Evelin Vanessa Otavalo Otavalo
1728210889

CONSTANCIAS

Los autores manifiestan que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autores terceros, por lo tanto, la obra es original y que son los titulares de los derechos patrimoniales, por lo que asumen la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrán en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 23 días del mes de julio del 2024

LOS AUTORES



Tiffany Mishell Haro Hernández
1005353311



Evelin Vanessa Otavalo Otavalo
1728210889

CERTIFICACIÓN DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

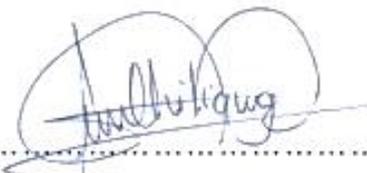
Ibarra, 23 de Julio del 2024

Ing. Andrea Chiliquinga MSc.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final del trabajo de Integración Curricular, el mismo que se ajusta a las normas vigentes de la Universidad Técnica del Norte; en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

(f) 

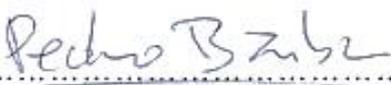
Ing. Andrea Chiliquinga MSc.

C.C.: 1720064193

APROBACIÓN DEL COMITÉ CALIFICADOR

El Comité Calificado del trabajo de Integración Curricular denominado “INFLUENCIA DEL PROBIÓTICO ECOBIOL® (*Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940) SOBRE LA CARGA BACTERIANA Y RESPUESTA INMUNITARIA DE POLLOS COBB” elaborado por Tiffany Mishell Haro Hernández y Evelin Vanessa Otavalo Otavalo, previo a la obtención del título de ingenierías en Biotecnología, aprueban el presente informe de investigación en nombre de la Universidad Técnica del Norte:

(f): 
.....
Ing. Andrea Chiliquinga MSc.
C.C.: 1720064195.....

(f): 
.....
Biol. Pedro Barba Msc.
C.C.: 1716751183.....

DEDICATORIA

Principalmente a Dios por ser mi guía, fuente de fortaleza en todo momento y por brindarme la sabiduría necesaria para tomar las mejores decisiones a lo largo de la vida. Por darme paciencia y perseverancia para superar los desafíos presentados. Agradecida por permitirme finalizar este viaje educativo con éxito y por iluminar mi camino en cada paso de este proceso.

A mis queridos padres Sergio Haro y Pilar Hernández quienes a través de su apoyo incondicional han sido un soporte fundamental en mi vida. Gracias por colocar en mí toda su fe y su confianza para culminar esta etapa de mi formación académica. Me enseñaron que con perseverancia, constancia, paciencia y humildad puedo conseguir todo lo que me propongo. Su sacrificio y dedicación constantes han sido una fuente de inspiración para mí, recordándome siempre la importancia de trabajar duro y mantenerme firme en mis convicciones.

A mis hermanos Lizbeth, Diego, Carla, Jimmy y Jonathan, por apoyarme y desafiarme a ser mejor cada día. Me ilustraron con sus valiosas enseñanzas de vida, las cuales han sido un faro en los momentos más difíciles, procuraron siempre mi bienestar y me evitaron aflicciones innecesarias. Entendieron cada una de mis emociones y supieron tranquilizarme en los momentos más difíciles de mi existencia.

A mi compañero de vida por creer en mis capacidades y por ser mi constante motivación para mejorar cada día. Tu apoyo incondicional en los momentos más complicados ha sido una muestra invaluable de paciencia, comprensión y un amor absoluto hacia mí. Tu presencia ha sido fundamental no solo como mi apoyo emocional, sino también como mi inspiración para perseguir y alcanzar mis metas.

A mis amigos Marcelo, Nanki, Juli, Jorge, Josef, Fer, Rosa, Anita, Erika y Maylin quienes han llegado a ser como una segunda familia para mí durante mi tiempo en la universidad, gracias a su apoyo, motivación y compañía hicieron que mi experiencia en las aulas fuera aún más agradable y placentera. Cada momento compartido, ha enriquecido mi vida y ha hecho de este viaje académico una aventura inolvidable. Su amistad ha sido un verdadero tesoro que valoro profundamente.

Tiffany Mishell Haro Hernández

DEDICATORIA

El presente trabajo va dedicado al amor infinito de mis padres Manuel Otavalo e Inés Otavalo quienes han sido mi ejemplo de esfuerzo, sacrificio, dedicación y amor eterno. Quiero expresarle mi más profundo agradecimiento, al apoyo incondicional de mi madre sus valores, enseñanzas y confianza en mí, han sido fundamentales para alcanzar cada logro.

A mi ángel, mi querido padre quién fue un hombre excepcional, que siempre me alentó a perseguir mis sueños y me enseñó la importancia de la perseverancia y el trabajo duro. Aún llevo en mis manos la virgencita que me regalaste y cuando tengo miedo la sujeto recordando todos los actos de bondad que a diario presencian mis ojos, y a los cuales les debo la inspiración para continuar. Sé que en algún lugar me miras orgulloso de mis logros, esta tesis es un tributo a tu memoria y a todo lo que me enseñaste, te extraño y siempre te llevo en mi corazón.

A mis hermanos Nataly, Rubí, Jhonatan y Héctor que incansablemente me han apoyado cada día, han sido los mejores compañeros de vida y me dieron la dicha de ser tía de 3 pequeños: Lían, Enid y Anthony quienes son mi contante recordatorio de lo bueno que hay en este mundo, son ustedes una parte invaluable de mi vida, y este éxito también les pertenece.

A mis amigos incondicionales Gali, Victoria, Ary, Sebastián, Bryan, Cindy, Stanlin, Andy, Liz y Valeria, ustedes han sido la respuesta y la solución a muchas de las preguntas que le he hecho a la vida, sin su apoyo durante todos estos años nada sería igual. A la presencia genuina de Aaron, Eli, David y Edna su amistad fue la luz que me guío en el camino hacia muchos cambios. Gracias por creer en mi incluso cuando yo dudaba, por ofrecerme su hombro para llorar y por celebrar mis éxitos con la misma alegría que yo.

A esas mujeres fuertes de mente y nobles de corazón que han sido mi inspiración tanto en lo humano como en lo profesional: María C., Andrea C., María Cristina E. y María Fernanda V. A cada una de ustedes les dedico estas palabras, pues han dejado una huella imborrable en mi corazón. Cada etapa de mi vida profesional ha estado marcada por su presencia única e invaluable. A ustedes les debo la valentía y el impulso para seguir adelante en este desafío.

Finalmente, mi más profunda gratitud a quienes me han acompañado en este camino, especialmente aquellos que no he mencionado, su presencia ha sido invaluable y su apoyo me ha permitido superar desafíos y alcanzar mis metas. Agradezco de corazón su colaboración para construir este trabajo.

Evelin Vanessa Otavalo Otavalo

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Técnica del Norte UTN, en especial a la Carrera de Ingeniería en Biotecnología por habernos acogido y apoyado durante nuestra formación académica, así como a nuestros docentes que compartieron sus conocimientos y consejos que servirán como apoyo en el ámbito profesional.

De manera especial, a nuestra tutora de Tesis la MSc Andrea Chiliquina, por confiar en nosotras desde el inicio de la investigación asignándonos este proyecto, guiándonos con su sabiduría y brindándonos su ayuda para resolver los inconvenientes que se presentaban en el camino.

Al director comercial monogástricos de Evonik en Ecuador el MSc Mario García, quien sin su apoyo y confianza la elaboración de este proyecto no se llevaría a cabo. Queremos brindar nuestra más sincera gratitud por darnos esta gran oportunidad para realizar el proyecto en conjunto con Agropecuaria.

A nuestro asesor, MSc Pedro Barba por brindarnos su conocimiento sobre el área de microbiología y sobre todo por darnos la confianza para llevar a cabo la investigación, al Msc Gabriel Chimbo y PhD Nubia Grijalva por su ayuda en la redacción del documento y sugerencias otorgadas durante la realización del trabajo de investigación.

A la técnico-docente la Ing. María Cevallos por ofrecernos su ayuda y sus conocimientos dentro de los Laboratorios de Biotecnología Aplicada y Vegetal, ya que con sus habilidades enseñadas nos ha brindado la seguridad para llevar a cabo cada uno de los objetivos establecidos.

Finalmente, a todas aquellas personas que estuvieron involucradas, de manera desinteresada, en ayudarnos para poder culminar con éxito esta etapa académica.

RESUMEN

Las enfermedades infecciosas en aves de producción causan pérdidas económicas a los avicultores. Aunque los antimicrobianos se utilizan para prevenir enfermedades, su uso excesivo ha llevado al desarrollo de microorganismos resistentes, representando un riesgo para animales y humanos. Por lo tanto, es necesario buscar alternativas sostenibles que reemplacen los antibióticos sin comprometer la nutrición y el rendimiento de las aves. Esta investigación evalúa la influencia del probiótico Ecobiol "*Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940" sobre la carga bacteriana y la respuesta inmunitaria en pollos COBB.

Se criaron 288 pollos de engorde COBB en la granja "La Pradera", asignándolos aleatoriamente en 4 tratamientos: CM y CH (Machos y Hembras alimentados con dieta control), EM y EH (Machos y Hembras alimentados con dieta basal más 0,5 kg/Tn de probiótico), con 3 repeticiones cada uno. Se realizó vacunación sistémica contra los virus que provocan la enfermedad de Newcastle (ND), Bronquitis infecciosa (IB) y enfermedad infecciosa de la Bursa (IBD). Se seleccionó al azar 1 ave de cada repetición que se sacrificaron el día 1, 21 y 42 de vida para la extracción de muestras de íleon, sangre y órganos linfáticos.

La suplementación con *B. amyloliquefaciens* en machos aumento el contenido de *Escherichia coli* en íleon a los 42 días de vida en comparación al resto de tratamientos ($p < 0.01$); mientras que *Clostridium perfringens* se mantuvo constante durante el día 1 ($p > 0.05$) y 21 ($p > 0.05$) de crianza. La inmunidad humoral se analizó a través del título de anticuerpos que no presentaron diferencias significativas durante los 3 puntos de muestreo para NDV ($p = 0.76$; $p = 0.36$; $p = 0.70$) e IBD ($p = 0.30$ $p = 0.74$; $p = 0.72$); mientras que, se observó una mejora ($p = 0.02$) en el día 21 del tratamiento CH respecto al resto.

El índice de bazo, bursa y timo no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, el índice de bursa mostró un atrofiamiento generalizado, respaldado por la producción de anticuerpos sugiriendo la presencia de una infección por IBD dentro de la nave de crianza. Este estudio concluye que el probiótico utilizado no afectó la carga bacteriana intestinal ni la respuesta inmunitaria de las aves. Aunque no se encontraron diferencias significativas, se recomienda reformular la dosis del probiótico y realizar estudios adicionales con diferentes niveles de inclusión para evaluar su potencial sobre la salud y el rendimiento de pollos de engorde.

Palabras clave: Pollos de engorde, probiótico, *Bacillus amyloliquefaciens*, inmunología, microbiología

ABSTRACT

Infectious diseases in poultry cause economic losses to poultry farmers. Although antimicrobials are used to prevent diseases, their excessive use has led to the development of resistant microorganisms, representing a risk for animals and humans. Therefore, it is necessary to look for sustainable alternatives to replace antibiotics without compromising poultry nutrition and performance. This research evaluates the influence of the Ecobiol probiotic “*Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940” on bacterial load and immune response in COBB chickens.

A total of 288 COBB broilers were raised at “La Pradera” farm, randomly assigned into 4 treatments: CM and CH (Males and Females fed control diet), EM and EH (Males and Females fed basal diet plus 0.5 kg/Tn of probiotic), with 3 replicates each. Systemic vaccination against viruses causing Newcastle disease (ND), Infectious Bronchitis (IB) and Infectious Bursal Disease (IBD) was performed. One bird was randomly selected from each repetition and sacrificed on day 1, 21 and 42 of life for the extraction of ileum, blood and lymphatic organ samples.

Supplementation with *B. amyloliquefaciens* in males increased *Escherichia coli* content in ileum at 42 days of life compared to the rest of treatments ($p < 0.01$); while *Clostridium perfringens* remained constant during day 1 ($p > 0.05$) and 21 ($p > 0.05$) of rearing. Humoral immunity was analyzed through the titer of antibodies that did not present significant differences during the 3 sampling points for NDV ($p = 0.76$; $p = 0.36$; $p = 0.70$) and IBD ($p = 0.30$; $p = 0.74$; $p = 0.72$); while an improvement ($p = 0.02$) was observed on day 21 of the CH treatment with respect to the rest.

The spleen, bursa and thymus index showed no significant differences between treatments. However, the bursa index showed a generalized atrophy, supported by the production of antibodies suggesting the presence of IBD infection inside the broiler house. This study concludes that the probiotic used did not affect the intestinal bacterial load or the immune response of the birds. Although no significant differences were found, it is recommended to reformulate the dose of the probiotic and conduct additional studies with different inclusion levels to evaluate its potential on broiler health and performance.

Keywords: Broilers, probiotic, *Bacillus amyloliquefaciens*, immunology, microbiology

LISTA DE SIGLAS

AGP. Antibióticos promotores de crecimiento

UFC. Unidades formadoras de colonia

APEC. *Escherichia coli* patógena aviar

NE. Enteritis necrótica

NDV. Virus de la enfermedad de Newcastle

IBV. Virus de la Bronquitis Infecciosa

IBD. Enfermedad infecciosa de la Bursa

FDA. Administración de Drogas y Alimentos

ELISA. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

IgA. Inmunoglobulina A

IgM. Inmunoglobulina M

IgY. Inmunoglobulina Y

IgD. Inmunoglobulina D

IgE. Inmunoglobulina E

BA. *Bacillus amyloliquefanciens*

TSI. Hierro Triple Azúcar

TSN. Triptona Sulfito Neomicina

CPT. Tubo para diagnóstico de *Clostridium perfringens*

SIM. Sulfuro indol movilidad

pNPP. Fosfato de p-nitrofenilo

ÍNDICE DE CONTENIDOS

IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA	II
AUTORIZACIÓN DE USO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD	III
CONSTANCIAS	IV
CERTIFICACIÓN DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR	V
APROBACIÓN DEL COMITÉ CALIFICADOR.....	VI
DEDICATORIA.....	VII
DEDICATORIA.....	VIII
AGRADECIMIENTOS.....	IX
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XI
LISTA DE SIGLAS	XII
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	XIII
<i>Índice de Tablas.....</i>	<i>XV</i>
<i>Índice de Figuras.....</i>	<i>XVI</i>
CAPÍTULO I.....	17
INTRODUCCIÓN	17
1.1. <i>Problema de investigación</i>	<i>17</i>
1.2. <i>Justificación.....</i>	<i>18</i>
1.3. <i>Objetivos.....</i>	<i>19</i>
1.3.1. <i>Objetivo General:.....</i>	<i>19</i>
1.4. <i>Pregunta directriz.....</i>	<i>19</i>
CAPÍTULO II	20

MARCO TEÓRICO	20
2. <i>Enfermedades infecciosas en pollos</i>	20
2.1 <i>Principales enfermedades que afectan a los pollos</i>	20
2.1.1 Bacterianas (Escherichia coli y Clostridium perfringens)	20
2.1.2 Víricas	21
2.2 <i>Problemáticas en Latinoamérica y en el Ecuador</i>	22
2.3 <i>Medidas preventivas de manejo de enfermedades en producción avícola</i>	22
2.3.1 Vacunas	22
2.3.2 Antibióticos promotores de crecimiento (AGP)	23
2.3.3 Inmunomoduladores.....	23
2.4 <i>Inmunidad aviar</i>	24
2.4.1 Generalidades del sistema inmune.....	24
2.4.2 Relación entre salud intestinal e inmunidad.....	24
2.4.3 Inmunoglobulinas.....	25
2.5 <i>Probióticos en la producción de pollos de engorde</i>	26
2.5.1. Importancia	26
2.5.2. Beneficios	26
2.5.3. Probióticos comerciales	26
2.6 <i>Bacillus amyloliquefaciens como aditivo alimentario</i>	28
CAPÍTULO III.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1 <i>Descripción del área de estudio</i>	29
3.2 <i>Manejo de aves en campo</i>	29
3.3 <i>Necropsia y recolección de íleon</i>	31
3.3.1 Recuento de Escherichia coli en íleon	32
3.3.2 Recuento de Clostridium sp en íleon	32
3.4 <i>Recolección sanguínea</i>	34
3.4.1 Ensayos ELISA	34
3.5 <i>Necropsia de órganos linfáticos primarios y secundarios</i>	35
3.5.1 Cálculo del índice morfométrico.....	35
3.6 <i>Análisis estadístico</i>	36
CAPÍTULO IV	38

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
4.1 Recuento de UFC de <i>E. coli</i> en íleon	38
4.2 Recuento de UFC de <i>Clostridium sp</i> en íleon	39
4.3 Título de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV).....	41
4.4 Título de anticuerpos contra el virus de la Bronquitis infecciosa (IBV).....	42
4.5 Título de anticuerpos contra la enfermedad infecciosa de la Bursa (IBD).	43
4.6 Índice morfométrico de órganos linfáticos.....	45
4.6.1 Índice de Bazo.....	45
4.6.2 Índice de Timo	46
4.6.3 Índice de Bursa.....	48
CAPITULO V.....	51
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	51
5.1 Conclusiones.....	51
5.2 Recomendaciones	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
ANEXOS.....	68

Índice de Tablas

Tabla 1. Relación entre los probióticos y la salud del ave.....	27
Tabla 2. Plan de vacunación de pollos engorde	29
Tabla 3. Parámetros del diseño de la investigación.	36
Tabla 4. Tratamientos realizados en la investigación.	37
Tabla 5. Efecto de Ecobiol en la población de <i>E. coli</i> , en el intestino de pollos de engorde. Las letras diferentes junto al valor de la media representan los rangos de significancia	38
Tabla 6. Efecto de Ecobiol en la población de <i>C. perfringens</i> , en el intestino de pollos de engorde.....	39

Índice de Figuras

Figura 1. Diseño experimental y actividades.....	30
Figura 2. Tracto gastrointestinal del pollo.....	31
Figura 3. Esquema de siembra de <i>Clostridium sp.</i>	33
Figura 4. Identificación de los órganos linfáticos primarios: (a) Bazo, (b) Bolsa de Fabricio y (c) Timo.	35
Figura 5. Título de anticuerpos obtenidos contra NDV de cada uno de los tratamientos en los días 1, 21 y 42 de vida del ave.....	42
Figura 6. Título de anticuerpos obtenidos contra IBV de cada uno de los tratamientos en los días 1, 21 y 42 de vida del ave.....	43
Figura 7. Título de anticuerpos obtenidos contra IBD de cada uno de los tratamientos en los días 1, 21 y 42 de vida del ave.....	45
Figura 8. Efecto de la dieta control y Ecobiol en el índice del bazo de pollos de engorde. ...	46
Figura 9. Efecto de la dieta control y Ecobiol en el índice del timo de pollos de engorde. ...	48
Figura 10. Efecto de la dieta control y Ecobiol en el índice de la bursa de pollos de engorde.....	49

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Problema de investigación

La industria avícola en el Ecuador enfrenta varias problemáticas que deben ser resueltas para mejorar las prácticas de producción, evitar brotes de enfermedades y disminuir los índices de mortalidad de las aves. Por lo que, para satisfacer al mercado se requiere implementar varias técnicas que mejoren la ingesta de alimento, la ganancia de peso y disminuyan la susceptibilidad a enfermedades en aves, asegurando la salud, la fisiología, la calidad y cantidad del producto para los consumidores (Ebeid *et al.*, 2021; Hedman *et al.*, 2020; Saadaoui *et al.*, 2021). Por otro lado, la crianza de aves a pequeña escala (crianza traspatio), se emplea para consumo propio y comercio local, produciendo pollos sin ninguna supervisión técnica. Dicha práctica es común en las regiones rurales y suburbanas del Ecuador, siendo Imbabura la cuarta provincia con mayor producción de pollos de engorde nivel nacional (INEC, 2023). Como consecuencia de la producción informal surgen brotes de enfermedades que afectan económicamente a todo el sector avícola, debido a la falta de acciones oportunas de prevención, alerta y erradicación que eviten su propagación (AGROCALIDAD, 2013).

En Ecuador, enfermedades como Gumboro, Newcastle, bronquitis infecciosa y disbiosis intestinales, generan un sin número de pérdidas económicas a los avicultores, aunado con los escasos programas de prevención y control de enfermedades por parte de AGROCALIDAD (AGROCALIDAD, 2013). En consecuencia, el sector avícola debe buscar alternativas para fortalecer el sistema inmune y aumentar el rendimiento del ave.

Por otra parte, el uso de probióticos se ha asociado con la protección a una amplia gama de infecciones, oponiéndose a la colonización de microorganismos patógenos, mejorando el microbioma del tracto gastrointestinal, favoreciendo la digestión, absorción y regulando el sistema inmunitario (Chapman *et al.*, 2011; El-Sharkawy *et al.*, 2020; Feng *et al.*, 2016; Grant *et al.*, 2018). En Ecuador, varios estudios respaldan el uso de probióticos como alternativa a los antibióticos en la dieta de aves de corral. Sin embargo, en Imbabura no existen estudios a nivel microbiológico, inmunológico y morfométrico que demuestren la influencia de *Bacillus amyloliquefaciens* y otros probióticos en la producción de pollos de engorde.

1.2. Justificación

El crecimiento demográfico ha estimulado un aumento en la demanda de alimentos a nivel global, siendo la carne del sector avícola casi el 40% de la producción mundial de la industria cárnica en 2020. Tan solo en Ecuador en el 2021 el consumo de carne de pollo fue de 27,72 kg/persona/año; esta proteína de origen animal es una alternativa para cubrir la creciente demanda, ya que tiene un alto valor nutritivo y valor económico bajo en comparación con otras carnes como las bovinas y porcinas (CONAVE, 2022; FAO, 2021; Mengesha, 2011).

Por otra parte, se establece que el uso de aditivos alimentarios con capacidad inmunomoduladora es una estrategia para contrarrestar los efectos adversos ocasionados por patógenos que producen pérdidas económicas a los avicultores (Hafez & Attia, 2020). El uso de probióticos constituye una alternativa confiable, segura y económicamente rentable, puesto que mejora los parámetros productivos, fisiológicos y nutricionales de los animales (Chávez *et al.*, 2016).

Los probióticos mejoran la digestión y absorción de nutrientes, esto hace que aumente la eficiencia de producción, proporcionando carne de alta calidad al consumidor (Ramlucken *et al.*, 2021). Además, ayuda a reducir el uso masivo de antibióticos como promotores de crecimiento (AGP) que en dosis subterapéuticas altera la función intestinal y el metabolismo de los animales (Jouybari *et al.*, 2009).

Ecobiol es un aditivo alimenticio constituido por una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 de rápido crecimiento utilizado en la nutrición animal para mejorar su salud. Entre los principales beneficios del probiótico alimenticio Ecobiol se encuentran, reducir la colonización de patógenos en las células intestinales, manteniendo el equilibrio en la microbiota; es fácil de manejar, ayuda a reducir los costos de producción, debido que se mantiene estable en altas temperaturas, alta humedad y en condiciones de almacenaje. Además, es compatible con otros aditivos comerciales (coccidiostatos, AGP y ácidos orgánicos), por lo cual se establece como un producto efectivo para garantizar el bienestar y rendimiento del animal (Evonik, 2018).

Por tal motivo, en esta investigación se determinará la influencia del probiótico Ecobiol en la microbiota intestinal mediante el recuento de Unidades Formadoras de Colonias de coliformes y *Clostridium* sp. Mientras que en el sistema inmunitario de pollos se definirán los efectos post-vacuna (Newcastle+Bronquitis y Gumboro) sobre el título de anticuerpos, además de la evaluación del índice morfométrico de órganos linfáticos. Esto se realizará con el fin de

determinar sí el uso de *Bacillus amyloliquefaciens* es una alternativa segura y efectiva que permita sustituir a los antibióticos en la alimentación de aves de corral.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General:

Evaluar la influencia del probiótico Ecobiol "*Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940" sobre la carga bacteriana y respuesta inmunitaria de pollos COBB.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Determinar el efecto del probiótico Ecobiol en el recuento de UFC de coliformes y *Clostridium* sp.
- Determinar los efectos del probiótico Ecobiol sobre el título de anticuerpos post-vacuna (Newcastle + Bronquitis y Gumboro).
- Analizar los efectos del probiótico Ecobiol sobre los parámetros alométricos de órganos linfoides (bursa, bazo y timo).

1.4. Pregunta directriz

¿Puede el probiótico Ecobiol modificar el sistema inmunitario, morfología de los órganos linfáticos y el microbioma del tracto gastrointestinal de los pollos Cobb?

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2. Enfermedades infecciosas en pollos

2.1 Principales enfermedades que afectan a los pollos

La demanda de alimentos por el crecimiento de la población mundial ha intensificado la cría de aves de corral. Un aspecto negativo del aumento de la producción es el incremento de la prevalencia de enfermedades. El sector avícola enfrenta una presión constante para producir proteínas de alta calidad, teniendo que superar las enfermedades de las aves. Los tipos de enfermedades, tanto virales como bacterianas, incluso pueden afectar al ser humano (Jones et al., 2018).

2.1.1 Bacterianas (*Escherichia coli* y *Clostridium perfringens*)

La salud de las parvadas es un eje clave durante la producción de pollos de engorde dado que las enfermedades causadas por bacterias patógenas ocasionan miles de millones de dólares en pérdidas debido a los bajos rendimientos y la mortalidad de las aves. Entre las principales especies comunes del microbiota de pollos causan enfermedades se encuentran *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens* (Oakley et al., 2014).

E. coli es un habitante normal del microbiota gastrointestinal de los pollos de engorde y se encuentra fácilmente en el entorno avícola. No obstante, durante todo el ciclo de vida de los pollos sanos su abundancia es baja. La mayoría de *E. coli* no es patógena para el ave; sin embargo, entre el 10 % y el 15 % de cepas aisladas en el tracto gastrointestinal puede ser patógena aviar (APEC) ocasionando enfermedades como la colibacilosis (Clavijo y Flórez, 2018).

La colibacilosis es una enfermedad sistémica que se caracteriza por la presencia de lesiones, perihepatitis, pericarditis y aerosaculitis que posteriormente provocan septicemia y muerte prematura de las aves. El APEC y las cepas patógenas extraintestinales en humanos comparten similitudes en genotipo, genes de virulencia y patrones de resistencia a los antibióticos, mismos que sugieren su potencial zoonótico. La salud pública se ve afectada puesto que genera pérdidas económicas significativas debido a la transmisión de residuos y la resistencia a antibióticos que causan de enfermedades en humanos (Fancher et al., 2020; Diarra et al., 2007)

Por otro lado, *C. perfringens* es un microorganismo de la flora normal en el tracto gastrointestinal de los pollos de engorde y el principal agente causante de la enteritis necrótica (NE); una enfermedad que daña la capa epitelial intestinal costándole a la industria avícola entre \$ 2 y 6 mil millones de dólares anuales en todo el mundo. La NE es una infección que se caracteriza por enteritis hemorrágica, alta morbilidad y mortalidad que varía de 2 a 50%. Dentro de los pollos de engorde la NE causan una disminución del 40% en la ingesta diaria promedio de alimento y una conversión alimenticia deficiente del 16 % (Fancher et al., 2020; Fancher et al., 2021).

2.1.2 Víricas

Las principales enfermedades virales de importancia económica para las granjas avícolas son Newcastle, Bronquitis infecciosa y Enfermedad de Gumboro, mismas que afectan a la respiración y la inmunidad de las aves de corral, provocando una alta mortalidad anual (Haji-Abdolvahab 2019).

Newcastle (NDV) está considerada como una enfermedad mortal para las aves de corral cuyo agente causal es el Paramixovirus aviar tipo 1, se caracteriza por la presencia de signos neurológicos y respiratorios severos que disminuyen la calidad y producción de la carne (Zhao et al., 2014; Luo et al., 2013) En la actualidad no existe un tratamiento eficaz frente a la NDV; no obstante, el uso de vacunas profilácticas y las buenas prácticas de bioseguridad en los centros de crianza de pollos de engorde pueden reducir la probabilidad de brotes. A pesar de que muchos países mantienen una estricta política de vacunación para prevenir esta enfermedad, los brotes pueden ocurrir de forma repentina (Dortmans, Peeters y Koch, 2012).

La bronquitis infecciosa es una enfermedad altamente contagiosa del tracto respiratorio superior y el tracto reproductivo de los pollos. El agente etiológico es un coronavirus gamma conocido como el virus de la Bronquitis Infecciosa (IBV), extremadamente difícil de identificar y controlar en los pollos debido a que continuamente surgen nuevas variantes del virus debido a mutaciones y eventos de recombinación en el genoma viral. La morbilidad suele ser del 100 % y la mortalidad puede llegar al 50 % si patógenos oportunistas como *E. coli* complican la enfermedad (Jackwood, 2012; Cavanagh & Gelb, 2008)

La enfermedad infecciosa de la Bursa (IBD) o también conocida como enfermedad de Gumboro es ocasionada por un Birnavirus, que genera una enfermedad aguda y altamente

contagiosa en pollos jóvenes. Entre los principales padecimientos se encuentran diversos cambios morfológicos e histológicos observados en la bolsa de Fabricio, un importante órgano linfático que al atrofiarse ocasionan una respuesta inmune deficiente a la vacunación contra otros patógenos (Müller et al., 2012; Berg, 2000).

2.2 Problemáticas en Latinoamérica y en el Ecuador

En la mayoría de los países de América latina las enfermedades infecciosas en pollos de engorde no se monitorean ni informan de manera rutinaria. Como consecuencia de esta mala práctica, la información sobre la prevalencia de las enfermedades de los pollos de engorde, causadas principalmente por patógenos bacterianos como *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus spp.* a pesar de su alta prevalencia no se registran datos (Agunos, 2012; Bergeron et al., 2012).

El panorama ecuatoriano no es muy distinto a lo mencionado con anterioridad, puesto que por parte de AGROCALIDAD no existen registros de la prevalencia tanto de enfermedades víricas como bacterianas, ni programas que prevengan la entrada y transmisión de agentes patógenos. De este modo, el control de la bioseguridad queda a manos de los productores y no de la entidad reguladora, esto se debe principalmente al escaso personal en el área de avicultura en AGROCALIDAD que provoca ineficiencia en los procesos de vigilancia, control y análisis del estatus sanitario avícola nacional. En Ecuador se registra la presencia de las enfermedades de Newcastle, Bronquitis infecciosa, Gumboro y *Salmonella* que son de importancia económica en la industria avícola; sin embargo, no se registran estadísticas de prevalencia y no se cuenta con un programa oficial de prevención y control de estas enfermedades (AGROCALIDAD, 2013).

2.3 Medidas preventivas de manejo de enfermedades en producción avícola

2.3.1 Vacunas

La principal practica para la prevención de enfermedades en el sector avícola son los planes de vacunación, que tienen el objetivo de reducir el riesgo de ocurrencia de epidemias, mediante la aplicación de medidas de bioseguridad. Cabe recalcar que las vacunas son estimulantes del sistema inmune para reaccionar ante agente infecciosos, es decir, por si solas no protegen de las enfermedades. Como medida profiláctica, se requiere del conocimiento de los diferentes tipos de vacunas para obtener su máximo aprovechamiento (Thompson et al., 2016).

Existen vacunas de virus vivo o activos, que contienen organismos vivos modificados o atenuados con capacidad de producir la enfermedad sin complicaciones. Las vacunas vectorizadas contienen varios genes de diferentes patógenos dentro de un portador, que puede ser un virus, bacterias o fragmento proteico. Finalmente, las vacunas muertas contienen partículas virales inactivas capaces de estimular la producción de anticuerpos (Fawzy et al., 2020; AGROCALIDAD 2020).

2.3.2 Antibióticos promotores de crecimiento (AGP)

La adición de antibióticos en bajas dosis a la dieta de aves de corral es una práctica común en la producción avícola, para ayudar a los animales a modular la microflora intestinal, disminuyendo la abundancia de bacterias patógenas. Sin embargo, el deliberado uso de los antimicrobianos ha generado graves problemas medioambientales como la diseminación y selección de la resistencia a los antimicrobianos. Desde hace una década, la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos publicó un documento que aconseja a la industria de la producción de animales para alimentación el uso de antibióticos con criterio, incentivando al desuso de los AGP como estrategia para combatir la resistencia a los antimicrobianos (Fancher et al., 2020).

2.3.3 Inmunomoduladores

La producción avícola requiere de procesos sostenibles que desarrollen alternativas para disminuir las diseminaciones de la resistencia a los antimicrobianos. De este modo, la implementación de extractos de plantas, ácidos orgánicos, aceites esenciales, prebióticos y probióticos se han propuesto como una opción capaz de estimular el sistema inmune, contrarrestar el aumento de patógenos y mantener la microbiota benéfica para la salud en las aves. (Lu et al., 2021)

El principal objetivo de los inmunomoduladores en la dieta avícola es elevar las barreras del sistema inmunitario tanto innatas como adaptativas y preservar la integridad intestinal. Por ello se ha motivado a los investigadores a examinar la producción de alimentos inmunomoduladores para mejorar el microbiota intestinal (Liu et al., 2018).

2.4 Inmunidad aviar

2.4.1 Generalidades del sistema inmune

El sistema inmunológico de las aves se encuentra constituido por una serie de elementos de defensa (órganos, células y sustancias químicas) altamente organizados para proteger el organismo de agentes extraños que pueden llegar a interrumpir sus funciones normales (Ramos, 2015).

El sistema inmune aviar tiene dos mecanismos de defensa: la innata y la adaptativa. La inmunidad innata incluye las barreras anatómicas (piel, mucosas y cilios traqueales), fisiológicas (fiebre, enzimas, fluidos corporales y pH), sistema de complemento y células de respuesta inflamatoria. Mientras que, la inmunidad adaptativa incluye la respuesta celular y humoral dependiente de los órganos linfoides (Paredes, 2006; Ramos, 2015).

El sistema inmune adaptativo está compuesto por los órganos linfoides primarios y secundarios. En los primarios se da lugar a la maduración linfocitaria en la bolsa de Fabricio, timo y médula ósea. Por otro lado, los secundarios son los responsables de la captación y el procesamiento del antígeno como el bazo, placas de Peyer, divertículo de Meckel y las tonsilas cecales (Astudillo, 2013).

La función principal del sistema linfoide es concentrar a los antígenos y transportar linfocitos originados en la médula ósea a los órganos linfoides primarios vía sanguínea, para proceder con la maduración de linfocitos B y T en la bolsa de Fabricio y timo respectivamente. Donde, los linfocitos maduros migran a los órganos secundarios como por ejemplo el bazo para ejercer su función efectora contra los agentes extraños (Cortés et al., 2013).

2.4.2 Relación entre salud intestinal e inmunidad

La microbiota intestinal juega un papel crucial en la protección, regulación y estimulación de las reacciones del huésped a diversas infecciones causadas por virus, bacterias, hongos y parásitos. Además, promueve los efectos beneficiosos en el desarrollo de la morfología intestinal y la inmunología. También, descompone los compuestos tóxicos facilitando la digestión del alimento y la absorción de nutrientes que por lo general son indigeribles por el huésped (Waite & Taylor, 2014).

El microbioma intestinal influye en la maduración y el funcionamiento del epitelio intestinal promoviendo la proliferación y diferenciación celular, desencadenando secreciones

enzimáticas y hormonales (Józefiak, 2008). Asimismo, estimula las respuestas inmunológicas activando los niveles básicos de inflamación e influye en el desarrollo de los sistemas inmunitarios celulares y humorales durante los primeros años de vida (Waite & Taylor, 2014).

Las especies bacterianas que dominan a nivel de filo en la microbiota intestinal del pollo son Firmicutes (*Lactobacillus*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Turicibacter*), Bacteroidetes (*Flavibacterium*, *Fusobacterium*), Proteobacteria (*Enterobacter*) y Actinobacteria (*Bifidobacterium*). Donde, Firmicutes y Proteobacterias representan el 76% y 14% del microbioma, respectivamente. En cambio, Bacteroidetes y Actinobacterias juntas representan el 6,5% de la microbiota (Kumari & Sejian, 2021; Waite & Taylor, 2014).

2.4.3 Inmunoglobulinas

Las aves tienen un buen sistema inmune tanto humoral como celular, se han encontrado grandes proporciones de anticuerpos en el plasma sanguíneo, así como en la yema de huevo; este proceso se da a través del epitelio folicular del ovario durante la oogénesis, similar a lo que ocurre en la transferencia de anticuerpos mediante la placenta de los mamíferos (Murcia, 2009).

Tres clases principales de inmunoglobulinas (IgA, IgM e IgY) se encuentran en las aves, la presencia de IgD e IgE han sido descritas, pero aún no se han logrado demostrar (Murcia, 2009). La cantidad de IgA e IgM transferido a la descendencia es menor al 1% de la concentración obtenida de estas inmunoglobulinas en el plasma de la gallina, mientras que la cantidad transferida de IgY es del 27 al 30% (Balaguer, 2008).

La IgY equivalente a las IgG de los mamíferos aparece conforme avanza la respuesta inmune, se encuentra principalmente en la yema y suero de las aves, además, es la inmunoglobulina determinada para las pruebas serológicas como el ELISA (León et al., 2012). Por otro lado, la IgM se forma durante la respuesta inmune primaria del ave y se encuentra en el líquido amniótico del huevo brindando protección a los pollitos de un día de edad. Finalmente, la IgA es responsable de la protección de las mucosas y se encuentra principalmente en las secreciones del tracto respiratorio y gastrointestinal (Paredes, 2006). El nivel de anticuerpos maternos transferidos a la progenie disminuye después de las tres semanas de edad, debido que las células B de pollos jóvenes comienzan a producir sus propios anticuerpos (Wickramasuriya et al., 2022).

2.5 Probióticos en la producción de pollos de engorde

2.5.1. Importancia

Los probióticos son aditivos alimenticios utilizados como alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento (AGP), ya que juegan un papel importante alterando la microbiota intestinal del huésped a través de la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos, la competencia por los nutrientes provoca la liberación de sustancias antimicrobianas, reducción de pH ocasionada por el ácido láctico, interferencia con la transcripción de genes patógenos involucrados en la colonización y modulación del sistema inmunitario mediante el aumento de la producción de citocinas (Brisbin et al., 2008; Krysiak et al., 2021).

2.5.2. Beneficios

Los probióticos tienen un efecto positivo en el tracto intestinal de las aves y en el sistema inmune siendo considerados como uno de los métodos más efectivos para el control microbiano, ya que no son tan perjudiciales para el medio ambiente y no dejan residuos en los productos animales como los antibióticos. El uso de probióticos permite aumentar la calidad de la carne y la productividad de los animales que consumen, debido que proporciona productos saludables y seguros para la sociedad (Birmani et al., 2019; Hussein et al., 2020).

Los probióticos afecta las propiedades físicas y químicas de la carne, es decir, que presentan un efecto positivo en el peso total de canal, con una reducción de la grasa abdominal, debido que existe una mayor absorción de nutrientes entre ellos aminoácidos útiles para la construcción de tejidos lo que resulta en una mejor calidad de canal en aves de corral, representando un aspecto económico importante para la industria avícola (Aziz et al., 2020; Birmani et al., 2019).

2.5.3. Probióticos comerciales

Se ha descrito el uso de un gran número de probióticos disponibles en la industria avícola, que son comercializados para fomentar el bienestar animal. Por lo cual, se recomienda exponer a las aves tempranamente a los probióticos para comenzar el proceso de colonización. Los microorganismos más utilizados como probióticos son *Lactobacillus* sp, *Streptococcus faecium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* y *Saccharomyces cerevisiae* como se muestra en la tabla 1 (Iñiguez et al., 2021; Khan et al., 2011).

Tabla 1

Relación entre los probióticos y la salud del ave.

Cepa del microorganismo	Actividad biológica	Referencia
<i>L. reuteri</i> , <i>L. gallinarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. salivaris</i>	El recuento de <i>E. coli</i> en el ciego disminuye a medida que aumenta la población de bacterias <i>Lactobacillus</i> y <i>Bifidobacterium</i> .	Mookiah et al., 2013
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Aumenta la altura de las vellosidades intestinales y la profundidad de la cripta en el yeyuno e íleon de aves	Khan et al., 2011
<i>Enterococcus faecium</i>	Mejora los parámetros productivos de los pollos de engorde, disminuyendo las poblaciones intestinales de <i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Enterococcus faecalis</i>	Chávez et al., 2016
<i>Bacillus subtilis</i>	Disminuye la presencia de <i>E. coli</i> , Salmonelas y coccidias. Mientras, favorece la inmunidad humoral incrementando IgE e IgA.	Medina et al., 2017

En el mercado se comercializan probióticos mixtos y simples a base de bacterias que son utilizados para mejorar la microflora esencial del intestino en aves, por lo que se sugiere seguir las recomendaciones del fabricante para su aplicación. Un ejemplo de ello es Protexin constituido de una premezcla concentrada de siete cepas bacterianas y dos levaduras, aislados de una gama amplia de fuentes de alimentos de animales y plantas. Se ha determinado que son seguros, libre de residuos tóxicos, fortalece la inmunidad sistémica, promueve la exclusión competitiva contra entero bacterias patógenas, mejora el crecimiento y la calidad de la carne en aves de corral (Bahaddad et al., 2022; Hernandez et al., 2020; Iñiguez et al., 2021).

2.6 *Bacillus amyloliquefaciens* como aditivo alimentario

B. amyloliquefaciens (BA) ha sido utilizado como probiótico en la alimentación animal, ya que produce enzimas extracelulares como amilasas, celulasas, proteasas y metaloproteasas que favorecen la digestión de los nutrientes (Lee et al., 2008). Esto se corrobora con el estudio realizado por Lei. (2015) donde se establece que la suplementación a base de *B. amyloliquefaciens* mejora el rendimiento de los pollos de engorde, la utilización de los nutrientes, la morfología intestinal y la microflora fecal.

La cepa de *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 es utilizado como aditivo alimenticio para animales pecuarios, ya que contiene efectos positivos sobre la reducción de bacterias patógenas como *C. perfringens* y *E. coli* (De Oliveira et al., 2019). Conocido comercialmente bajo el nombre de Ecobiol, esta cepa de rápido crecimiento es capaz de tolerar las secreciones gástricas y biliares; gracias a que produce esporas dando una ventaja de sobrevivir en diferentes condiciones de procesamiento de piensos (De Paula y García., 2023). Además, mejora la tasa de conversión alimenticia e influye en las interacciones entre diferentes poblaciones bacterianas, ya que tiene una capacidad innata para producir ácido láctico que constituye un ácido orgánico y amilasas que ayudan en la digestión de almidón en la dieta, esto favorece la proliferación de bacterias ácido-lácticas en el tracto gastrointestinal permitiendo obtener resistencia a microorganismos enteropatógenos (Evonik, 2020; Gharib-Naseri et al., 2021).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Descripción del área de estudio

La cría de aves de corral se realizó en la Granja Experimental “La Pradera”, ubicada en la parroquia Chaltura, cantón San José de Chaltura, a una temperatura promedio de 12°C, con una altitud de 2350 msnm situado cerca de la localidad Natabuela. Simultáneamente, el procesamiento de muestras se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología Aplicada ubicado en el campus del “Antiguo hospital San Vicente de Paul” localizado en el centro de la ciudad de Ibarra.

3.2 Manejo de aves en campo

La presente investigación se basó en el diseño experimental desarrollado por parte de la carrera de Agropecuaria de la Universidad Técnica del Norte, que se encargó de monitorear el bienestar animal al incorporar un probiótico en la dieta de las aves para evaluar el rendimiento productivo de los animales. Se analizó el efecto de la suplementación utilizando un probiótico denominado Ecobiol frente a una dieta basal (control) en 288 pollos de engorde de la raza COBB, los cuales fueron distribuido en cuatro tratamientos: CM (Machos alimentados con dieta control), CH (Hembras alimentados con dieta control), EM (Machos alimentados con dieta basal + 0,5 g de Ecobiol/kg de alimento) y EH (Hembras alimentados con dieta basal + 0,5 g de Ecobiol/kg de alimento) con tres repeticiones cada uno. Todos los pollos recibieron vacunas activas contra la enfermedad de Newcastle, Bronquitis y Bursitis infecciosas, siguiendo el calendario de vacunación detallado en la Tabla 2.

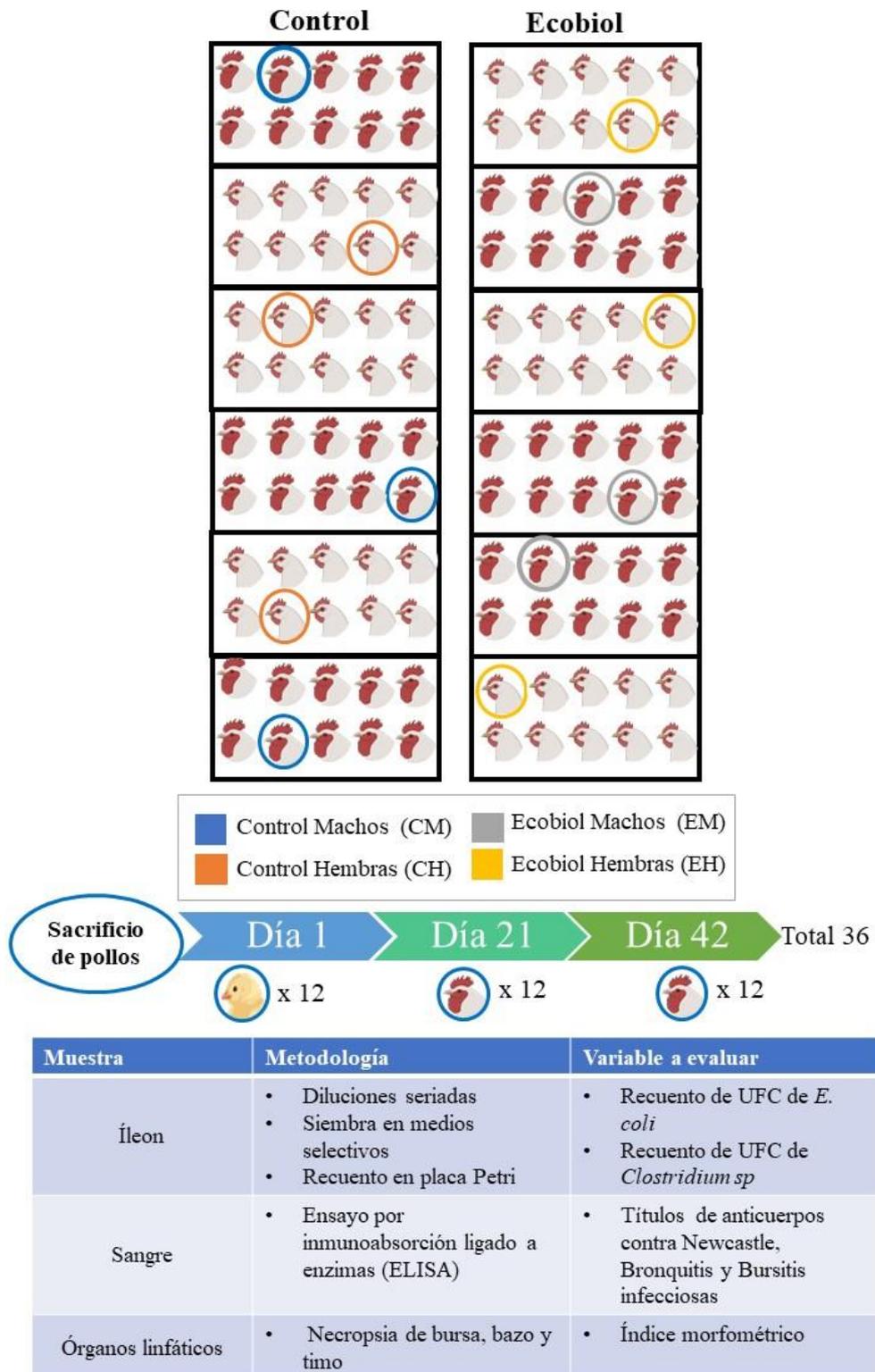
Tabla 2

Plan de vacunación de pollos engorde

Edad (días)	Vacuna	Enfermedad	Forma de la vacuna (Cepa)	Administración
9	NEWCASTLE- BRONQUITIS FARBIOVET	Enfermedad de Newcastle y Bronquitis infecciosa	Virus vivo modificado y atenuado	Agua de bebida Intraocular
1	GUMBORO	Enfermedad de bursitis	Virus vivo (Lukert	Agua de bebida
17	FARBIOVET	infecciosa	intermedia)	Intraocular

Figura 1

Diseño experimental y actividades.



Nota: Figura elaborada por los autores.

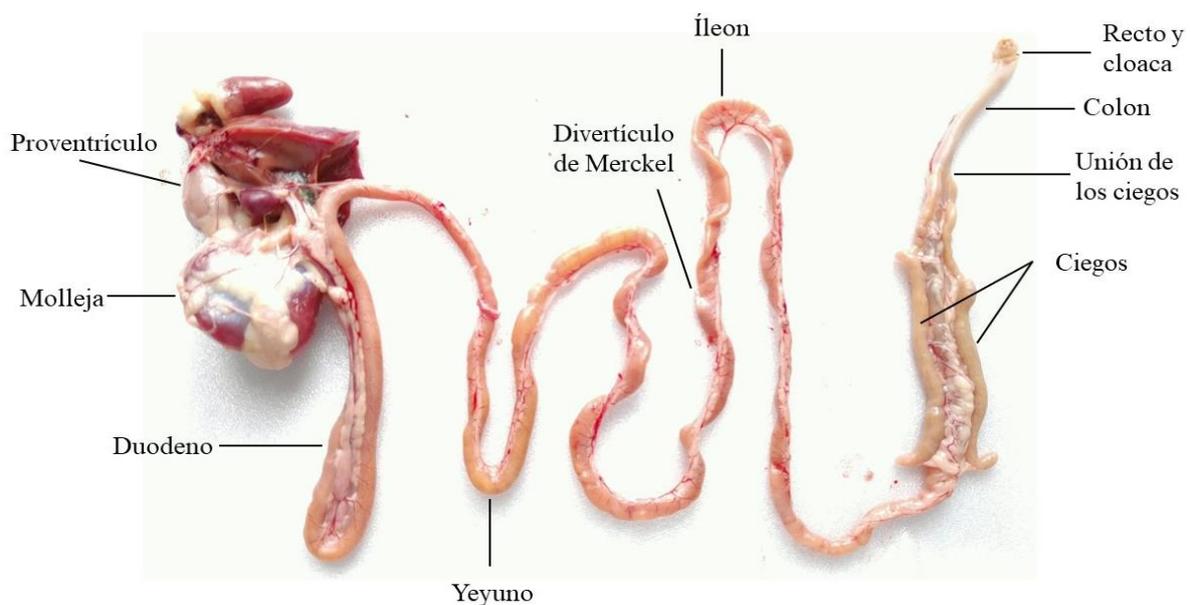
De acuerdo con el diseño descrito, se seleccionó un ave al azar de cada repetición (3 aves/tratamiento), en los días 1, 21 y 42 del experimento, obteniéndose un total de 36 pollos que fueron sacrificados en las fechas descritas. Previo al sacrificio se retiró el alimento y agua doce horas antes del sacrificio para evitar exceso de lípidos en las muestras sanguíneas, el sacrificio fue realizado por desangramiento, cortando las venas yugulares y carótidas (Khan et al., 2011). A partir de la necropsia, se recolectaron muestras de íleon, sangre y se extrajeron los órganos linfáticos de cada una de las aves, mismos que fueron utilizados en los ensayos de microbiología, inmunología y morfometría detallados en la Figura 1.

3.3 Necropsia y recolección de íleon

Luego de sacrificar al ave, se extrajo cuidadosamente el tracto intestinal para su posterior procesamiento. Para la obtención de la muestra se cortó en condiciones asépticas el íleon tomando como punto de partida 5 cm posteriores del divertículo de Merckel hasta el inicio de la unión con los ciegos (Figura 2). Los segmentos recolectados se almacenaron en frascos de plástico estériles para realizar el análisis en el laboratorio. Para la evaluación microbiológica, la muestra de íleon se maceró durante 1 min en una dilución de 1:10 (p/v) con agua peptona estéril. La mezcla se agitó manualmente para homogeneizarla antes de proceder con las siembras en los medios correspondientes (García et al., 2019).

Figura 2

Tracto gastrointestinal del pollo.



Nota: Figura elaborada por los autores.

3.3.1 Recuento de *Escherichia coli* en íleon

Después de homogeneizar la muestra con el agua peptona, se realizaron diluciones en serie de (10^{-1} hasta 10^{-4}), seguidamente se tomaron 100 μ l de cada dilución y se sembró por extensión en cajas Petri estériles que contenían el medio Chromocult, la siembra se realizó por duplicado. Posteriormente, las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Después de la incubación, se realizó un recuento de unidades formadoras de colonia de *E. coli* y se expresó como UFC por gramo de muestra intestinal (íleon). Las colonias identificadas como *E. coli* fueron identificadas por su tonalidad púrpura o azul violeta, por la presencia de dos enzimas (β -galactosidasa y β -glucuronidasa) que sintetizan Salmón-GAL y X-glucorónico respectivamente (Alonso y Poveda, 2008; Integratif et al., 2022).

3.3.1.1 Pruebas confirmatorias para *E. coli*

Para confirmar la presencia de colonias de *E. coli*, se usó el reactivo de Kovacs como prueba de indol. Para lo cual, se inoculó por punción vertical profunda en tubos con medio SIM, durante 24 h a 37°C. Posteriormente, se añadieron 4 o 5 gotas del reactivo de Kovacs, resbalando por la pared del tubo sin agitar, las colonias positivas para *E. coli* se tornaron de color rojo en la superficie del medio, en ausencia de coloración la prueba resulta negativa y se comprobó por incubación extendida durante 24 horas más y se repitió el proceso de la prueba. (NTE INEN 1529.8, 2016).

Adicional, se realizaron pruebas bioquímicas en medios agar Hierro Triple Azúcar (TSI) y Agar Citrato de Simmons. La prueba de TSI se realizó a partir de un cultivo puro del microorganismo que se inoculó por picando en el fondo del medio y extendiendo sobre la superficie. Mientras que para la prueba de citrato se inoculó por estriamiento en la superficie en el medio Agar Citrato de Simmons. Ambos tubos se incubaron en aerobiosis a 37°C durante 24 horas. Finalizado este tiempo, se verificó que la superficie y profundidad de los tubos con TSI sea alcalina con presencia de gas; en tanto que, se comprobó la ausencia de crecimiento en medio citrato sin cambio en la tonalidad del medio para corroborar que las cepas obtenidas durante la experimentación fueran *E. coli* (Aryal, 2022; NTE INEN 1529.18, 2013).

3.3.2 Recuento de *Clostridium sp* en íleon

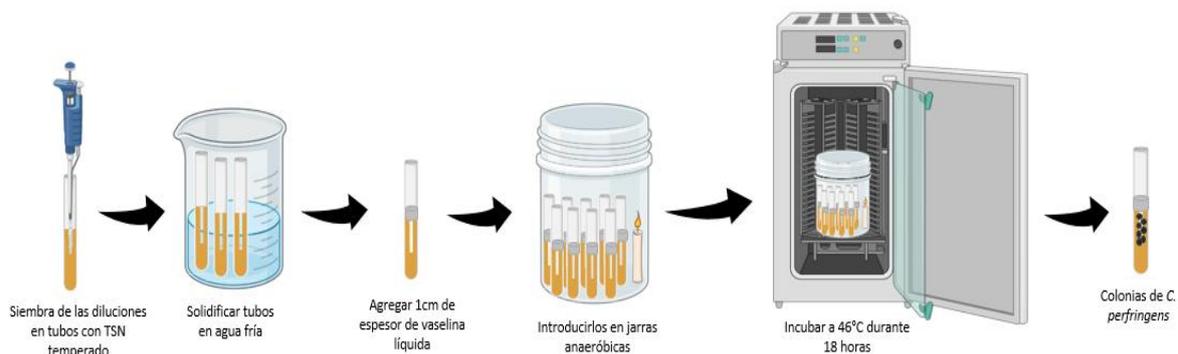
En tubos que contienen agar Triptona Sulfito Neomicina fundido (TSN) y temperado entre 44°C a 47°C, se sembraron 100 μ l de cada dilución previamente realizada de (10^{-1} hasta 10^{-3})

insertando la pipeta hasta el fondo para depositar la muestra. Luego, se retiró la pipeta con movimiento helicoidal ascendente y se homogenizó en vórtex durante 10 segundos. Este procedimiento se realizó por duplicado. Una vez finalizado, se colocaron los tubos en un baño de agua fría para acelerar la solidificación del agar. Posteriormente, se cubrió la siembra con una capa de vaselina líquida estéril de 1cm de espesor, para evitar la transferencia de oxígeno. Los tubos se incubaron en anaerobiosis a 46°C durante 18 horas como se observa en la figura 3.

Las colonias que mostraron un color negro en el medio indicaron la presencia de *C. perfringens*, a causa de la reducción del sulfito a sulfuro de hierro. Se registraron y calcularon las unidades formadoras de colonias por gramo de muestra intestinal (NTE INEN 1529.18, 2013). Las colonias típicas se seleccionaron al azar y luego se sometieron a pruebas bioquímicas confirmatorias detalladas a continuación.

Figura 3

Esquema de siembra de *Clostridium* sp.



Nota: Figura elaborada por los autores.

3.3.2.1 Pruebas confirmatorias para *Clostridium* sp

Las colonias se examinaron microscópicamente mediante tinción de Gram verificándose la presencia de bacilos grampositivos cortos, gordos e inmóviles. Adicional, en tubos para diagnóstico de *C. perfringens* (CPT) que contiene tres capas de los siguientes medios, medio agar TSN en el fondo, agar-agar intermedio y en la parte superior medio SIM, se sembraron colonias purificadas mediante una picadura profunda en el centro del tubo. Luego, las siembras se colocaron en jarras anaerobias e incubaron a 46°C durante 16 h para realizar las siguientes pruebas de verificación de las cepas (NTE INEN 1529.18, 2013).

Lectura de movilidad: Se considera como lectura de movilidad positiva la presencia de turbidez en el medio de cultivo, alrededor de la línea de siembra, en cambio un resultado es negativo cuando el crecimiento de la bacteria se da a largo de la línea de siembra (NTE INEN 1529.18, 2013).

Lectura de la prueba de indol: Después de la incubación se cubrió la superficie del medio con unas gotas del reactivo revelador de Kovacs, dónde el apareamiento de un color rojo indicó una reacción positiva, mientras que una reacción negativa no presenta cambios (NTE INEN 1529.18, 2013).

3.4 Recolección sanguínea

Después del sacrificio y durante el desangramiento de las aves, se recolectó 1 mL de sangre en tubos estériles. Posteriormente, las muestras sanguíneas se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min, el suero fue trasladado a viales asépticos y se almacenó a -20°C hasta el posterior análisis (Biasato et al., 2018; Kawasaki et al., 2020).

3.4.1 Ensayos ELISA

A partir del suero de pollos inmunizados se analizaron los títulos de anticuerpos post vacunación contra los agentes causales de las enfermedades de Newcastle, Bronquitis y Bursitis infecciosa mediante ensayo indirecto de inmunoabsorbancia ligado a enzimas (ELISA) utilizando kits comerciales (BioChek B.V., Holanda). Todos los ensayos se llevaron a cabo por duplicado de acuerdo con la descripción del fabricante (Alkhalf et al., 2010).

En la placa recubierta de antígeno se añadió en cada uno de los pocillos 100 µl de controles o muestras diluidas (1:500) dejándolo reposar durante 30 min, luego, los pocillos fueron lavados 4 veces con tampón de lavado. Se adicionaron 100 µl de IgG anti-pollo conjugada con enzima fosfatasa alcalina y se incubó durante 30 min. A continuación, se repitió el procedimiento de lavado para eliminar el excedente del conjugado. Después, se añadieron 100 µl de sustrato cromógeno pNPP (fosfato de p-nitrofenilo) durante 15 min. Finalmente, se adicionaron 100 µl de la solución de ácido sulfúrico a cada pozo de la placa para detener la reacción. Por último, el resultado fue evaluado por absorbancia utilizando un lector de microplacas (BIOBASE, BK-ELIOC, China) a 405 nm. Se calculó la relación S/P que corresponde a la relación entre la muestra sobre el control positivo representada mediante la fórmula (1), posteriormente se

determinaron los títulos de anticuerpos con la ecuación (2 y 3) (BioChek, 2012c, 2012a, 2012b).

$$S/P = \frac{\text{Promedio de muestra de prueba} - \text{Promedio de control negativo}}{\text{Promedio del control positivo} - \text{Promedio del control negativo}} \quad (1)$$

$$\text{Log}_{10} \text{del título} = 1.0 * \text{Log} (S/P) + 3.62 \quad (2)$$

$$\text{Antilog} = \text{Título} \quad (3)$$

3.5 Necropsia de órganos linfáticos primarios y secundarios

La disección del cadáver se consideró de acuerdo con el procedimiento establecido por Valladares (2014), se evisceró retirando los órganos internos para proceder con la identificación y extracción de los siguientes órganos linfáticos:

- Bazo, órgano localizado en la cavidad abdominal cerca de la molleja,
- Bolsa de Fabricio o Bursa que se encuentra situada en la cavidad pélvica sobre la porción dorsal de la cloaca
- El timo que se encuentra ubicado sobre el cuello del ave entre el esófago y la tráquea como se observa en la figura 4 (Sosnówka & Skomorucha, 2021).

Figura 4

Identificación de los órganos linfáticos (a) Bazo, (b) Bolsa de Fabricio y (c) Timo.



Nota: Figura obtenida de Sosnówka & Skomorucha, 2021

3.5.1 Cálculo del índice morfométrico

Después de la extracción se retiró el tejido adherido que envuelve a los órganos linfáticos, luego se pesaron los órganos por separado en una balanza analítica de precisión para determinar

el índice morfométrico, el cual se calcula a través de la relación del peso de los órganos y el peso corporal de cada ave mediante la fórmula 4 (Khan et al., 2011; Perozo et al, 2004).

$$IM = \frac{\text{Peso \acute{o}rgano (g)}}{\text{Peso corporal (kg)}} \quad (4)$$

3.6 Análisis estadístico

Se utilizó un ANOVA para realizar los análisis estadísticos de los resultados del título de anticuerpos contra Newcastle, Bronquitis y Bursitis Infecciosa, así como los índices de órganos linfáticos. Este análisis se ajustó a un diseño completo al azar (DCA) con submuestras. Para determinar las diferencias entre las medias de los tratamientos, se empleó la prueba de Tukey con un nivel de significancia $\alpha=0.05$. El cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad se evaluaron mediante la prueba de Shapiro Wilks y Levene, respectivamente. En los casos donde no se cumplió con la normalidad, se aplicaron transformaciones a los datos. Por otro lado, dado que el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) de *E. coli* y *C. perfringens* no cumplió con los supuestos requeridos, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. La descripción de las variables y los tratamientos utilizados para el desarrollo de la investigación se presentan en la tabla 3 y 4.

Tabla 3

Parámetros del diseño de la investigación.

Factor de análisis	Nivel	Repeticiones	Codificación
Ingesta de Ecobiol	Dosis 1	6	E
	Control -	6	C
Sexo del ave	Machos	6	M
	Hembras	6	H
Tiempo de muestreo	día 1	6	d1
	día 21	6	d21
	día 42	6	d42

Tabla 4*Tratamientos realizados en la investigación.*

N°	Descripción	Codificación
1	Ingesta de Ecobiol en machos en el día 1	EMd1
2	Ingesta de Ecobiol en hembras en el día 1	EHd1
3	Ingesta sin Ecobiol en machos en el día 1	CMd1
4	Ingesta sin Ecobiol en hembras en el día 1	CHd1
5	Ingesta de Ecobiol en machos en el día 21	EMd21
6	Ingesta de Ecobiol en hembras en el día 21	EHd21
7	Ingesta sin Ecobiol en machos en el día 21	CMd21
8	Ingesta sin Ecobiol en hembras en el día 21	CHd21
9	Ingesta de Ecobiol en machos en el día 42	EMd42
10	Ingesta de Ecobiol en hembras en el día 42	EHd42
11	Ingesta sin Ecobiol en machos en el día 42	CMd42
12	Ingesta sin Ecobiol en hembras en el día 42	CHd42

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Recuento de UFC de *E. coli* en íleon

En el recuento de *E. coli* mostró inicialmente una alta carga bacteriana en el primer día de vida, la cual fue disminuyendo con el transcurso del tiempo. Aunque, se notaron cambios en el recuento bacteriano, no se encontraron diferencias estadísticas que indicaran la influencia del probiótico utilizado. En el día 1 de vida, se presentaron diferencias significativas ($H= 8.01$; $p= 0.04$) entre los tratamientos, con tres rangos de significancia encabezados por EH con un recuento bacteriano de 187.1×10^4 UFC/g observados en la tabla 5.

En el día 21 no se establecen diferencias entre los tratamientos (Anexo 3), mientras que en el día 42 se obtuvo significancia estadística ($H= 9.57$; $p < 0.01$), donde los machos suplementados con Ecobiol contenían la población más alta de *E. coli* con un recuento de 13.7×10^4 UFC/g, en comparación con el resto de los tratamientos, representado en la tabla 5.

Tabla 5

Efecto de Ecobiol en el recuento de E. coli, presente en el intestino de pollos de engorde.

Probiótico	Sexo	<i>E. coli</i> (UFC g intestino ⁻¹)*				
		Día 1		Día 21		Día 42
Control	Hembra	266.9±113.8	AB	0.2±0.16	0.41±0.29	A
	Macho	3.8±2.4	A	0.16±0.16	0.03±0.03	A
Ecobiol	Hembra	187.1±76.8	B	0.0±0.0	0.08±0.05	A
	Macho	0.5±0.2	A	4.3±2.7	13.7±8.6	B

Nota: Cada dato representa el promedio de 3 aves por tratamiento \pm el error estándar. *: los datos presentados están escritos en notación científica 1×10^4 . Las letras diferentes junto al valor de la media representan los rangos de significancia.

La diferencia de *E. coli* encontrada en los polluelos de un día en la investigación, puede estar relacionada a la colonización de este coliforme en el intestino neonatal de crías recién eclosionadas, ya que presentan una prevalencia del 2.41% (Kemmett et al., 2013). Las distintas cargas de *E. coli* observadas pueden atribuirse a diversos factores como a la transmisión vertical, el ambiente avícola en el que se crían, las prácticas de manejo humano y el equipo de transporte utilizado (Petersen et al., 2006). Además, la carga bacteriana alta de CH y EH con

valores de 187.1 y 266.9 x10⁴ UFC/g, respectivamente; encontrados en los primeros días de vida, puede ser un reflejo de la exposición temprana a *E. coli* en la incubadora y durante los primeros cuidados post-eclosión. La disminución de la carga bacteriana en el día 21 y 42 podría estar asociada con el desarrollo del sistema inmunitario y la estabilización del microbioma intestinal durante el crecimiento del ave (Kemmett et al., 2013).

La ausencia de diferencias significativas en el recuento de *E. coli* encontradas en el día 21, sugiere que el efecto del probiótico utilizado no fue lo suficientemente consistente como para superar la variabilidad introducida por factores ambientales y de manejo. Esto destaca la importancia de considerar múltiples aspectos en futuros estudios para comprender el impacto de Ecobiol en el desempeño fisiológico de las aves (Fancher et al., 2020).

Por otra parte, la presencia de humedad en cama es capaz de aumentar los niveles de coliformes, influyendo en la actividad microbiana dentro de una nave de pollos de engorde, por lo que, se puede justificar los recuentos obtenidos en EM de 13.7 x10⁴ UFC/g en el día 42 que son superiores a los encontrados en el día 1 con valores de 0,5 x10⁴ UFC/g. Estos datos se reflejan como consecuencia de la instalación defectuosa de los bebederos nipples en los corrales de las aves suplementadas con Ecobiol (Gaucher et al., 2015).

Los resultados obtenidos presentan discrepancias, ya que algunos estudios han mencionado la eficacia de la suplementación de *B. amyloliquefaciens* en la dieta de pollos de engorde, donde se observó un aumento en la cantidad de *Lactobacillus* sp., lo que ocasionó una reducción de la cantidad de *E. coli* en íleon, mejorando así el rendimiento de los pollos de engorde durante todo el período de crecimiento (Lu et al., 2003; Tsukahara et al., 2017).

4.2 Recuento de UFC de *Clostridium* sp en íleon

En el recuento bacteriano de *Clostridium* sp sólo se obtuvieron datos en el día 1 y 21 para la evaluación estadística, mientras que en el día 42 de vida no se obtiene valores, debido a la escasa recuperación del microorganismo en las muestras recolectadas. Matemáticamente, en la tabla 6, se estableció que CH contiene la mayor cantidad bacteriana en comparación con los demás tratamientos tanto en el día 1 y 21 de evaluación con valores de 283 y 366 x10⁴ UFC/g, respectivamente. Además, presentó un crecimiento en la cantidad bacteriana de *Clostridium* sp.

Tabla 6

Efecto de Ecobiol en el recuento de *C. perfringens* en el intestino de pollos de engorde.

Probiótico	Sexo	<i>C. perfringens</i> (UFC g intestino ⁻¹) *	
		Día 1	Día 21
Control	Hembra	283±155	366±244
	Macho	83±47	183±122
Ecobiol	Hembra	66±49	66±49
	Macho	0	0

Nota: Cada dato representa el promedio de 3 aves por tratamiento ± el error estándar.

Los tratamientos evaluados no difirieron estadísticamente entre sí en los días 1 (H= 3.16; p=0.21) y 21 (H= 1,55; p= 0.44) (Anexo 8) como consecuencia de la alta variabilidad entre los datos obtenidos; demostrando que Ecobiol no impactó significativamente la carga microbiana de *Clostridium* sp. Mientras que el día 42 no presentó datos para carga microbiana, debido a esto no existe un análisis estadístico (Tabla 6).

La colonización de este patógeno anaeróbico en el tracto gastrointestinal de pollos de engorde inicia a temprana edad debido a la ubicuidad principalmente de *C. perfringens* en el agua, suelo y alimentos en las plantas de incubación de las aves de corral (Xu et al., 2021; Immerseel et al., 2004). Por otra parte, las especies pertenecientes al género *Bacillus* consumen gran cantidad de oxígeno para multiplicarse y sobrevivir en el intestino (Song et al., 2014). Consecuentemente, la temprana colonización, rápido crecimiento y producción de toxinas de *C. perfringens* puede ser uno de los factores que afecte el desempeño *in vivo* de *B. amyloliquefaciens* ocasionando una desventaja competitiva en el íleon y zonas anaeróbicas del intestino de los pollos de engorde (Geeraerts et al., 2016).

En contraste con lo expuesto anteriormente, Jerzsele et al. (2012) determinó que la cepa de *B. amyloliquefaciens* en conjunto con el butirato de sodio potencian la regeneración del epitelio que, a su vez, disminuye la cantidad de clostridios α -toxigénicos que pueden adherirse a la superficie del tejido y producir la toxina que causa la enteritis necrótica (De Oliveira et al., 2019). La cepa de *B. amyloliquefaciens* inhibe la acción de *C. perfringens* modulando el sistema quorum sensing, es decir, interrumpe la comunicación entre bacterias patógenas a través de la producción de metabolitos secundarios como el ácido láctico, surfactinas y bactericinas con actividad bactericida para inhibir la inflamación del intestino (Gharib-Naseri et al., 2021).

4.3 Título de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV)

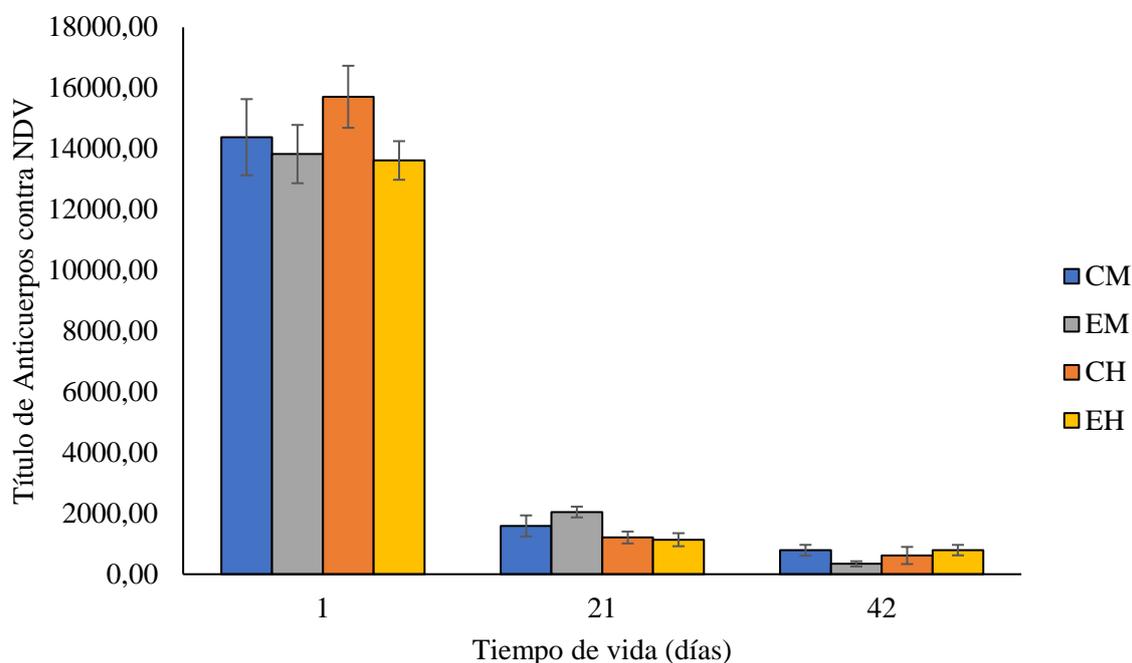
Los títulos de anticuerpos anti-NDV detectados a través de la técnica indirecta ELISA de los grupos experimentales se informaron gráficamente en la figura 5. En el primer día de vida de las aves, se observó una alta cantidad de anticuerpos anti-NDV con valores superiores de 1300 en todos los tratamientos, los cuales disminuyeron progresivamente a lo largo del ensayo, llegando a valores de 300 títulos de anticuerpos al final del estudio. La presencia de altos niveles de anticuerpos anti-NDV en el día 1 de vida proporcionó una protección inicial contra posibles infecciones, ya que estos anticuerpos provienen de la madre a través de la transferencia pasiva. Aproximadamente el 30% de los anticuerpos IgY y el 1% de los anticuerpos IgA e IgM presentes en el plasma de las gallinas son transferidos a las crías (Isihak et al., 2020; Müller et al., 2012).

La disminución progresiva de la cantidad de anticuerpos anti-NDV encontrados en el día 21 y 42 de la evaluación del estudio, corresponden principalmente a la ausencia de un estímulo antigénico para promover la inmunidad adaptativa del ave. Sin exposición a un desafío, el sistema inmunológico no tiene la necesidad de producir anticuerpos específicos contra NDV, lo que lleva a niveles basales (Cardoso et al., 2005). Dentro del estudio, no se establecen diferencias significativas para determinar la influencia del probiótico sobre el título de anticuerpos contra el agente causal de la enfermedad de Newcastle (NDV) en el día 1 ($F=0.39$; $p=0.76$), 21 ($F=1.24$; $p=0.36$) y 42 ($F=0.49$; $p=0.70$) de vida de las aves (Anexo 15). Ya que no se evidencia un aumento en la cantidad de los títulos de anticuerpos a lo largo del experimento en aves que fueron suplementadas con el probiótico. Esto sugiere que la suplementación con el probiótico no tuvo un impacto significativo en la producción de anticuerpos anti-NDV.

Los anticuerpos maternos transferidos pueden llegar a interferir con la vacunación viva al neutralizar el virus de la vacuna. Por lo que, se debe establecer un esquema de vacunación adecuado para reforzar la respuesta inmune de una parvada, asegurando títulos protectores superiores al 85% (Oberländer et al., 2020). Este enfoque garantiza que las aves mantengan una protección adecuada contra NDV, especialmente a medida que los anticuerpos maternos disminuyen y el sistema inmunológico de las aves pueda comenzar a generar su propia respuesta inmunitaria adaptativa.

Figura 5

Título de anticuerpos obtenidos contra NDV de cada uno de los tratamientos en los días 1, 21 y 42 de vida del ave.



4.4 Título de anticuerpos contra el virus de la Bronquitis infecciosa (IBV)

Los títulos de anticuerpos contra IBV se comportaron de manera similar a los anticuerpos obtenidos contra NDV. En la figura 6, se observó una alta cantidad de anticuerpos contra IBV, con valores entre 5000 a 9000 títulos de anticuerpos en las aves de un día de vida que corresponden a los anticuerpos derivados de la madre, por la alta tasa de transferencia vertical del 38.6%, con una vida media útil de 4 a 6 días (Gharaibeh et al., 2008; Roh et al., 2013). Asimismo, se establece una disminución general de los anti-IBV en los 21 y 42 días de edad de las aves, relacionado principalmente por la ausencia de agentes adversos que puedan promover el sistema inmunológico del ave, así como la degradación natural de los anticuerpos maternos. Además, la falta de estímulo antigénico, como una exposición al virus o una vacunación de refuerzo, contribuye a esta disminución, ya que el sistema inmunológico del ave no está inducido a producir nuevos anticuerpos específicos contra IBV (Meir et al., 2012; Mondal y Naqi, 2001).

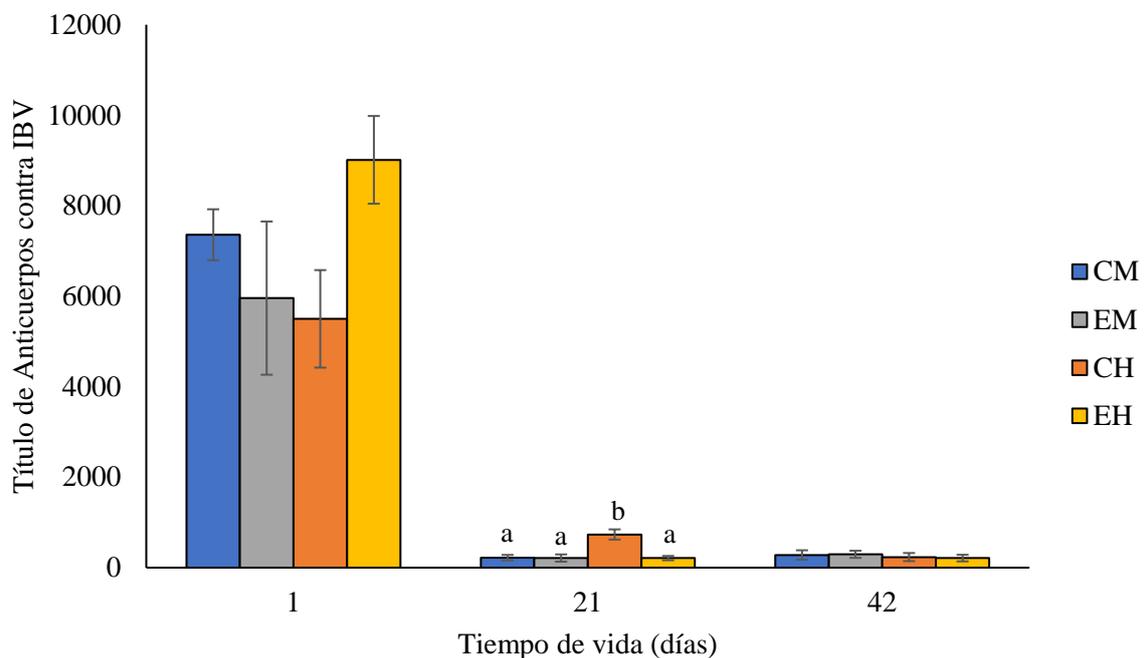
No se presentaron diferencias significativas entre las aves suplementadas con y sin el probiótico sobre los títulos de anticuerpos post vacunación contra el agente causal de la enfermedad de Bronquitis en el día 1 ($F=0.80$; $p=0.53$) y 42 ($F=0.10$; $p=0.96$) (Anexo 17) de vida de las aves,

mientras que en el día 21 ($F=6.06$; $p=0.02$) (Anexo 17) se establecen diferencias significativas con títulos de anticuerpos negativos en mayor proporción encontrados en el tratamiento CH en comparación con los demás tratamientos como se observa en la figura 6.

Los títulos negativos de anticuerpos en sangre no están asociados con la protección contra IBV porque indican que el organismo no ha desarrollado una respuesta inmune específica al virus, por lo tanto, se establece que la vacunación es una herramienta fundamental en las aves, ya que les confieren protección ante desafíos, mejorando la inmunidad celular; promoviendo la producción y maduración de linfocitos CD4 y CD8, así como la síntesis local de IgA (Meir et al., 2012; Roh et al., 2013). Sin una adecuada vacunación y estímulo antigénico, las aves no pueden mantener niveles suficientes de anticuerpos protectores, lo que subraya la importancia de un programa de vacunación bien estructurado para asegurar la salud y la protección contra IBV (Awad et al., 2016).

Figura 6

Título de anticuerpos obtenidos contra IBV de cada uno de los tratamientos en los días 1, 21 y 42 de vida del ave.



4.5 Título de anticuerpos contra la enfermedad infecciosa de la Bursa (IBD).

Los resultados obtenidos sobre el nivel de anticuerpos contra IBD demostraron que en el día 1 posterior a la eclosión era elevados, lo que se asocia principalmente con los anticuerpos maternos. Autores como Chansiripornchai y Sasipreeyajan (2009) sugieren que los anticuerpos

maternos proporcionan protección hasta los 14 días de edad, sin embargo, la eficiencia de la respuesta inmunitaria depende de la madurez inmunológica y la capacidad celular de reconocer antígenos específicos (Moraes et al., 2005). Se ha evidenciado una mejor respuesta inmune a las vacunas contra IBD en ausencia de anticuerpos maternos, alrededor de los 21 días de edad debido a la disponibilidad de todo el antígeno de la vacuna para provocar una respuesta inmune eficiente en las aves (Sedeik et al., 2019). Sin embargo, estos anticuerpos pueden llegar a afectar negativamente la respuesta inmune a la vacuna contra la IBD. Por lo que no es aconsejable vacunar con cepas de virus intermedio a los polluelos la primera semana de vida (Kumar et al., 2000).

La investigación realizada por Bose et al., (2003) destacan que la seroconversión positiva (títulos > 385) en respuesta a una vacuna intermedia en pollos de engorde con un alto nivel de anticuerpos maternos que se observa a partir de los 18 días después de la vacunación. Por esta razón, se establece que en el día 21 (3 días post-vacunación) se presentaron títulos negativos de anticuerpos (433 ± 118 títulos), sugiriendo que el sistema inmunológico de las aves aún estaba en proceso de respuesta a la vacuna y no había alcanzado niveles detectables de anticuerpos protectores.

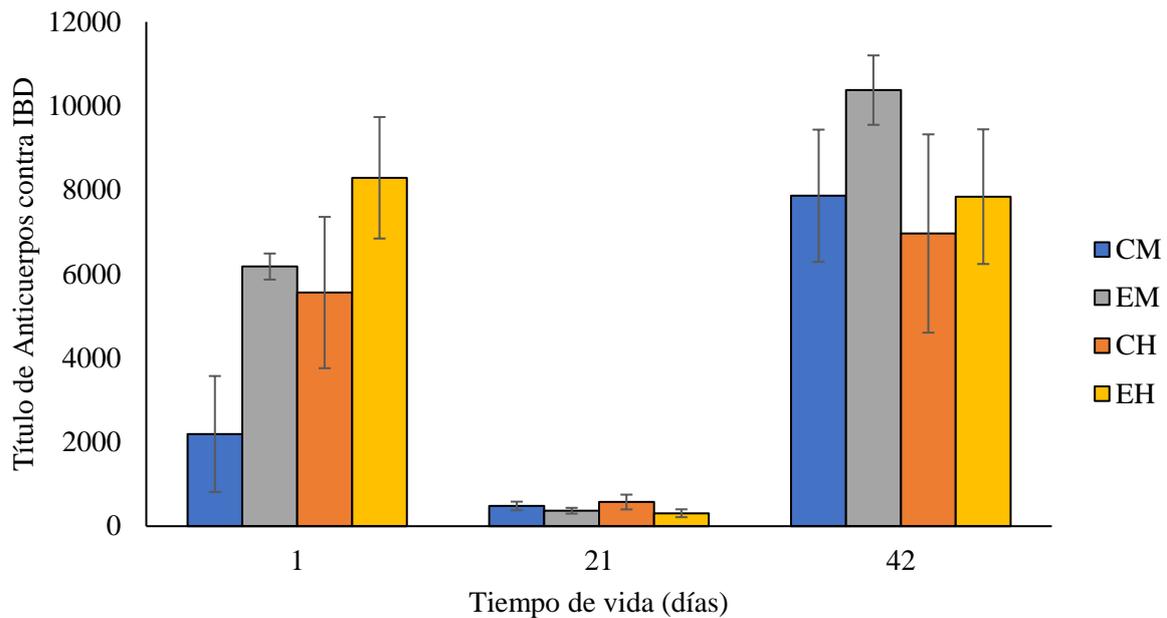
Esto subraya la importancia de permitir un tiempo adecuado para que la respuesta inmune se desarrolle completamente antes de evaluar la eficacia de la vacunación. Además, es posible que la presencia inicial de altos niveles de anticuerpos maternos haya interferido temporalmente con la respuesta a la vacuna, retrasando la seroconversión positiva hasta que los niveles de anticuerpos maternos disminuyeran lo suficiente para permitir una respuesta efectiva a la vacuna (Sedeik et al., 2019).

Por otro lado, en la figura 7 se evidencia un aumento de anticuerpos contra IBD en el día 42 (8261 ± 1470 títulos) que no se refleja en las demás enfermedades evaluadas. La presencia de altos títulos de anticuerpos mayores a 5000 en todos los tratamientos durante el día 42 (25 días post-vacunación) puede ser causado por la vacunación. Sin embargo, los datos obtenidos corresponden a una posible infección provocada por el virus de la bursitis infecciosa dentro de la nave de crianza de pollos. Esto se respalda por los datos de atrofiamiento obtenidos en bursa y por el bajo nivel de anticuerpos encontrados en las otras evaluaciones (NDV e IBV), lo que demuestra indicios de una inmunosupresión en este órgano importante para la maduración de linfocitos B productores de anticuerpos (Kumar et al., 2000; Zorman et al., 2011).

Los títulos de anticuerpos post vacunación contra el agente causal de la enfermedad infecciosa de la Bursa al igual que las anteriores evaluaciones, no presentan diferencias significativas entre los tratamientos (CM, CH, EM y EH) en el día 1 ($F=1.46$; $p=0.30$), 21 ($F=0.42$; $p=0.74$) y 42 ($F=0.46$; $p=0.72$) (Anexo 19) de vida de las aves.

Figura 7

Título de anticuerpos obtenidos contra IBD de cada uno de los tratamientos en los días 1, 21 y 42 de vida del ave.



4.6 Índice morfométrico de órganos linfáticos

4.6.1 Índice de Bazo

El mayor índice del bazo en el día 1 se encontró en el tratamiento CH con un valor de 0.71 g/kg, mientras que en el día 21 se posiciona EH con el valor más alto de 0.84 g/kg. Finalmente, en el día 42 se determinó que el índice más alto correspondía al tratamiento CM seguido de EH con valores de 1.03 y 0.98 g/kg, respectivamente. Investigaciones como Xu et al. (2020) establecen que el nivel más alto del índice del bazo puede alcanzar un máximo de 0.80 g/kg en el día 42, después del cual estas cifras disminuirán ligeramente con el tiempo hasta llegar a niveles basales con valores alrededor de 0.10 g/kg; llegando a ser coherente con el crecimiento y desarrollo del ave.

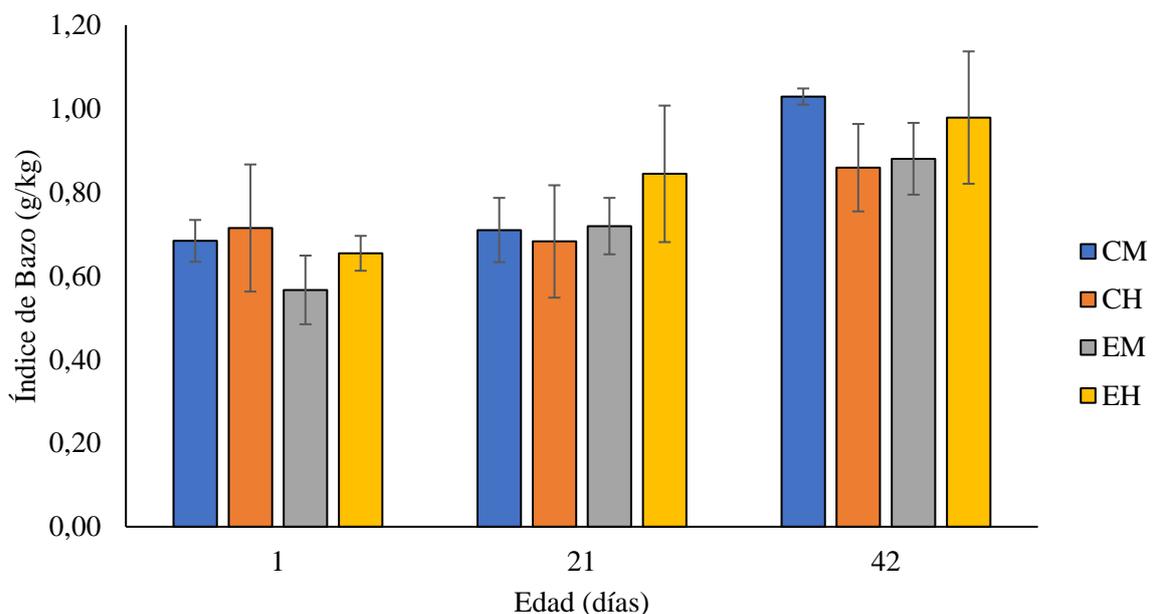
Los resultados obtenidos en el análisis de la varianza mostraron que el tratamiento aplicado no tuvo un efecto significativo en el porcentaje del peso del bazo en el día 1 ($F=0.38$; $p=0.77$), 21

($F=0.30$; $p=0.82$) y 42 ($F=0.48$; $p=0.71$) (Anexo 27). La falta de significancia estadística sugiere que estas diferencias obtenidas no fueron lo suficientemente consistentes como para ser consideradas relevantes a nivel biológico. A pesar de que hubo variaciones en el índice del bazo a lo largo del estudio y los tratamientos aplicados no tuvieron un impacto en el peso relativo de este órgano. Se establece que factores externos, como la composición nutricional y el ambiente, podrían haber influido directamente en el desarrollo del bazo (Xu et al., 2020).

Autores como Liu et al. (2015) observaron un resultado similar al obtenido en este estudio, ya que los pollos de engorde desafiados con LPS alimentados con una dieta basada en BA presentaron una disminución del peso de la bolsa y del bazo, indicando que la suplementación con BA podría ejercer un efecto beneficioso sobre los mecanismos homeostáticos dentro de estos órganos inmunes y sugiriendo que el efecto beneficioso podría atribuirse a la acción antiinflamatorio del BA (Du et al., 2013).

Figura 8

Efecto de la dieta control y Ecobiol en el índice del bazo de pollos de engorde.



4.6.2 Índice de Timo

En la figura 9, se puede denotar que los índices de timo encontrados el día 1 son mayores a 2.91 g/kg en los tratamientos evaluados. Estos datos fueron superiores a lo observado por Hurlaska et al. (2020), quienes obtuvieron valores de 1.13 ± 0.27 g/kg a los 8 días de edad. Esto sugiere la presencia de células de defensa inmunitaria al final del desarrollo prenatal. Esta

diferencia podría estar relacionada con factores genéticos, ambientales o de manejo que influyen en el desarrollo del timo de aves.

Por otro lado, en el día 21 de vida de las aves se presentan valores mayores a 3.26 g/kg, lo cual se respalda en investigaciones realizadas por Alkie et al. (2019), quienes encontraron que en el día 20 del ensayo se presentó un aumento en el índice del timo de pollos alcanzando un valor de 1.86 ± 0.29 g/kg. Este aumento podría ser indicativo de un desarrollo robusto del sistema inmunitario en las primeras semanas de vida, cuando las aves están expuestas a diversos antígenos del ambiente.

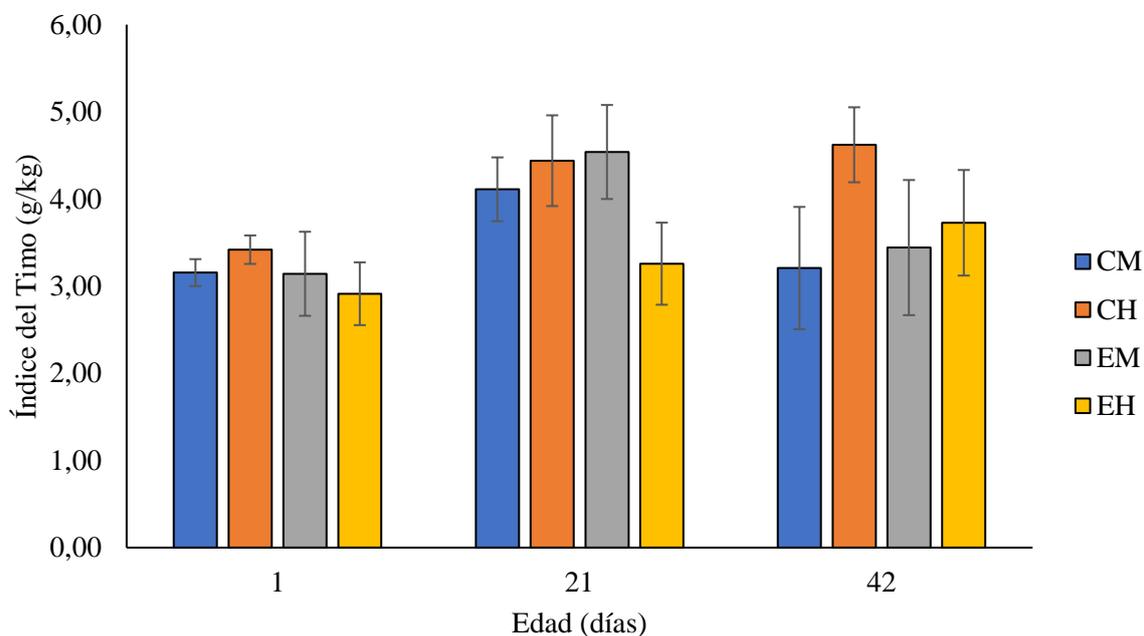
En el día 42 de vida, se observó una disminución en CM y EM con valores de 3.21 y 3.44 g/kg, respectivamente. Esto puede ser indicativo del proceso de envejecimiento del ave, donde el timo, un órgano crucial para el desarrollo del sistema inmunológico, tiende a involucionar con la edad (Xu et al., 2020). Por otro lado, se establece un aumento relativo del órgano en CH y EH con índices de 4.62 y 3.73 g/kg, respectivamente. Este aumento pudo provocarse probablemente por la ganancia de peso corporal del ave, ocasionada por factores hormonales (Kannan et al., 2017). El índice del peso de Timo con respecto al peso corporal no difiere estadísticamente entre los tratamientos para cada uno de los días evaluados 1 ($F=0.32$; $p=0.81$), 21 ($F=1.15$; $p=0.40$) y 42 ($F=0.73$; $p=0.57$) (Anexo 28).

Sosa et al. (2020) no encontraron efectos en el peso relativo del timo al incluir un probiótico a base de una cepa de *Lactobacillus pentosus* LB-31 suministrada en la dieta de pollos de ceba. Por lo tanto, se determina que la acción efectora de los microorganismos probióticos depende de la especificidad de la especie y cepa utilizada en la experimentación, así como de la administración, los métodos de preparación, edad de los animales, composición de la dieta y estado de higiene de la nave de crianza. Estos factores pueden influir en la eficacia de los probióticos en el desarrollo y la función inmunológica del timo en pollos (Cao et al., 2013).

Los resultados obtenidos dentro de la investigación destacan la importancia de monitorear el desarrollo del timo en diferentes etapas de crecimiento, ya que este órgano desempeña un papel fundamental en la maduración de linfocitos T, que son fundamentales para la inmunidad celular. Asimismo, la variabilidad encontrada en los índices del timo refleja diferencias en el estado de salud y bienestar de las aves, así como su capacidad para enfrentar desafíos inmunológicos (Arteaga y Jauregui, 2016; Campos et al., 2022).

Figura 9

Efecto de la dieta control y Ecobiol en el índice del timo de pollos de engorde.



4.6.3 Índice de Bursa

El índice de la bursa se establece como un indicador de inmunocompetencia, utilizado para monitorear el estatus inmunológico de una parvada. La bursa de Fabricio crece de forma armónica hasta los 42 días de vida, siempre y cuando no presenten factores de estrés. En pollos de engorde de 3 a 6 semanas de edad, este índice se encuentra en un rango de 2 a 4 g/kg. Sin embargo, valores iguales o inferiores 1 g/kg están correlacionados con inmunosupresión en la parvada (Giambrone, 1996).

En la figura 10, se observan valores atípicos inferiores a 0,47 g/kg en todos los tratamientos del día 42, lo que evidencia un atrofiamiento de la bolsa de Fabricio provocada por agentes inmunosupresores que afectan el desempeño inmunológico de este órgano linfóide (Thomrongsuwannakij et al., 2021). El atrofiamiento en la Bursa es un fenómeno común, a menudo ocasionado por la vacunación. Rautenschlein et al., (2005) informa que las aves inmunizadas con vacunas intermedias e intermedias plus contra IBD presentan índices de bolsa inferiores a 0,7 g/kg en comparación con aves no inmunizadas.

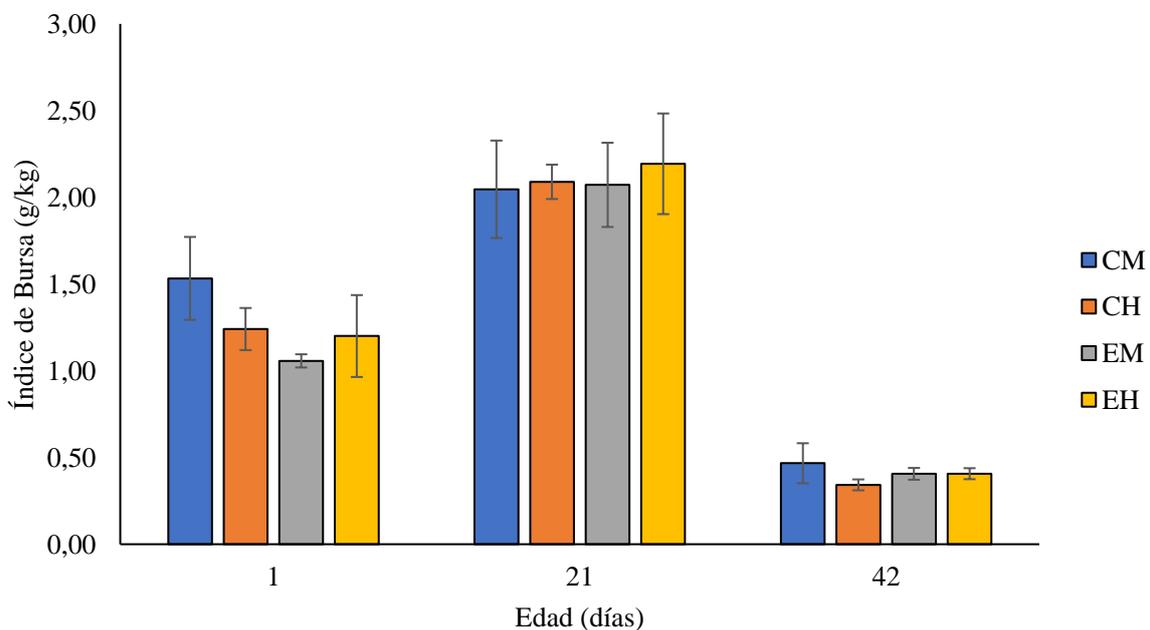
Las vacunas vivas tienen un efecto destructivo en diversos grados sobre la bolsa de Fabricio, lo cual puede ser transitorio. Sin embargo, el descenso abrupto del índice observado en la

investigación no se debe a la vacunación, ya que el sistema inmunológico del ave tuvo tiempo para recuperarse y no se denota un decrecimiento al día 21 de vida. Esto sugiere la presencia de un factor exógeno, como es el virus que provoca la enfermedad infecciosa de la bolsa de Fabricio que detuvo su crecimiento. Este virus es el principal agente que afecta directamente la funcionalidad de este órgano, provocando lesiones que, mediante una evaluación histopatológica, se puede diagnosticar el cuadro de inmunosupresión de la parvada (Kumar et al., 2000; Sedeik et al., 2019).

El índice morfométrico de la Bursa de pollos COBB, al igual que los otros ensayos realizados en bazo y timo, no presenta diferencias significativas entre los tratamientos evaluados en los días 1 ($F=2.09$; $p=0.20$), 21 ($F=0.07$; $p=0.98$) y 42 ($F=0.61$; $p=0.63$) (Anexo 29). La ausencia de diferencias significativas en el índice de la bursa entre los tratamientos evaluados resalta la importancia de considerar múltiples factores al evaluar la salud y el desarrollo inmunológico de las aves.

Figura 10

Efecto de la dieta control y Ecobiol en el índice de la bursa de pollos de engorde.



El índice de órganos inmunitarios se ha utilizado como indicadores para medir la inmunidad celular y humoral, debido que el desarrollo de los órganos linfáticos (bazo, timo y bursa) mantienen una relación directa entre el peso corporal del ave y su sistema inmunológico. Se determina que mientras más desarrollado esté el órgano, mayor será la protección inmunológica que se brindará al ave. Esto subraya la importancia de monitorear el índice de la bursa como

parte integral del manejo de la salud y el bienestar de las parvadas (Arteaga y Jauregui, 2016; Perozo et al., 2004).

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- El aditivo alimenticio Ecobiol suministrado en la dieta de las aves no disminuye el recuento de *E. coli* y *Clostridium* sp en el íleon, lo cual, puede atribuirse a factores externos no controlados como la humedad en cama y la falta de monitoreo técnico en el galpón que favorecen a la proliferación de estos patógenos en el intestino del ave.
- La suplementación con el probiótico Ecobiol no evidencia un desempeño inmunológico en la actividad humoral, ya que los niveles séricos de la inmunoglobulina G no mejoraron en el tiempo, llegando a niveles basales para NDV e IBV. Mientras que, en el día 42 de la experimentación se observó un aumento de anticuerpos para IBD, probablemente ocasionado por una infección del virus dentro de la nave de crianza.
- La ingesta de Ecobiol en las aves dentro del estudio no condujo a una mejora en el aumento del índice de órganos linfáticos (bazo, timo y bursa). Se presume que, en el día 42, las aves experimentaron inmunosupresión, ya que el índice de la bursa mostró un atrofiamiento ocasionado principalmente por factores exógenos como virus (IBD), que alteran directamente la funcionalidad, desarrollo y el rendimiento adecuado del órgano.

5.2 Recomendaciones

- Analizar los aminoácidos digeribles presentes en las distintas dietas de los pollos de engorde, con el propósito de estandarizar la elaboración del alimento y verificar que cumplan con los valores nutricionales requeridos en las distintas etapas de crecimiento.
- Establecer un cuadro de vacunación óptimo de acuerdo con estudios epidemiológicos, la prevalencia del virus, los datos de brotes esporádicos, el diagnóstico preciso y la potencia de la vacuna.
- Realizar la identificación y cuantificación de *B. amyloliquefaciens* en el tracto gastrointestinal de pollos de engorde, con el fin de determinar la efectividad de colonización del probiótico empleado.
- Continuar con estudios serológicos donde se establezcan más puntos de muestreo a lo largo del tiempo para obtener datos que permitan realizar un monitoreo de vacunación más exhaustivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGROCALIDAD (2020). *Manual de aplicabilidad de buenas prácticas avícolas*. Gobierno del Ecuador.
- AGROCALIDAD. (2013). Programa nacional sanitario avícola. Dirección de Sanidad Animal 1- 110 <https://bit.ly/3Yuzwt3>
- AGROCALIDAD. (2017). GUÍA DE BUENAS PRÁCTICAS AVÍCOLAS. *Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca*, Art. Resolución 0060.
- Agunos, A., Léger, D., & Carson, C. (2012). Review of antimicrobial therapy of selected bacterial diseases in broiler chickens in Canada. *The Canadian Veterinary Journal*, 53(12), 1289.
- Alkhalaf, A., Alhaj, M., & Al-Homidan, I. (2010). Influence of probiotic supplementation on immune response of broiler chicks. *Egyptian Poultry Science Journal*, 30(1), 271–280.
- Alkie, T. N., Yitbarek, A., Hodgins, D. C., Kulkarni, R. R., Taha-Abdelaziz, K., & Sharif, S. (2019). Development of innate immunity in chicken embryos and newly hatched chicks: a disease control perspective. *Avian Pathology*, 48(4), 288-310. <https://doi.org/10.1080/03079457.2019.1607966>
- Alonso, N., y Poveda, J. (2008). Estudio Comparativo en Técnicas de Recuento Rápido en el Mercado y Placas Petrifilm 3M para el Análisis de Alimentos. [Trabajo de grado, Pontificia Universidad Javeriana]. Repositorio PUJ. <https://bit.ly/3XoNuw2>
- Arteaga, V., y Jauregui, D. (2016). EL propóleo en la morfometría linfoidea y control bacteriano en pollos camperos. *AXIOMA*, 15, 16-25. <https://axioma.pucesi.edu.ec/index.php/axioma/article/view/455/441>
- Aryal, S. (2022, 10 agosto). *The Triple Sugar Iron (TSI) Test – Principle, Procedure, Uses and Interpretation*. Microbiology Info.com. <https://microbiologyinfo.com/triple-sugar-iron-tsi-test/>
- Asamblea Nacional. (2008). *Constitución de la República del Ecuador*. Registro Oficial 449 de 20 de octubre de 2008
- Asamblea Nacional. (2010). Ley orgánica del régimen de la Soberanía Alimentaria | Ecuador - Guía Oficial de Trámites y Servicios. <https://www.gob.ec/regulaciones/ley-organica-regimen-soberania-alimentaria>
- Astudillo, K. (2013). Cinética de anticuerpos posvacunales contra Bronquitis Infecciosa mediante la técnica de microelisa en aves de postura. [Trabajo de grado, Escuela Politécnica del Ejército]. Repositorio ESPE. <https://bit.ly/3V6IsSv>
- Awad, F., Hutton, S., Forrester, A., Baylis, M., & Ganapathy, K. (2016). Heterologous live infectious bronchitis virus vaccination in day-old commercial broiler chicks: clinical signs, ciliary health, immune responses and protection against variant infectious bronchitis viruses. *Avian Pathology*, 45(2), 169-177.

- Aziz, N., Khidhir, Z., Hama, Z. & Mustafa, N. (2020). Influence of Probiotic (Miaclost) Supplementation on Carcass Yield, Chemical Composition and Meat Quality of Broiler Chick. *Journal of Animal and Poultry Production*, 11(1), 9-12. <https://doi.org/10.21608/jappmu.2020.77767>
- Bahaddad, S. A., Almalki, M. H. K., Alghamdi, O. A., Sohrab, S. S., Yasir, M., Azhar, E. I. & Chouayekh, H. (2022). Bacillus Species as Direct-Fed Microbial Antibiotic Alternatives for Monogastric Production. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09909-5>
- Balaguer, J. L. (2008). Inmunidad Pasiva I. *CEVA Salud Animal*. <https://seleccionesavicolas.com/pdf-files/2008/8/4082-inmunidad-pasiva-i.pdf>
- Berg, T. P. V. D. (2000). Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian pathology*, 29(3), 175-194. <https://doi.org/10.1080/03079450050045431b>
- Bergeron, C. R., Prussing, C., Boerlin, P., Daignault, D., Dutil, L., Reid-Smith, R. J., Zhanel, G. G., & Manges, A. R. (2012). Chicken as Reservoir for Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* in Humans. *Emerging Infectious Diseases*, 18(3), 415–421. <https://doi.org/10.3201/EID1803.111099>
- Biasato, I., Gasco, L., de Marco, M., Renna, M., Rotolo, L., Dabbou, S., Capucchio, M. T., Biasibetti, E., Tarantola, M., Sterpone, L., Cavallarini, L., Gai, F., Pozzo, L., Bergagna, S., Dezzutto, D., Zoccarato, I., & Schiavone, A. (2018). Yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) inclusion in diets for male broiler chickens: effects on growth performance, gut morphology, and histological findings. *Poultry Science*, 97(2), 540–548. <https://doi.org/10.3382/PS/PEX308>
- BioChek. (2012a). Infectious Bronchitis Antibody ELISA (Detects antibodies to avian Corona virus). *Catalogue Code CK119*, 4–7.
- BioChek. (2012b). Infectious Bursal Disease Antibody ELISA. *Catalogue Code CK113*, 4–7.
- BioChek. (2012c). Newcastle Disease Antibody Test Kit. *Catalogue Code CK 116*, 4–7.
- Birmani, M. W., Nawab, A., Ghani, M. W., Li, G., Wu, J., Liu, W. & An, L. (2019). Probiotic Supplementation in Poultry Production as an Alternative to Antibiotic Feed Additive. *Animal Review*, 6(1), 5-16. <https://doi.org/10.18488/journal.ar.2019.61.5.16>
- Bose, R. K., Hossain, K. M., Sil, B. K., Taimur, M., Pugliese, C., & Franci, O. (2003). Comparative sero evaluation of live and killed Gumboro vaccine in broilers. *Italian Journal of Animal Science*, 2(2), 157-162.
- Brisbin, J. T., Gong, J. & Sharif, S. (2008). Interactions between commensal bacteria and the gut-associated immune system of the chicken. *Animal Health Research Reviews*, 9(1), 101-110. <https://doi.org/10.1017/s146625230800145x>

- Campos, J., Alfaro, M., Rivas, M., Cárdenas, L., y Acuña, R. (2022). Alometría digestiva en pollos suplementados con harina de orégano como promotor de crecimiento. *Revista ESPAMCIENCIA para el Agro*, 13(1), 16-25.
- Cao, G. T., Zeng, X. F., Chen, A. G., Zhou, L., Zhang, L., Xiao, Y. P., & Yang, C. M. (2013). Effects of a probiotic, *Enterococcus faecium*, on growth performance, intestinal morphology, immune response, and cecal microflora in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88. *Poultry science*, 92(11), 2949-2955.
- Cao, G. T., Zeng, X. F., Chen, A. G., Zhou, L., Zhang, L., Xiao, Y. P., & Yang, C. M. (2013). Effects of a probiotic, *Enterococcus faecium*, on growth performance, intestinal morphology, immune response, and cecal microflora in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88. *Poultry science*, 92(11), 2949-2955.
- Cardoso, W. M., De Aguiar Filho, J. C., Romao, J. M., De Oliveira, W. F., Salles, R. P. R., Teixeira, R., & Sobral, M. (2005). Effect of associated vaccines on the interference between Newcastle Disease virus and infectious bronchitis virus in broilers. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 7(3), 181-184. <https://doi.org/10.1590/s1516-635x2005000300008>
- Cavanagh, D., & J. Gelb Jr.(2008) *Infectious bronchitis*. In: *Diseases of poultry*. Blackwell Publishing, Ames, IA. pp. 117–135.
- Chansiripornchai, N., & Sasipreeyajan, J. (2009). Comparison of the efficacy of the immune complex and conventionally live vaccine in broilers against infectious bursal disease infection. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 39(2), 115-120.
- Chapman, C. M. C., Gibson, G. R., & Rowland, I. (2011). Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? *European Journal of Nutrition*, 50(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/S00394-010-0166-Z>
- Chávez, L. A., López, A. Y., y Parra, J. E. (2016). Crecimiento y desarrollo intestinal de aves de engorde alimentadas con cepas probióticas. *Archivos de zootecnia*, 65, 51-58. <https://www.redalyc.org/pdf/495/49544737008.pdf>
- Chavez, L. A., López, A., y Parra, J. E. (2016). El uso de *Enterococcus faecium* mejora parámetros productivos en pollos de engorde. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 63(2), 113-123.
- Clavijo, V., & Flórez, M. J. V. (2018). The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: a review. *Poultry science*, 97(3), 1006-1021. <https://doi.org/10.3382/ps/pex359>
- Comisión Europea. (2006). Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters effect. *Comisión Europea*. https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP_05_1687
- CONAVE. (2022, June 28). *INFORMACIÓN SECTOR AVÍCOLA*. <https://conave.org/informacion-sector-avicola-publico/>

- Cortés, L., y Villamarín, S. (2013). Características morfométricas de órganos linfoides y estudios serológicos en levante de ponedoras utilizando un inmunomodulador, vitaminas y aminoácidos. *Spei Domus*, 9(18), 29-36.
- Cortés, V. (2022). *Epidemiología y control de las principales enfermedades avícolas de importancia en sanidad animal y salud pública*. [Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia]. Repositorio UPV. <https://bit.ly/3WIJKL6>
- Dahiya, J. P., Hoehler, D., Wilkie, D. C., Van Kessel, A. G., & Drew, M. D. (2005). Dietary glycine concentration affects intestinal *Clostridium perfringens* and lactobacilli populations in broiler chickens. *Poultry Science*, 84(12), 1875-1885.
- De Oliveira, M. J. K., Sakomura, N. K., De Paula Dorigam, J. C., Doranalli, K., Soares, L., & Da Silva Viana, G. (2019). *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 alone or in combination with antibiotic growth promoters improves performance in broilers under enteric pathogen challenge. *Poultry Science*, 98(10), 4391-4400. <https://doi.org/10.3382/ps/pez223>
- De Paula, J., y García, M. (2023). La utilización de Ecobiol® (*B. amyloliquefaciens* CECT 5940) reduce la microflora patógena en el intestino y mejora el rendimiento de los pollos de engorde. *aviNews, La Revista Global De Avicultura*. <https://avinews.com/la-utilizacion-de-ecobiol-b-amyloliquefaciens-cept-5940-reduce-la-microflora-patogena-en-el-intestino-y-mejora-el-rendimiento-de-los-pollos-de-engorde/>
- Diarra, M. S., Silversides, F. G., Diarrassouba, F., Pritchard, J., Masson, L., Brousseau, R., Bonnet, C., Delaquis, P., Bach, S., Skura, B. J., & Topp, E. (2007). Impact of feed supplementation with antimicrobial agents on growth performance of broiler chickens, *Clostridium perfringens* and enterococcus counts, and antibiotic resistance phenotypes and distribution of antimicrobial resistance determinants in *Escherichia coli* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(20), 6566–6576. <https://doi.org/10.1128/AEM.01086-07>
- Donado-Godoy, P., Gardner, I., Byrne, B. A., Leon, M., Perez-Gutierrez, E., Ovalle, M. v., Tafur, M. A., & Miller, W. (2012). Prevalence, risk factors, and antimicrobial resistance profiles of Salmonella from commercial broiler farms in two important poultry-producing regions of Colombia. *Journal of Food Protection*, 75(5), 874–883. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-458>
- Dortmans, J. C., Peeters, B. P., & Koch, G. (2012). Newcastle disease virus outbreaks: vaccine mismatch or inadequate application?. *Veterinary microbiology*, 160(1-2), 17-22. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.003>
- Du, L., Chen, W., Wang, J., Huang, L., Zheng, Q., Chen, J., Wang, L., Cai, C., Zhang, X., Wang, L., Zhong, Q., Zhong, W., Fang, X., & Liao, Z. (2023). Beneficial Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* D1 Soymilk Supplementation on Serum Biochemical Indexes and Intestinal Health of Bearded Chickens. *Microorganisms*, 11(7), 1660. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071660>

- Ebeid, T. A., Al-Homidan, I. H., & Fathi, M. M. (2021). Physiological and immunological benefits of probiotics and their impacts in poultry productivity. *World's Poultry Science Journal*, 77(4), 883–899. <https://doi.org/10.1080/00439339.2021.1960239>
- El-Sharkawy, H., Tahoun, A., Rizk, A. M., Suzuki, T., Elmonir, W., Nassef, E., Shukry, M., Germoush, M. O., Farrag, F., Bin-Jumah, M., & Mahmoud, A. M. (2020). Evaluation of *Bifidobacteria* and *Lactobacillus* Probiotics as Alternative Therapy for Salmonella typhimurium Infection in Broiler Chickens. *Animals 2020, Vol. 10, Page 1023*, 10(6), 1023. <https://doi.org/10.3390/ANI10061023>
- Evonik. (2018, 26 abril). *Estabilizando la flora intestinal con probióticos Ecobiol*. Evonik. Recuperado 23 de octubre de 2022, de <https://animal-nutrition.evonik.com/es/productos-y-soluciones/functional-feed-additives/ecobiol>
- Evonik. (2020, 6 febrero). *Bacillus amyloliquefaciens CECT 5940 (Ecobiol®) afecta positivamente la microbiota intestinal al mismo tiempo que mejora el rendimiento y la digestibilidad de aminoácidos en pollos de engorde bajo desafío entérico de patógenos*. Actualidad Avipecuaria. <https://actualidadavipecuaria.com/ecobiol-afecta-positivamente-la-microbiota-intestinal/>
- Fancher, C. A., Thames, H. T., Colvin, M. G., Zhang, L., Nuthalapati, N., Kiess, A., & Sukumaran, A. T. (2021). Research Note: Prevalence and molecular characteristics of *Clostridium perfringens* in “no antibiotics ever” broiler farms. *Poultry Science*, 100(11), 101414. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101414>
- Fancher, C. A., Zhang, L., Kiess, A. S., Adhikari, P. A., Dinh, T. T., & Sukumaran, A. T. (2020). Avian pathogenic *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens*: Challenges in no antibiotics ever broiler production and potential solutions. *Microorganisms*, 8(10), 1533. <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/10/1533>
- FAO. (2021). *Producción y productos avícolas*. <https://www.fao.org/poultry-production-products/production/es/>
- Fawzy, M., Ali, R. R., Elfeil, W. K., Saleh, A. A., & El-Tarabilli, M. M. A. (2020). Efficacy of inactivated velogenic Newcastle disease virus genotype VII vaccine in broiler chickens. In *Veterinary Research Forum*. Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-542>
- FDA. (2013). *Guidance for Industry. New Animal Drugs and New Animal Drug Combination Products Administered in or on Medicated Feed or Drinking Water of Food-Producing Animals: Recommendations for Drug Sponsors for Voluntarily Aligning Product Use Conditions with GFI #209*. <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/d>
- Feng, J., Wang, L., Zhou, L., Yang, X., & Zhao, X. (2016). Using In Vitro Immunomodulatory Properties of Lactic Acid Bacteria for Selection of Probiotics against Salmonella Infection in Broiler Chicks. *PLOS ONE*, 11(1), e0147630. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0147630>

- Fernández, A., García, C., Sáez, J., y Valdezate, S. (2010). *Procedimientos de Microbiología Clínica: Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología* (E. Cercenado & R. Cantón, Eds.) [Seimc]. <https://bit.ly/3GInSyl>
- García, G., Ledesma, N., Sánchez, F., y Urquiza, O. (2019). Determinación de la Cantidad de *Clostridium Perfringens* y la Longitud de las Vellosidades Intestinales en Pollos de Engorda de 6 Semanas de Edad Aparentemente Sanos. *BM Editores*. <https://bit.ly/3Emtsta>
- Gaucher, M. L., Quessy, S., Letellier, A., Arsenault, J., & Boulianne, M. (2015). Impact of a drug-free program on broiler chicken growth performances, gut health, *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* occurrences at the farm level. *Poultry science*, 94(8), 1791-1801.
- Geeraerts, S., Delezie, E., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., Devreese, B., & Van Immerseel, F. (2016). Vegetative *Bacillus amyloliquefaciens* cells do not confer protection against necrotic enteritis in broilers despite high antibacterial activity of its supernatant against *Clostridium perfringens* in vitro. *British Poultry Science*, 57(3), 324–329. doi:10.1080/00071668.2016.1169246
- Gharaibeh, S., & Mahmoud, K. (2013). Decay of maternal antibodies in broiler chickens. *Poultry Science*, 92(9), 2333-2336.
- Gharib-Naseri, K., Dorigam, J. C. P., Doranalli, K., Morgan, N. K., Swick, R. A., Choct, M., & Wu, S. (2021). *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 improves performance and gut function in broilers fed different levels of protein and/or under necrotic enteritis challenge. *Animal Nutrition*, 7(1), 185–197. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.05.004>
- Giambrone, J. (1996). Causa y prevención de la inmunosupresión. *Avicultura Profesional*, 14(5), 42-45.
- Grant, A., Gay, C. G., & Lillehoj, H. S. (2018). *Bacillus* spp. as direct-fed microbial antibiotic alternatives to enhance growth, immunity, and gut health in poultry. *Avian Pathology*, 47(4), 339–351. <https://doi.org/10.1080/03079457.2018.1464117>
- Gutiérrez, S. (2017). *Efecto Simbiótico a base de Sacchromyces cerevisiae y Bacillus subtilis sobre parámetros zootécnicos en pollos Cobb 500*. [Tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí]. Repositorio ESPAM. <https://bit.ly/3DJ3zET>
- Hafez, H. M. & Attia, Y. A. (2020). Challenges to the Poultry Industry: Current Perspectives and Strategic Future After the COVID-19 Outbreak. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00516>
- Haji-Abdolvahab, H., Ghalyanchilangeroudi, A., Bahonar, A., Ghafouri, S. A., Vasfi Marandi, M., Mehrabadi, M. H. F., & Tehrani, F. (2019). Prevalence of avian influenza, Newcastle disease, and infectious bronchitis viruses in broiler flocks infected with

- multifactorial respiratory diseases in Iran, 2015–2016. *Tropical animal health and production*, 51(3), 689-695. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1743-z>
- Hayes, J. R., English, L. L., Carr, L. E., Wagner, D. D., & Joseph, S. W. (2004). Multiple-Antibiotic Resistance of *Enterococcus* spp. Isolated from Commercial Poultry Production Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 6005–6011. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6005-6011.2004>
- He, Y., Liu, X., Dong, Y., Lei, J., Ito, K., & Zhang, B. (2021). *Enterococcus faecium* PNC01 isolated from the intestinal mucosa of chicken as an alternative for antibiotics to reduce feed conversion rate in broiler chickens. *Microbial Cell Factories*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/S12934-021-01609-Z>
- Hedman, H. D., Vasco, K. A., & Zhang, L. (2020). A Review of Antimicrobial Resistance in Poultry Farming within Low-Resource Settings. *Animals*, 10(8), 1264. <https://doi.org/10.3390/ANI10081264>
- Hernandez-Patlan, D., Solis-Cruz, B., M. Hargis, B. & Tellez, G. (2020). The Use of Probiotics in Poultry Production for the Control of Bacterial Infections and Aflatoxins. *Prebiotics and Probiotics - Potential Benefits in Nutrition and Health*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88817>
- Huralska, S., Kot, T., Koziy, V., Sokolyuk, V. M., & Khomenko, Z. (2020). Morphology and immunohistochemistry of thymus in Haysex brown cross chickens. *Journal of world's poultry research*. <https://doi.org/10.36380/jwpr.2020.53>
- Hussein, E., Ahmed, H., Abudabos, M., Suliman, M., Abd El-Hack, E., Swelum, A. & Alowaimer, A. (2020). Ameliorative Effects of Antibiotic-, Probiotic- and Phytobiotic-Supplemented Diets on the Performance, Intestinal Health, Carcass Traits, and Meat Quality of *Clostridium perfringens*-Infected Broilers. *Animals*, 10(4), 669. <https://doi.org/10.3390/ani10040669>
- Immerseel, F. V., Buck, J. D., Pasmans, F., Huyghebaert, G., Haesebrouck, F., & Ducatelle, R. (2004). *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian pathology*, 33(6), 537-549.
- INEC. (2023). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua 2020*. <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiZTEyY2NiZDI0YjZlYi00ZGQ1LTlkNGEtNDE1OGViM2Q1N2VlIiwidCI6ImYxNThhMmU4LWNhZWVtNDQwNi1iMGFiLWY1ZTI1OWJkYTExMiJ9&pageName=ReportSection>
- Intagri. (2019). *Principales Enfermedades Avícolas* / Intagri S.C. Recuperado 30 de octubre de 2022, de <https://www.intagri.com/articulos/ganaderia/principales-enfermedades-avicolas>
- Integratif, J. P., Siregar, J., Umar, S., & Hanafi, N. D. (n.d.). Contamination Analysis of *Escherichia coli* on Broiler Chicken Meat in Traditional Markets of Medan City. In *Jurnal Peternakan Integratif* (Vol. 10, Issue 1).

- Iñiguez Heredia, F. A., Espinoza Bustamante, X. E. & Galarza Molina, E. L. (2021). Uso de probióticos y ácidos orgánicos como estimulantes del desarrollo de aves de engorde: artículo de revisión. *Revista Alfa*, 5(14), 166-172. <https://doi.org/10.33996/revistaalfa.v5i14.107>
- Isihak, F. A., Hassan, S. M., Shaker, B. Z., & Salih, Y. A. (2020). Follow up the antibodies titer against Newcastle disease virus in broiler breeders using ELISA test. *Iraqi journal of Veterinary Sciences*, 34(2), 295-299. <https://doi.org/10.33899/ijvs.2019.125931.1189>
- Jackwood, M. W. (2012). Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian Diseases*, 56(4), 634–641. <https://doi.org/10.1637/10227-043012-Review.1>
- Jaimes, J., Gómez, A., Álvarez, D., Soler, D., Romero, J., y Villamil, L. (2010). Las enfermedades infecciosas y su importancia en el sector avícola. *Revista de Medicina Veterinaria*, (20), 49-61.
- Jayaraman, S., Thangavel, G., Kurian, H., Mani, R., Mukkalil, R., & Chirakkal, H. (2013). *Bacillus subtilis* PB6 improves intestinal health of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. *Poultry Science*, 92(2), 370–374. <https://doi.org/10.3382/PS.2012-02528>
- Jerzsele, Á., Szeker, K., Csizinszky, R., Gere, E., Jakab, C., Mallo, J. J., & Gálfi, P. (2012). Efficacy of protected sodium butyrate, a protected blend of essential oils, their combination, and *Bacillus amyloliquefaciens* spore suspension against artificially induced necrotic enteritis in broilers. *Poultry Science*, 91(4), 837-843. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01853>
- Jha, R., Das, R., Oak, S., & Mishra, P. (2020). Probiotics (Direct-fed microbials) in poultry nutrition and their effects on nutrient utilization, growth and laying performance, and gut health: A systematic review. *Animals*, 10(10), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ani10101863>
- Jones, P. J., Niemi, J., Christensen, J. P., Tranter, R. B., & Bennett, R. M. (2018). A review of the financial impact of production diseases in poultry production systems. *Animal production science*, 59(9), 1585-1597. <https://doi.org/10.1071/AN18281>
- Jouybari, M. G., Pour, V. R., Mohammad, M., Nagharchi, Z., Taghizadeh, M. R., & Dehpanah, N. (2009). The effect of novel probiotic on blood parameters and performance in broiler chickens. *Journal of Cell and Animal Biology*, 3(8), 141–144.
- Józefiak, D., Kaczmarek, S., & Rutkowski, A. (2008). A note on the effects of selected prebiotics on the performance and ileal microbiota of broiler chickens. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 17, 392–397.
- Kannan, T., Ramesh, G., Ushakumari, S., Raj, G. D., & Vairamuthu, S. (2017). Age related changes in T cell subsets in thymus and spleen of layer chicken (*Gallus domesticus*).

International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 6(1), 15-19.
<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.601.002>

- Kawasaki, T., Iwasaki, T., Ohya, I., Hasegawa, Y., Noguchi, M. & Watanabe, T. (2020). Effects of Sampling and Storage Method on Chicken Blood Glucose Measurement. *The Journal of Poultry Science*, 57(3), 241-245. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0190106>
- Kemmett, K., Humphrey, T., Rushton, S., Close, A., Wigley, P., & Williams, N. J. (2013). A longitudinal study simultaneously exploring the carriage of APEC virulence associated genes and the molecular epidemiology of faecal and systemic E. coli in commercial broiler chickens. *PLoS One*, 8(6), e67749.
- Khan, S., Yousaf, B., Mian, A. A., Rehman, A., & Farooq, M. (2011). Assessing the effect of administering different probiotics in drinking water supplement on broiler performance, blood biochemistry and immune response. *Journal Of Applied Animal Research*, 39(4), 418-428. <https://doi.org/10.1080/09712119.2011.623783>
- Korver, D. R. (2012). Implications of changing immune function through nutrition in poultry. *Animal Feed Science and Technology*, 173(1–2), 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.019>
- Krysiak, K., Konkol, D. & Korczyński, M. (2021). Overview of the Use of Probiotics in Poultry Production. *Animals*, 11(6), 1620. <https://doi.org/10.3390/ani11061620>
- Kumar, K., Singh, K. C. P., & Prasad, C. B. (2000). Immune responses to intermediate strain IBD vaccine at different levels of maternal antibody in broiler chickens. *Tropical animal health and production*, 32(6), 357.
- Kumari, N. & Sejian, V. (2021). Gut Health and Immunity in Improving Poultry Production. *Advances in Poultry Nutrition Research*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.95989>
- Laudadio, V., Passantino, L., Perillo, A., Lopresti, G., Passantino, A., Khan, R. U., & Tufarelli, V. (2012). Productive performance and histological features of intestinal mucosa of broiler chickens fed different dietary protein levels. *Poultry Science*, 91(1), 265–270. <https://doi.org/10.3382/PS.2011-01675>
- Lee, H. J., Cho, S. H., Shin, D., & Kang, H. S. (2018). Prevalence of Antibiotic Residues and Antibiotic Resistance in Isolates of Chicken Meat in Korea. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 38(5), 1063. <https://doi.org/10.5851/KOSFA.2018.E39>
- Lee, Y. J., Kim, B. K., Lee, B. H., Jo, K. I., Lee, N. K., Chung, C. H., Lee, Y. C. & Lee, J. W. (2008). Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresource Technology*, 99(2), 378-386. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.12.013>
- Lei, X., Piao, X., Ru, Y., Zhang, H., Péron, A., & Zhang, H. (2015). Effect of *Bacillus amyloliquefaciens*-based Direct-fed Microbial on Performance, Nutrient Utilization, Intestinal Morphology and Cecal Microflora in Broiler Chickens. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 28(2), 239–246. <https://doi.org/10.5713/ajas.14.0330>

- León, N., Icochea, E., González, R., y Perales, R. (2012). Nivel de protección de una vacuna intermedia contra la enfermedad de Gumboro en aves de postura. *Revista de Investigaciones Veterinarias*, 23(4), 477-483.
- Li, Y., Zhang, H., Chen, Y., Yang, M., Zhang, L., Lu, Z., Zhou, Y., & Wang, T. (2015). *Bacillus amyloliquefaciens* supplementation alleviates immunological stress in lipopolysaccharide-challenged broilers at early age. *Poultry Science*, 94(7), 1504-1511. <https://doi.org/10.3382/ps/pev124>
- Liu, G., Huang, Y., & Zhai, L. (2018). Impact of nutritional and environmental factors on inflammation, oxidative stress, and the microbiome. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2018/9478630>
- Liu, T., She, R., Wang, K., Bao, H., Zhang, Y., Luo, D., Hu, Y., Ding, Y., Wang, D., & Peng, K. (2008). Effects of Rabbit Sacculus Rotundus Antimicrobial Peptides on the Intestinal Mucosal Immunity in Chickens. *Poultry Science*, 87(2), 250–254. <https://doi.org/10.3382/PS.2007-00353>
- Lu, J., Idris, U., Harmon, B. G., Hofacre, C. L., Maurer, J. J., & Lee, M. D. (2003). Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6816-6824. <https://doi.org/10.1128/aem.69.11.6816-6824.2003>
- Lu, M., Yuan, B., Yan, X., Sun, Z., Lillehoj, H. S., Lee, Y., & Li, C. (2021). *Clostridium perfringens*-induced host-pathogen transcriptional changes in the small intestine of broiler chickens. *Pathogens*, 10(12), 1607. <https://doi.org/10.3390/pathogens10121607>
- Luo, C., Qu, H., Ma, J., Wang, J., Li, C., Yang, C., & Shu, D. (2013). Genome-wide association study of antibody response to Newcastle disease virus in chicken. *BMC genetics*, 14(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-42>
- Marangon, S., & Busani, L. (2006). The use of vaccination in poultry production. *Scientific and Technological Journal*. 26(1), 265-274.
- Medina, T., Arroyo, G., Herrera, C., y Mexicano, L. (2017). *Bacillus subtilis* como probiótico en avicultura: aspectos relevantes en investigaciones recientes. *Abanico veterinario*, 7(3), 14-20. <https://doi.org/10.21929/abavet2017.73.1>
- Meir, R., Krispel, S., Simanov, L., Eliahu, D., Maharat, O., & Pitcovski, J. (2012). Immune responses to mucosal vaccination by the recombinant S1 and N proteins of infectious bronchitis virus. *Viral immunology*, 25(1), 55-62.
- Mengesha, M. (2011). Climate change and the preference of rearing poultry for the demands of protein foods. *Asian Journal of Poultry Science*, 5, 135–143.
- Mier, N y Parra, G. (2016). *Efecto de dos inmunomoduladores comerciales sobre componentes del sistema inmune y parámetros zootécnicos en pollos de engorde de una granja experimental del Ecuador*. [Trabajo de titulación, Universidad de las Américas].

Repositorio UDLA. <https://docplayer.es/74601742-Facultad-de-ingenieria-y-ciencias-agropecuarias.html>

- Mondal, S. P., & Naqi, S. A. (2001). Maternal antibody to infectious bronchitis virus: its role in protection against infection and development of active immunity to vaccine. *Veterinary immunology and immunopathology*, 79(1-2), 31-40.
- Mookiah, S., Sieo, C. C., Ramasamy, K., Abdullah, N. & Ho, Y. W. (2013). Effects of dietary prebiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation concentrations of broiler chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(2), 341-348. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6365>
- Moraes, H. L. S., Salle, C. T. P., Nascimento, V. P. D., Salle, F. O., Rocha, Â. S., De Souza, G. F., Furian, T. Q., & Artêncio, J. O. (2005). Infectious bursal Disease: Evaluation of maternal immunity and protection by vaccination of one-day old chicks against challenge with a very virulent virus isolate. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 7(1), 51-57. <https://doi.org/10.1590/s1516-635x2005000100009>
- Müller, H., Mundt, E., Eterradossi, N., & Islam, M. R. (2012). Current status of vaccines against infectious bursal disease. *Avian pathology*, 41(2), 133-139. <https://doi.org/10.1080/03079457.2012.661403>
- Murcia, H. (2009). Importance of avian immunoglobulins and their immunoassay applications. *Teoria y praxis investigativa*, 19-26.
- Murray, M., Salvatierra, G., Dávila-Barclay, A., Ayzanoa, B., Castillo-Vilcahuaman, C., Huang, M., Pajuelo, M. J., Lescano, A. G., Cabrera, L., Calderón, M., Berg, D. E., Gilman, R. H., & Tsukayama, P. (2021). Market Chickens as a Source of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in a Peri-Urban Community in Lima, Peru. *Frontiers in Microbiology*, 12, 327. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.635871/BIBTEX>
- Mwangi, S., Timmons, J., Fitz-Coy, S., & Parveen, S. (2019). Characterization of *Clostridium perfringens* recovered from broiler chicken affected by necrotic enteritis. *Poultry Science*, 98(1), 128–135. <https://doi.org/10.3382/ps/pey332>
- Oakley, B. B., Lillehoj, H. S., Kogut, M. H., Kim, W. K., Maurer, J. J., Pedroso, A., Lee, M. D., Collett, S. R., Johnson, T. J., & Cox, N. A. (2014). The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS Microbiology Letters*, 360(2), 100–112. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12608>
- Oberländer, B., Failing, K., Jüngst, C. M., Neuhaus, N., Lierz, M., & Palau-Ribes, F. M. (2020). Evaluation of Newcastle Disease antibody titers in backyard poultry in Germany with a vaccination interval of twelve weeks. *PLOS ONE*, 15(8), e0238068. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238068>
- Ogbuewu, I. P., Mabelebele, M., Sebola, N. A. & Mbajjorgu, C. (2022). *Bacillus* Probiotics as Alternatives to In-feed Antibiotics and Its Influence on Growth, Serum Chemistry, Antioxidant Status, Intestinal Histomorphology, and Lesion Scores in Disease-

- Challenged Broiler Chickens. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.876725>
- Paredes, W. (2006). Evaluación de la protección conferida por un programa de vacunación contra la enfermedad de Gumboro en pollos de carne aplicando la fórmula de Deventer. [Trabajo de Grado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. Repositorio UNMSM. <https://bit.ly/3HIsYAP>
- Park, I., Zimmerman, N. P., Smith, A. H., Rehberger, T. G., Lillehoj, E. P. & Lillehoj, H. S. (2020). Dietary Supplementation With *Bacillus subtilis* Direct-Fed Microbials Alters Chicken Intestinal Metabolite Levels. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00123>
- Perozo Marín, F., Nava, J., Mavárez, Y., Arenas, E., Serje, P., & Briceño, M. (2004). Caracterización morfológica de los órganos linfoides en pollos de engorde de la línea Ross criados bajo condiciones de campo en el estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica*, XIV (3), 1-18.
- Petersen, A., Christensen, J. P., Kuhnert, P., Bisgaard, M., & Olsen, J. E. (2006). Vertical transmission of a fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* within an integrated broiler operation. *Veterinary microbiology*, 116(1-3), 120-128.
- Rahman, M., Badruzzaman, A., Monira, N., Mohammad, A., Asmaul, H., & Kazi, M. (2015). Prevalence of Diseases in Commercial Chickens at Sylhet Division of Bangladesh. *International Clinical Pathology Journal*, 1(5), 104-108. <https://doi.org/10.15406/icpj.2015.01.00023>
- Ramlucken, U., Ramchuran, S. O., Moonsamy, G., Jansen van Rensburg, C., Thantsha, M. S. & Lalloo, R. (2021). Production and stability of a multi-strain *Bacillus* based probiotic product for commercial use in poultry. *Biotechnology Reports*, 29. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00575>
- Ramos, E. (2015). Comparación de los títulos de anticuerpos de la vacuna de Newcastle administrado por el método aspersión versus la vía oral en el agua de bebida en pollos broiler en la provincia de Tungurahua cantón Pelileo. [Trabajo de grado, Universidad Técnica de Cotopaxi]. Repositorio UTC. <https://bit.ly/3BDtoEL>
- Rautenschlein, S., Kraemer, C. H., Vanmarcke, J., & Montiel, E. (2005). Protective efficacy of intermediate and intermediate plus infectious bursal disease virus (IBDV) vaccines against very virulent IBDV in commercial broilers. *Avian diseases*, 49(2), 231-237.
- Roh, H. J., Hilt, D. A., Williams, S. M., & Jackwood, M. W. (2013). Evaluation of infectious bronchitis virus Arkansas-type vaccine failure in commercial broilers. *Avian diseases*, 57(2), 248-259.
- Romero, K. (2017). *Enfermedades Infecciosas y Parasitarias presentes en aves en la Provincia de Tungurahua*. [Trabajo de grado, Universidad Técnica de Cotopaxi]. Repositorio UTC. <https://bit.ly/3Tmlbeq>

- Saadaoui, I., Rasheed, R., Aguilar, A., Cherif, M., al Jabri, H., Sayadi, S., & Manning, S. R. (2021). Microalgal-based feed: promising alternative feedstocks for livestock and poultry production. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00593-z>
- Secretaria Nacional de planificación. (2021). *Plan de creación de oportunidades 2021-2025*. Republica del Ecuador.
- Sedeik, M. E., El-Shall, N. A., Awad, A. M., Abd El-Hack, M. E., Alowaimer, A. N., & Swelum, A. A. (2019). Comparative evaluation of HVT-IBD vector, immune complex, and live IBD vaccines against vvIBDV in commercial broiler chickens with high maternally derived antibodies. *Animals*, 9(3), 72.
- Servicio Ecuatoriano de Normalización. (2013). Control microbiológico de los alimentos. *Clostridium perfringens*. Recuento en tubo por siembra en masa. NTE INEN 1529.18. <https://bit.ly/3EjuG8A>
- Servicio Ecuatoriano de Normalización. (2016). Control microbiológico de los alimentos. Detección y Recuento de *Escherichia Coli* presuntiva por la técnica del número más probable. NTE INEN 1529.8. <https://bit.ly/3tHXa79>
- Siregar, J., Umar, S., y Hanafi, N. (2022). Contamination Analysis of *Escherichia coli* on Broiler in Chicken Meat in Traditional Markets of Medan City. *Jurnal Peternakan Integratif*. 10(1), 18-25.
- Soepranianondo, K., Wardhana, D. K., Budiarto, & Diyantoro. (2019). Analysis of bacterial contamination and antibiotic residue of beef meat from city slaughterhouses in East Java Province, Indonesia. *Veterinary World*, 12(2), 243. <https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2019.243-248>
- Song, J., Xiao, K., Ke, Y. L., Jiao, L. F., Hu, C. H., Diao, Q. Y., ... & Zou, X. T. (2014). Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress. *Poultry science*, 93(3), 581-588.
- Sosa-Cossio, D., Hernández, Y. G., Dustet-Mendoza, J. C., García-Curbelo, Y., Martínez-Pérez, M., Sosa-Cejjas, A., & García-Quñones, D. (2020). Efecto del aditivo probiótico *Lactobacillus pentosus* LB-31 en pollos de ceba. *Revista Mvz Cordoba*, 26(1), e2037. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2037>
- Sosnówka, E., & Skomorucha, I. (2021). Effect of supplementation with dried fruit pomace on the performance, egg quality, white blood cells, and lymphatic organs in laying hens. *Poultry Science*, 100(9), 101278. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101278>
- Tabashsum, Z., Peng, M., Alvarado-Martinez, Z., Aditya, A., Bhatti, J., Romo, P. B., Young, A., & Biswas, D. (2020). Competitive reduction of poultry-borne enteric bacterial pathogens in chicken gut with bioactive *Lactobacillus casei*. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-020-73316-5>

- Thompson, D. R., Parreira, V. R., Kulkarni, R. R., & Prescott, J. F. (2006). Live attenuated vaccine-based control of necrotic enteritis of broiler chickens. *Veterinary microbiology*, *113*(1-2), 25-34.
- Thomrongsuwannakij, T., Charoenvisal, N., & Chansiripornchai, N. (2021). Comparison of two attenuated infectious bursal disease vaccine strains focused on safety and antibody response in commercial broilers. *Veterinary world*, *14*(1), 70.
- Tsukahara, T., Inoue, R., Nakayama, K., & Inatomi, T. (2017). Inclusion of *Bacillus amyloliquefaciens* strain TOA5001 in the diet of broilers suppresses the symptoms of coccidiosis by modulating intestinal microbiota. *Animal Science Journal*, *89*(4), 679-687. <https://doi.org/10.1111/asj.12980>
- Van den Bogaard, A. E., Willems, R., London, N., Top, J., & Stobberingh, E. E. (2002). Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *49*(3), 497-505. <https://doi.org/10.1093/JAC/49.3.497>
- Vincent, C., Boerlin, P., Daignault, D., Dozois, C. M., Dutil, L., Galanakis, C., Reid-Smith, R. J., Tellier, P. P., Tellis, P. A., Ziebell, K., & Manges, A. R. (2010). Food Reservoir for *Escherichia coli* Causing Urinary Tract Infections. *Emerging Infectious Diseases*, *16*(1), 88. <https://doi.org/10.3201/EID1601.091118>
- Waite, D. & Taylor, W. (2014). Characterizing the avian gut microbiota: membership, driving influences, and potential function. *Frontiers in Microbiology*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00223>
- Wang, D., Ma, W., She, R., Sun, Q., Liu, Y., Hu, Y., Liu, L., Yang, Y., & Peng, K. (2009). Effects of swine gut antimicrobial peptides on the intestinal mucosal immunity in specific-pathogen-free chickens. *Poultry Science*, *88*(5), 967-974. <https://doi.org/10.3382/PS.2008-00533>
- Watanabe, T., Nishimura, K., Monir, M. M., Takemoto, C., & Hiramatsu, K. (2014). Immunoelectron microscopic observation of chicken Glucagon-Like peptide (GLP)-1-Containing cells in tissues derived from thin section, paraffin block and conventional method. *Journal of Veterinary Medical Science*, *76*(3), 389-394. <https://doi.org/10.1292/jvms.13-0339>
- Wei, B., Cha, S. Y., Zhang, J. F., Shang, K., Park, H. C., Kang, J., Lee, K. J., Kang, M., & Jang, H. K. (2020). Antimicrobial Susceptibility and Association with Toxin Determinants in *Clostridium perfringens* Isolates from Chickens. *Microorganisms* *2020*, Vol. *8*, Page *1825*, *8*(11), 1825. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8111825>
- Wimalaratna, H. M., Richardson, J. F., Lawson, A. J., Elson, R., Meldrum, R., Little, C. L., Maiden, M. C., McCarthy, N. D., & Sheppard, S. K. (2013). Widespread acquisition of antimicrobial resistance among *Campylobacter* isolates from UK retail poultry and

- evidence for clonal expansion of resistant lineages. *BMC Microbiology*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-160/FIGURES/3>
- Xu, M., Li, W., Yang, S., Sun, X., Tarique, I., Yang, P., & Chen, Q. (2020). Morphological characterization of postembryonic development of blood–spleen barrier in duck. *Poultry Science*, 99(8), 3823–3830. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.05.012>
- Xu, W., Wang, H., Liu, L., Miao, Z., Huo, Y., & Zhong, Z. (2021). Prevalence and characterization of *Clostridium perfringens* isolated from different chicken farms in China. *Anaerobe*, 72, 102467. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2021.102467>
- Yang, Y., Ashworth, A. J., Willett, C., Cook, K., Upadhyay, A., Owens, P. R., Ricke, S. C., DeBruyn, J. M., & Moore, P. A. (2019). Review of Antibiotic Resistance, Ecology, Dissemination, and Mitigation in U.S. Broiler Poultry Systems. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02639>
- Zhang, T., Xie, J., Zhang, M., Fu, N., & Zhang, Y. (2016). Effect of a potential probiotics *Lactococcus garvieae* B301 on the growth performance, immune parameters and caecum microflora of broiler chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100(3), 413–421. <https://doi.org/10.1111/jpn.12388>
- Zhao, W., Spatz, S., Zhang, Z., Wen, G., Garcia, M., Zsak, L., & Yu, Q. (2014). Newcastle disease virus (NDV) recombinants expressing infectious laryngotracheitis virus (ILTV) glycoproteins gB and gD protect chickens against ILTV and NDV challenges. *Journal of virology*, 88(15), 8397–8406. <https://doi.org/10.1128/JVI.01321-14>
- Zorman, O., Krapež, U., Slavec, B., Juršič-Cizerl, R., & Poljanec, T. (2011). Field efficacy of different vaccines against infectious bursal disease in broiler flocks. *Acta Veterinaria Hungarica*, 59(3), 385–398. doi:10.1556/avet.2011.016

ANEXOS

Anexo 1. Prueba de Leven para *E. coli* de pollos de engorde

Variable	Día	F.V.	SC	gl	CM	F	p
RABS <i>E. coli</i>	1	Tratamiento	$3.14 \cdot 10^{12}$	3	$1.04 \cdot 10^{12}$	4.81	0.0111
	21	Tratamiento	$1.5 \cdot 10^6$	3	$5 \cdot 10^5$	1.67	0.2061
(UFC/g)	42	Tratamiento	$6.3 \cdot 10^9$	3	$2 \cdot 10^9$	2.63	0.0781

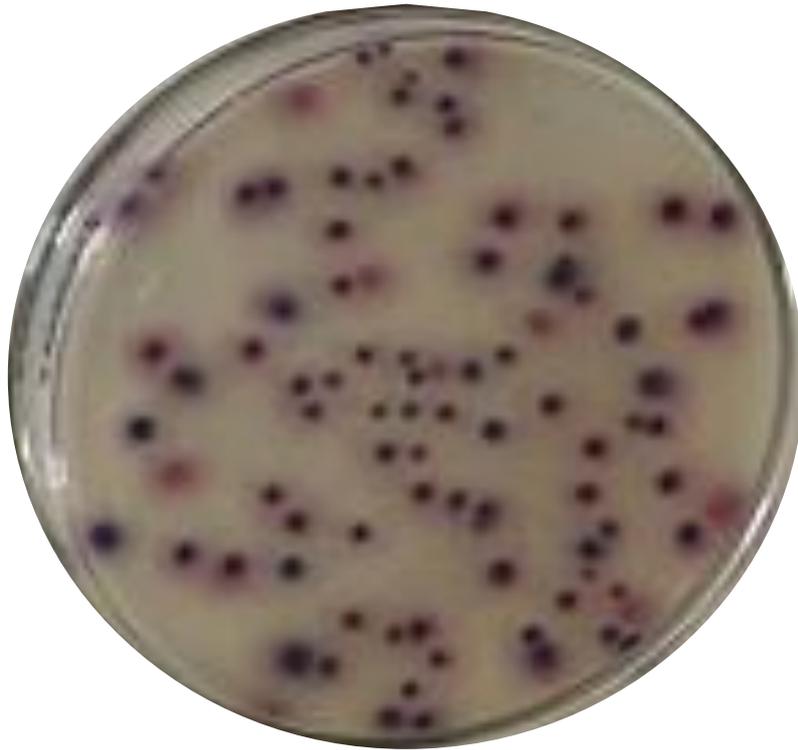
Anexo 2. Prueba de Shapiro wilks para *E. coli* de pollos de engorde

Variable	Día	n	Media (UFC/g)	D.E	W*	p
RDUO <i>E. coli</i>	1	24	$-1.9 \cdot 10^{-11}$	665572.67	0.82	<0.0001
	21	24	$-1.4 \cdot 10^{-12}$	625.54	0.69	<0.0001
(UFC/g)	42	24	$-1.8 \cdot 10^{-12}$	32876.44	0.53	<0.0001

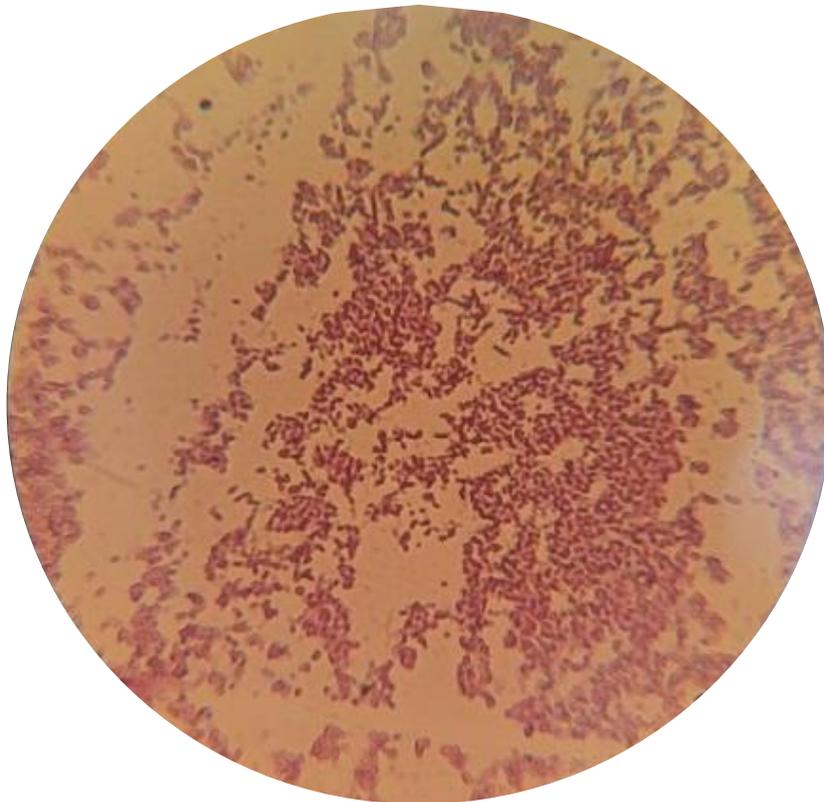
Anexo 3. Kruskal Wallis para *E. coli* de pollos de engorde

Día	Tratamiento	Medianas (UFC/g)	H	p
1	CH	$2.05 \cdot 10^6$	8.01	0.044
	CM	$5 \cdot 10^3$		
	EH	$1.46 \cdot 10^6$		
	EM	$3 \cdot 10^3$		
21	CH	0	1.14	0.439
	CM	0		
	EH	0		
	EM	0		
42	CH	0	9.57	0.009
	CM	0		
	EH	0		
	EM	13500		

Anexo 4. Aislamiento de *E. coli* en medio Chromocult



Anexo 5. Identificación de *E. coli* mediante tinción Gram.



Anexo 6. Prueba de Leven de *C. perfringens* de pollos de engorde

Variable	Día	F.V.	SC	gl	CM	F	p
RABS <i>C. perfringens</i> (UFC/g)	1	Tratamiento	21666.67	3	7222.22	3.1	0.0501
	21	Tratamiento	31250	3	10416.67	1.28	0.3098

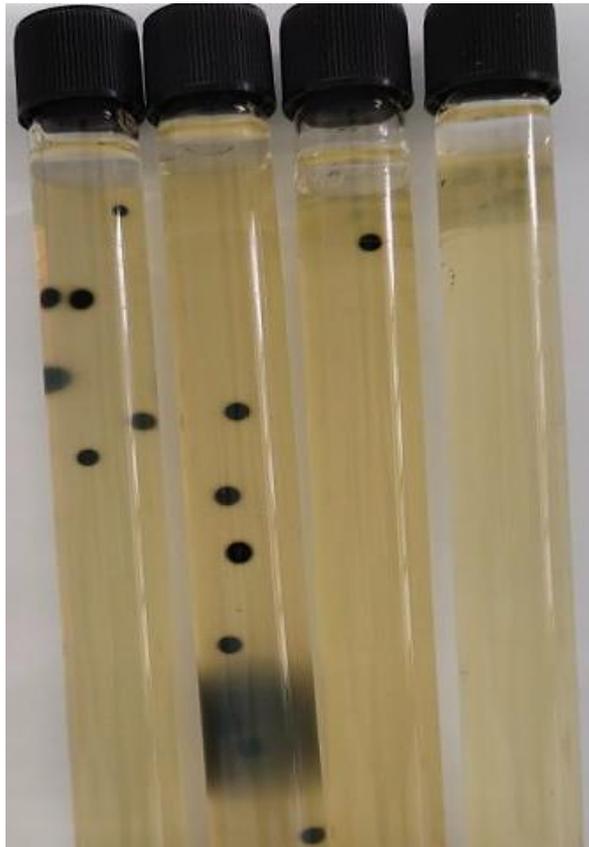
Anexo 7. Prueba de Shapiro wilks de *C. perfringens* de pollos de engorde

Variable	Día	n	Media (UFC/g)	D.E	W*	p
RDUO <i>C. perfringens</i> (UFC/g)	1	24	0	69.16	0.87	0.0090
	21	24	0	103.21	0.75	<0.0001

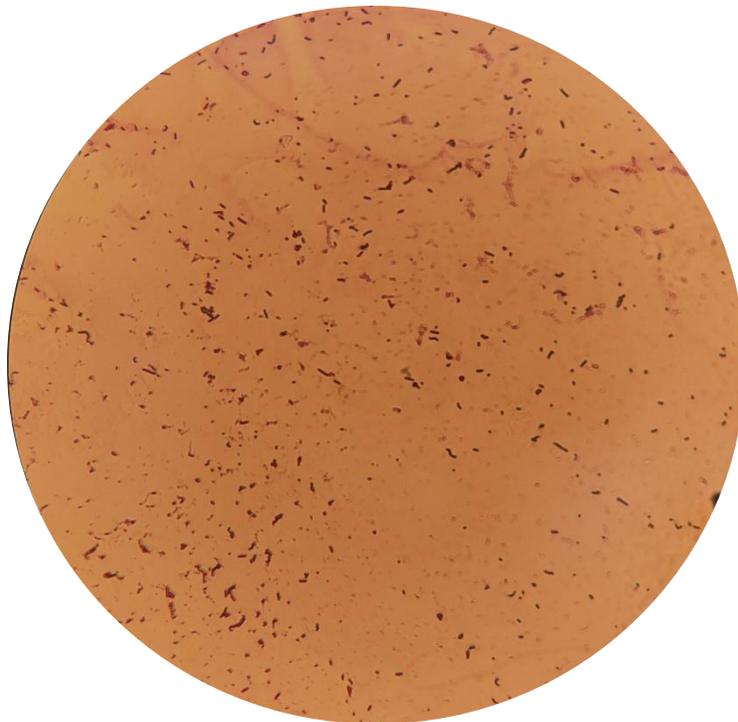
Anexo 8. Kruskal Wallis de *C. perfringens* de pollos de engorde

Día	Tratamiento	Medianas (UFC/g)	H	p
1	CH	100	3.16	0.212
	CM	50		
	EH	0		
	EM	0		
21	CH	0	1.55	0.444
	CM	0		
	EH	0		
	EM	0		

Anexo 9. Aislamiento de *C. perfringens* en medio TSN.



Anexo 10. Identificación de *C. perfringens* mediante tinción Gram.



Anexo 11. Tabla de la prueba de Shapiro Wilks del título de anticuerpos para IBV, IBD y NDV.

Variable	Días	n	Media	D.E	W*	p
Título de anticuerpos contra IBV	1		0.00	619	0.98	0.94
	21	24	0.00	97.71	0.90	0.06
	42		0.00	89.28	0.98	0.97
Título de anticuerpos contra IBD	1		0.00	665	0.91	0.08
	21	24	0.00	43.93	0.99	0.98
	42		0.00	2213	0.89	0.03
Título de anticuerpos contra NDV	1		0.00	663	0.93	0.28
	21	24	0.00	116	0.96	0.64
	42		0.00	53.32	0.98	0.95

Nota: Valores de $p < 0,05$ no cumplen con la normalidad de datos.

Anexo 12. Tabla de la prueba de Levene del título de anticuerpos para IBV, IBD y NDV del día 1 de vida.

Variable	FdV	SC	CM	gl	F	p
Título de anticuerpos contra NDV	Tratamiento	7,27E+04	2,42E+04	3	0.16	0.91
	Error	2,94E+06	1,47E+05	20		
	Total	3,01E+06		23		
Título de anticuerpos contra IBV	Tratamiento	7,44E+05	2,48E+05	3	1.40	0.27
	Error	3,55E+06	1,78E+05	20		
	Total	4,30E+06		23		
Título de anticuerpos contra IBD	Tratamiento	3,72E+06	1,24E+06	3	8.20	<0.01
	Error	3,02E+06	1,51E+05	20		
	Total	6,75E+06		23		

Nota: Lo valores obtenidos en el título de anticuerpos contra IBD no cumplen con la homogeneidad de varianzas ya que se obtienen un valor de ($p < 0,05$).

Anexo 13. Tabla de la prueba de Levene del título de anticuerpos para IBV, IBD y NDV del día 21 de vida.

Variable	FdV	SC	CM	gl	F	p
Título de anticuerpos contra NDV	Tratamiento	4,57E+03	1,52E+03	3	0.29	0.83
	Error	1,06E+05	5,32E+03	20		
	Total	1,11E+05		23		
Título de anticuerpos contra IBV	Tratamiento	9,92E+03	3,31E+03	3	1.14	0.35
	Error	5,83E+04	2,91E+03	20		
	Total	6,82E+04		23		
Título de anticuerpos contra IBD	Tratamiento	2,68E+03	8,92E+02	3	1.22	0.32
	Error	1,46E+04	7,32E+02	20		
	Total	1,73E+04		23		

Nota: Todos los valores cumplen con la homogeneidad de varianzas ($p > 0,05$).

Anexo 14. Tabla de la prueba de Levene del título de anticuerpos para IBV, IBD y NDV del día 42 de vida.

Variable	FdV	SC	CM	gl	F	p
Título de anticuerpos contra NDV	Tratamiento	9,08E+03	3,03E+03	3	4.55	0.01
	Error	1,33E+04	6,64E+02	20		
	Total	2,24E+04		23		
Título de anticuerpos contra IBV	Tratamiento	3,46E+04	1,15E+04	3	5.67	<0.01
	Error	4,06E+04	2,03E+03	20		
	Total	7,52E+04		23		
Título de anticuerpos contra IBD	Tratamiento	5,20E+06	1,73E+06	3	0.55	0.65
	Error	6,27E+07	3,13E+06	20		
	Total	6,79E+07		23		

NOTA: Lo valores obtenidos en el título de anticuerpos contra NDV e IBV no cumplen con la homogeneidad de varianzas ya que se obtienen un valor de ($p < 0,05$).

Anexo 15. Tabla ANOVA del título de anticuerpos para NDV en el día 1, 21 y 42 de vida.

F.V.	gl	1				21				42			
		SC	CM	F	p-valor	SC	CM	F	p-valor	SC	CM	F	p-valor
Modelo	11	1,24E+08	1,13E+07	13,35	0,00	9,94E+06	9,04E+05	34,66	0,00	5,22E+06	4,74E+05	87,02	0,00
Tratamiento	3	1,60E+07	5,33E+06	0,39	0,76	3,15E+06	1,05E+06	1,24	0,36	8,10E+05	2,70E+05	0,49	0,70
Error muestral	8	1,08E+08	1,35E+07	15,99	0,00	6,79E+06	8,49E+05	32,56	0,00	4,41E+06	5,51E+05	101,07	0,00
Error experimental	12	1,01E+07	8,44E+05			3,13E+05	2,61E+04			6,54E+04	5,45E+03		
Total	23	1,34E+08				1,03E+07				5,28E+06			

Nota: No se obtiene diferencias significativas.

Anexo 16. Placas Elisa de la lectura del título de anticuerpos de NDV.

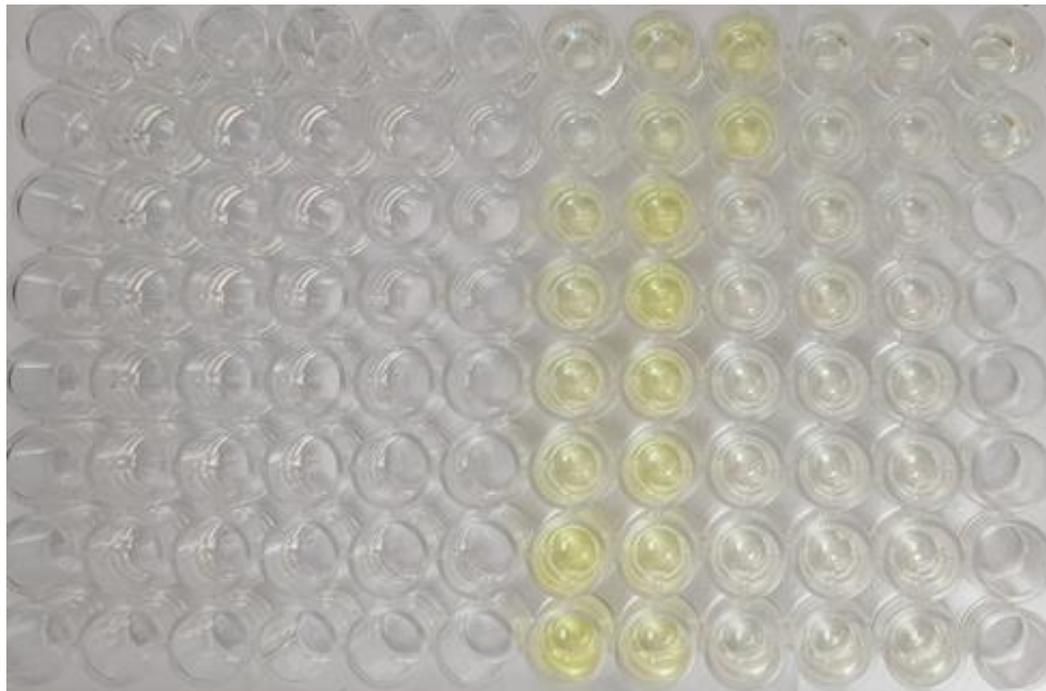


Anexo 17. Tabla ANOVA del título de anticuerpos para IBV en el día 1, 21 y 42 de vida.

F.V.	gl	1				21				42			
		SC	CM	F	p-valor	SC	CM	F	p-valor	SC	CM	F	p-valor
Modelo	11	1,95E+08	1,77E+07	24,09	0,00	1,74E+06	1,58E+05	8,64	0,00	7,52E+05	6,84E+04	4,48	0,01
Tratamiento	3	4,51E+07	1,50E+07	0,80	0,53	1,21E+06	4,03E+05	6,06	0,02	2,78E+04	9,27E+03	0,10	0,96
Error muestral	8	1,50E+08	1,87E+07	25,46	0,00	5,32E+05	6,64E+04	3,63	0,02	7,24E+05	9,06E+04	5,93	0,00
Error experimental	12	8,83E+06	7,36E+05			2,20E+05	1,83E+04			1,83E+05	1,53E+04		
Total	23	2,04E+08				1,96E+06				9,36E+05			

Nota: Se obtienen diferencias significativas en el día 21 de vida.

Anexo 18. Placas Elisa de la lectura del título de anticuerpos de IBV.

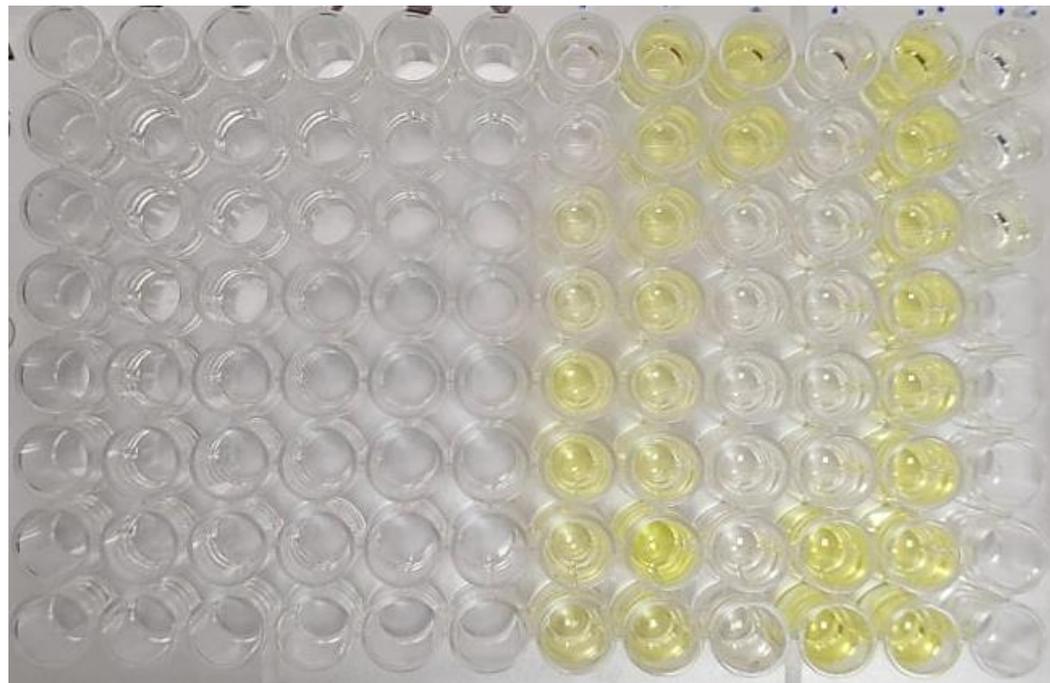


Anexo 19. Tabla ANOVA del título de anticuerpos para IBD en el día 1, 21 y 42 de vida.

F.V.	gl	1				21				42			
		SC	CM	F	p-valor	SC	CM	F	p-valor	SC	CM	F	p-valor
Modelo	11	3,25E+08	2,95E+07	34,78	0,00	1,86E+06	1,69E+05	45,74	0,00	2,65E+08	2,41E+07	2,56	0,06
Tratamiento	3	1,15E+08	3,83E+07	1,46	0,30	2,54E+05	8,47E+04	0,42	0,74	3,89E+07	1,30E+07	0,46	0,72
Error muestral	8	2,10E+08	2,62E+07	30,88	0,00	1,61E+06	2,01E+05	54,31	0,00	2,26E+08	2,82E+07	3,01	0,04
Error experimental	12	1,02E+07	8,49E+05			4,44E+04	3,70E+03			1,13E+08	9,39E+06		
Total	23	3,35E+08				1,91E+06				3,78E+08			

Nota: No se obtiene diferencias significativas.

Anexo 20. Placas Elisa de la lectura del título de anticuerpos de IBD.



Anexo 21. Tabla de la prueba de Shapiro Wilks del índice del bazo, timo y bursa del día 1 de vida.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p-valor
RDUO Ba/PC	12	0	0,13	0,92	0,4236
RDUO Ti/PC	12	0	0,47	0,97	0,9187
RDUO Bu/PC	12	0	0,18	0,89	0,1833

Nota: Todas las variables cumplen con la normalidad

Anexo 22. Tabla de la prueba de Shapiro Wilks del índice del bazo, timo y bursa del día 21 de vida.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p-valor
RDUO Ba/PC	12	0,00	0,17	0,94	0,6367
RDUO Ti/PC	12	0,00	0,7	0,87	0,1130
RDUO Bu/PC	12	0,00	0,32	0,87	0,1173

Nota: Todas las variables cumplen con la normalidad.

Anexo 23. Tabla de la prueba de Shapiro Wilks del índice del bazo, timo y bursa del día 42 de vida.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p-valor
RDUO Ba/PC	12	0,00	0,15	0,96	0,87
RDUO Ti/PC	12	0,00	0,93	0,79	0,01
RDUO Bu/PC	12	0,00	0,08	0,94	0,64

Nota: Todas las variables cumplen con la normalidad.

Anexo 24. Tabla de la prueba de Levene del índice del bazo, timo y bursa del día 1 de vida.

F.V.	gl	Ba/PC				Ti/PC				Bu/PC			
		SC	CM	F	p-valor	SC	CM	F	p-valor	SC	CM	F	p-valor
Modelo	5	0,03	0,01	1,30	0,38	0,65	0,13	8,34	0,01	0,04	0,01	0,54	0,74
Tratamiento	3	0,02	0,01	1,72	0,26	0,39	0,13	8,42	0,01	0,04	0,01	0,9	0,49
Bloque	2	0,01	0,00	0,66	0,55	0,26	0,13	8,21	0,02	0,00	0,00	0,00	1
Error	6	0,02	0,00			0,09	0,02			0,08	0,01		
Total	11	0,05				0,74				0,12			

Nota: El índice del timo no cumple con la homocedasticidad. Ba: Bazo, Ti: Timo, Bu: Bursa y PC: Peso corporal.

Anexo 25. Tabla de la prueba de Levene del índice del bazo, timo y bursa del día 21 de vida.

F.V.	gl	Ba/PC				Ti/PC				Bu/PC			
		SC	CM	F	p-valor	SC	CM	F	p-valor	SC	CM	F	p-valor
Modelo	5	0,04	0,01	0,74	0,62	0,30	0,06	0,32	0,89	0,08	0,02	0,55	0,74
Tratamiento	3	0,03	0,01	1,16	0,40	0,09	0,03	0,16	0,92	0,02	0,01	0,25	0,86
Bloque	2	0,00	0,00	0,10	0,91	0,21	0,11	0,56	0,60	0,06	0,03	1	0,42
Error	6	0,06	0,01			1,16	0,19			0,17	0,03		
Total	11	0,10				1,46				0,24			

NOTA: Todas las variables cumplen la homocedasticidad. Ba: Bazo, Ti: Timo, Bu: Bursa y PC: Peso corporal.

Anexo 26. Tabla de la prueba de Levene del índice del bazo, timo y bursa del día 42 de vida.

F.V.	gl	Ba/PC				Ti/PC				Bu/PC			
		SC	CM	F	p-valor	SC	CM	F	p-valor	SC	CM	F	p-valor
Modelo	5	0,05	0,01	2,95	0,11	0,72	0,14	0,75	0,61	0,01	0,00	2,25	0,18
Tratamiento	3	0,04	0,01	3,65	0,08	0,69	0,23	1,20	0,39	0,01	0,00	3,24	0,10
Bloque	2	0,01	0,01	1,90	0,23	0,03	0,01	0,07	0,93	0,00	0,00	0,78	0,50
Error	6	0,02	0,00			1,15	0,19			0,01	0,00		

Total 11 0,07 1,87 0,02

NOTA: Todas las variables cumplen la homocedasticidad. Ba: Bazo, Ti: Timo, Bu: Bursa y PC: Peso corporal.

Anexo 27. Tabla ANOVA del índice del Bazo en el día 1, 21 y 42 de vida.

F.V.	gl	SC	1			21			42				
			CM	F	p-valor	SC	CM	F	p-valor	SC	CM	F	p-valor
Modelo	5	0,04	0,01	0,27	0,92	0,07	0,01	0,26	0,92	0,08	0,02	0,41	0,83
Tratamiento	3	0,04	0,01	0,38	0,77	0,05	0,02	0,30	0,82	0,06	0,02	0,48	0,71
Error muestral	2	0,01	0,00	0,10	0,91	0,02	0,01	0,21	0,82	0,02	0,01	0,29	0,76
Error experimental	6	0,20	0,03			0,31	0,05			0,24	0,04		
Total	11	0,24				0,38				0,33			

Nota: No se obtiene diferencias significativas.

Anexo 28. Tabla ANOVA del índice del Timo en el día 1, 21 y 42 de vida.

F.V.	gl	SC	1			21			42				
			CM	F	p-valor	SC	CM	F	p-valor	SC	CM	F	p-valor
Modelo	5	0,43	0,09	0,21	0,94	3,22	0,64	0,72	0,63	3,88	0,78	0,49	0,77
Tratamiento	3	0,39	0,13	0,32	0,81	3,08	1,03	1,15	0,40	3,44	1,15	0,73	0,57
Error muestral	2	0,05	0,02	0,06	0,94	0,15	0,07	0,08	0,92	0,44	0,22	0,14	0,87
Error experimental	6	2,42	0,40			5,36	0,89			9,45	1,58		
Total	11	2,86				8,58				13,33			

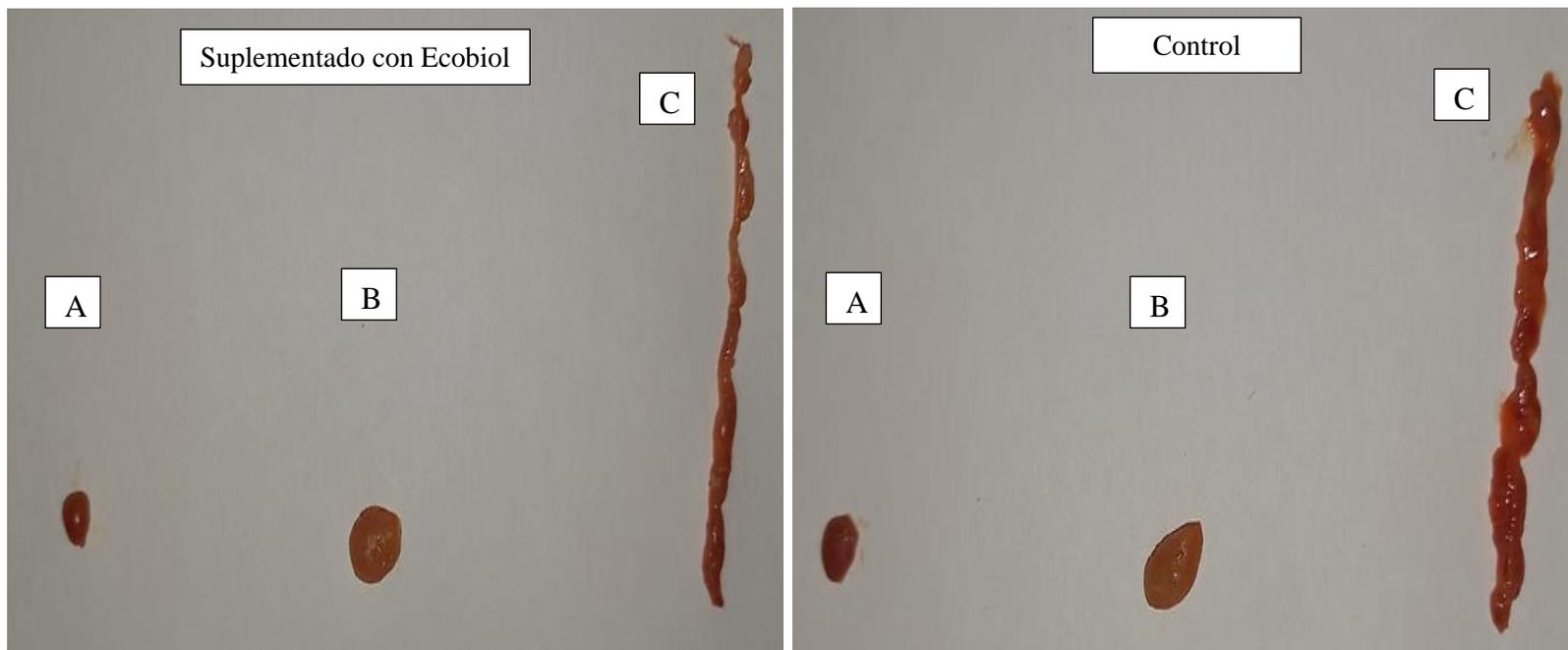
Nota: No se obtiene diferencias significativas.

Anexo 29. Tabla ANOVA del índice del Bursa en el día 1, 21 y 42 de vida.

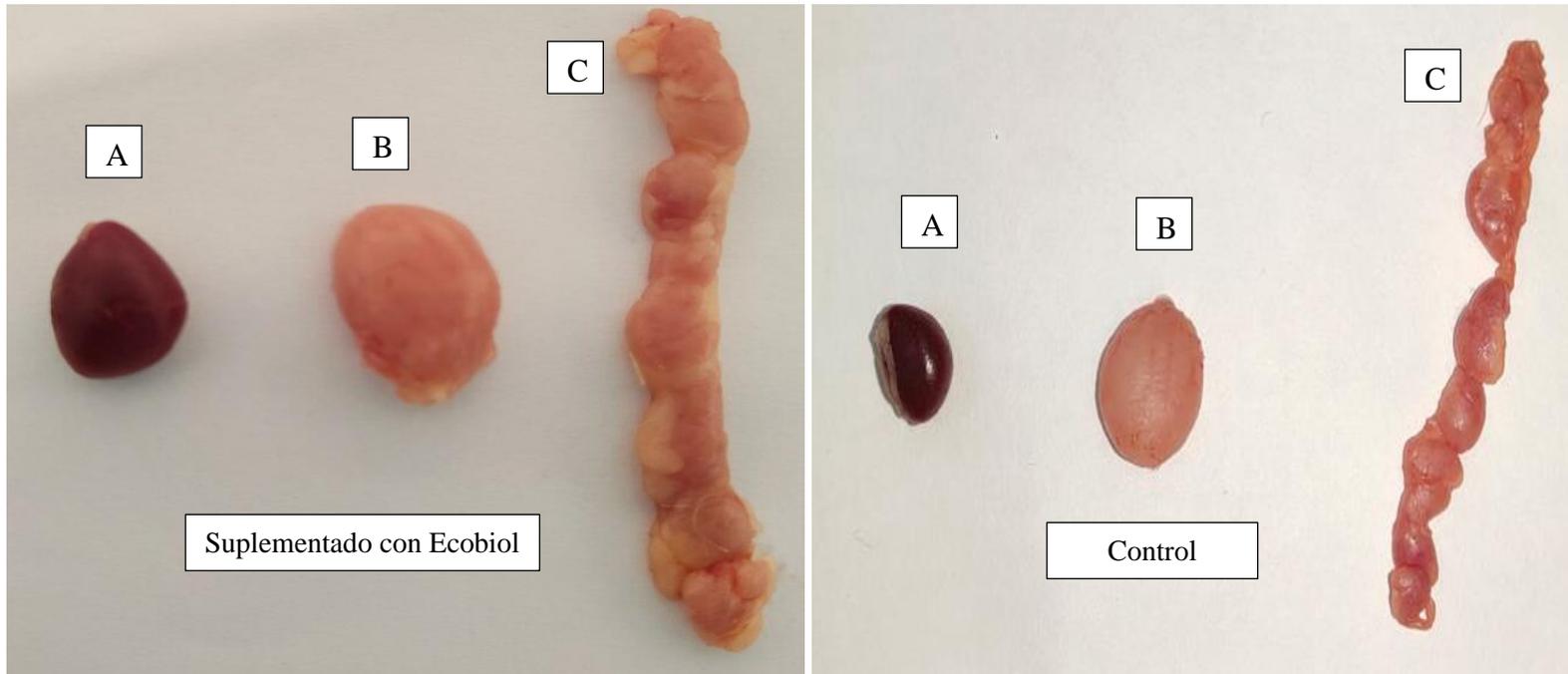
F.V.	gl	1				21				42			
		SC	CM	F	p-valor	SC	CM	F	p-valor	SC	CM	F	p-valor
Modelo	5	0,79	0,16	2,8	0,12	0,28	0,06	0,29	0,90	0,04	0,01	0,65	0,67
Tratamiento	3	0,35	0,12	2,09	0,20	0,04	0,01	0,07	0,98	0,02	0,01	0,61	0,63
Error muestral	2	0,44	0,22	3,86	0,08	0,24	0,12	0,62	0,57	0,02	0,01	0,71	0,53
Error experimental	6	0,34	0,06			1,16	0,19			0,08	0,01		
Total	11	1,13				1,43				0,12			

Nota: No se obtiene diferencias significativas.

Anexo 30. Comparación del tamaño de órganos linfáticos A) bazo, B) bursa C) timo en aves suplementadas con y sin Ecobiol del día 1 de vida.



Anexo 31. Comparación del tamaño de órganos linfáticos A) bazo, B) bursa C) timo en aves suplementadas con y sin Ecobiol del día 21 de vida.



Anexo 32. Comparación del tamaño de órganos linfáticos A) bazo, B) bursa C) timo en aves suplementadas con y sin Ecobiol del día 42 de vida.



