



Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas
Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“EFECTO DE UN ADITIVO FITOGÉNICO SOBRE EL DESEMPEÑO
PRODUCTIVO E INTEGRIDAD INTESTINAL EN POLLOS DE
ENGORDE DESAFIADOS CON *Clostridium perfringens*”

Tesis para optar el Título Profesional de:
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

Presentado por:

Bach. Daniela Elvira Inés Fernández Salazar

Asesora:

Dra. Connie Gallardo Vela

Lima – Perú

2020

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Lima, 27 de mayo de 2020.

Los integrantes del Jurado de tesis:

| |
|---|
| Presidente: Mg. JUAN RAUL ZEGARRA VALENCIA |
| Miembro: M.V. EVA CONSUELO CASAS ASTOS |
| Miembro: M.V. SARA CAROLINA PIZARRO RIVAS |

Se reúnen para evaluar la tesis titulada:

“EFECTO DE UN ADITIVO FITOGÉNICO SOBRE EL DESEMPEÑO PRODUCTIVO E INTEGRIDAD INTESTINAL EN POLLOS DE ENGORDE DESAFIADOS CON *Clostridium perfringens*”

Presentada por el estudiante/bachiller:

- **DANIELA ELVIRA INES FERNANDEZ SALAZAR**

Para optar el Título Profesional de **Médico Veterinario y Zootecnista**

Asesorada por: **Dra. CONNIE GALLARDO VELA**

Luego de haber evaluado el informe final de tesis y evaluado el desempeño de la tesista de la carrera de **Medicina Veterinaria y Zootecnia** en la sustentación, concluyen de manera unánime (x) por mayoría simple () calificar a:

| | | | |
|---|------------------------------|------------------------------|-----------------|
| Tesista: DANIELA ELVIRA INES FERNANDEZ SALAZAR | Nota (en letras): Diecinueve | | |
| Aprobado () | Aprobado - Muy buena () | Aprobado - Sobresaliente (x) | Desaprobado () |

Los miembros del jurado firman en señal de conformidad.



**Mg. JUAN RAUL
 ZEGARRA VALENCIA**
Presidente



Dra. CONNIE GALLARDO VELA
Asesor(a)



**M.V. EVA CONSUELO
 CASAS ASTOS**
Miembro 1



**M.V. SARA CAROLINA
 PIZARRO RIVAS**
Miembro 2

**Efecto de un aditivo fitogénico sobre el desempeño productivo e integridad intestinal
en pollos de engorde desafiados con *Clostridium perfringens***

D. Fernández Salazar, C. Gallardo Vela*

*Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Científica del Sur, Km. 19 de la
Panamericana Sur, Lima 32, Perú*

**Autor correspondiente. Tel: +51 1 610-6400 anexo 1355. E-mail:*

cgallardov@cientifica.edu.pe

Pollos de engorde desafiados con *Clostridium perfringens*

Resumen

Desde la restricción de antibióticos como promotores de crecimiento en la alimentación animal, la industria se encuentra en búsqueda de alternativas de origen natural que puedan reemplazar su uso. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de un aditivo fitogénico sobre el desempeño productivo e integridad intestinal en pollos de engorde desafiados con *Clostridium perfringens*. Se utilizaron 448 pollos de engorde machos (Cobb 500) de 1 a 42 días de edad, los cuales se distribuyeron a través de un diseño completamente al azar en cuatro tratamientos experimentales, con siete repeticiones de 16 pollos cada una. Los tratamientos planteados fueron: aves sin fitogénico y sin desafío con *C. perfringens* (T1: Control Negativo); aves sin fitogénico y con desafío con *C. perfringens* (T2: Control Positivo); aves con fitogénico en dosis preventiva desde el día 1 al 42 de edad y con desafío con *C. perfringens* (Tratamiento T3); y aves con desafío a *C. perfringens* y con fitogénico en dosis de tratamiento por 5 días al observarse signos clínicos de la enfermedad (Tratamiento T4). Todas las aves, excepto las del Control Negativo, fueron desafiadas por tres días consecutivos con *C. perfringens* en el agua de bebida, en los días 19, 20 y 21 de la investigación. Se evaluó el desempeño productivo, la histología intestinal y la cuantificación de UFC/g de *Clostridium perfringens* en duodeno y ciegos. Tras el desafío con *Clostridium perfringens*, se observó un notable descenso de los parámetros productivos en el Control Positivo. Además, en este, la longitud de las vellosidades intestinales fue menor ($p < 0.05$) a los 2 y 8 días post infección con *C. perfringens*. En contraste, en el tratamiento T3, el fitogénico afectó significativamente ($p < 0.05$) el peso de las aves, mejorando la ganancia de peso, el consumo de alimento y el índice de conversión, mejorándolos. Tras el desafío con *C. perfringens*, las aves del T4, las cuales recibieron el aditivo fitogénico en agua de bebida, mejoraron la ganancia de peso diaria. El fitogénico permitió que exista un menor recuento de UFC/g en duodeno y ciego ($p < 0.05$) tras la infección. Por tanto, el uso de un aditivo fitogénico puede mejorar el desempeño productivo, la integridad intestinal y el recuento de *C. perfringens* en pollos de engorde desafiados con *C. perfringens*.

Palabras claves: fitogénico, peso, pollos de engorde, vellosidad intestinal

1. Introducción

La industria avícola constituye una de las principales actividades económicas de los países latinoamericanos. Uno de los mayores desafíos de la producción son las enfermedades entéricas de origen bacteriano, ya que aumentan la morbilidad y la mortalidad en las aves, así como la contaminación de productos derivados para consumo humano. Por ello, resulta necesario aplicar programas adecuados de sanidad y nutrición en las granjas. Una práctica usual fue el uso de antibióticos como promotores de crecimiento. Sin embargo, la restricción mundial de estos en la nutrición animal está en aumento, desde que la Comisión Europea, en el 2006 (Reglamento CE nº 1831/2 003; Huyghebaert *et al.*, 2011), prohíbe el uso de antibióticos que puedan afectar la salud de animales de consumo humano. Esto generó el interés de utilizar alternativas que garanticen el máximo crecimiento de los animales, sin afectar la inocuidad del producto final.

Bacterias patógenas como *Salmonella* sp., algunas *E. coli*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium colinum* y *Campylobacter* spp. poseen serogrupos que producen enterotoxinas capaces de adherirse al epitelio intestinal y causar cambios en el flujo de agua y electrolitos en el intestino delgado, lo que conduce a la lisis y la muerte celular, causando pérdida de agua y diarreas (Bjerrum *et al.*, 2005; Huyghebaert *et al.*, 2011). Por lo tanto, el mantenimiento de la salud intestinal, al permitir que el organismo obtenga la energía y los nutrientes adecuados, es fundamental para la optimización de la expresión genética de las aves y, en consecuencia, el mejor rendimiento productivo. Craven *et al.* (2003) enfatizan la importancia de establecer criterios de manejo que mantengan la integridad funcional de los diferentes tipos de células que componen y caracterizan los órganos del tracto digestivo y sus glándulas anexas, así como el control de enfermedades entéricas que reduzcan la efectividad del proceso digestivo.

La enteritis necrótica es una de las enfermedades entéricas de mayor importancia económica en la avicultura, pues afecta el rendimiento productivo, aumenta la conversión de alimento y reduce la ganancia de peso (Van Der Sluis, 2000). Es causada por *Clostridium perfringens*, una bacteria anaerobia oportunista y grampositiva, que en condiciones normales se encuentra en pequeñas cantidades en el intestino delgado debido al pH ácido y la alta concentración de CO₂, pero también puede ser una de las primeras bacterias en colonizar el ciego del pollo (Adams, 2006). Cuando en el intestino, se establecen cepas patógenas de *C. perfringens* en niveles significativos, se puede evidenciar necrosis intestinal, hemorragia y diarrea; la mortalidad aumenta en aves más severamente afectadas (Bortoluzzi, 2019). Hofacre (1998) clasificó las lesiones macroscópicas en el intestino según su magnitud, donde 0 = ninguno, 1 = leve, 2 = moderado y 3 = marcado. En el caso de la enteritis causada por

Clostridium, en una lesión de grado 3, se observa necrosis, desprendimiento de la mucosa intestinal y contenido sanguinolento.

Diferentes investigaciones en pollos de engorde frente a *C. perfringens* (Díaz Carrasco, 2016) han mostrado que el uso de productos de origen vegetal puede ser una alternativa para promover el equilibrio en la microbiota intestinal de pollos. Estos aditivos se denominan fitogénicos y son sustancias, derivadas de plantas, que tienen principios activos capaces de actuar inhibiendo el crecimiento de microorganismos patógenos en el intestino (Applegate *et al.*, 2010), mejorando la digestibilidad y aprovechamiento de los nutrientes y estimulando la secreción de moco intestinal (Jamroz *et al.*, 2006). El principal componente de los fitogénicos son los polifenoles; su composición y concentración puede variar dependiendo de la parte de la planta utilizada, temporada de cosecha, origen geográfico y técnica de procesamiento (Peralta *et al.*, 2018; Windisch *et al.*, 2008). Sin embargo, en comparación con los antibióticos sintéticos, los fitogénicos son compuestos naturales, de baja toxicidad y libres de residuos en los productos derivados (Hashemi y Davoodi, 2010).

Así, el objetivo de la investigación fue determinar el efecto de la suplementación con un aditivo fitogénico sobre el desempeño productivo e integridad intestinal en pollos de engorde desafiados con *C. perfringens*. Para el estudio, se utilizó un bactericida comercial de origen vegetal (Alquermold Natural de BIOVET S.A. – Cataluña, España), a base de tomillo y ácido cítrico (E-330).

2. Materiales y métodos

El estudio se realizó en la Unidad Avícola Experimental de una granja comercial ubicada en Villa El Salvador, Lima, Perú. La metodología empleada y los procedimientos de investigación fueron aprobados por el Comité Institucional de Ética en Experimentación con Animales y Biodiversidad de la Universidad Científica del Sur (código de registro 218-2018-PRE16) y se siguieron las recomendaciones de acuerdo con los principios de bienestar animal. A las instalaciones utilizadas en este ensayo, se les aplicó un programa sanitario integral de limpieza, desinfección y fumigación.

Animales, diseño experimental y dietas

Para el estudio, se utilizó un total de 448 pollos de engorde machos (Cobb 500) de un día de edad, que fueron vacunados en la incubadora contra la Enfermedad de Newcastle (NC), Bronquitis Infecciosa Aviar (BI) y la Enfermedad de Gumboro (IBD). Todas las aves recibieron un programa de vacunación recomendado para la zona. La alimentación, el manejo y las

condiciones ambientales se mantuvieron similares, siguiendo los protocolos que normalmente se emplean bajo condiciones de granja.

Las aves fueron distribuidas en un Diseño Completamente al Azar en cuatro tratamientos experimentales, con siete repeticiones de 16 pollos cada una. Los tratamientos utilizados fueron: Tratamiento 1 (Control Negativo) – sin fitogénico y sin desafío con *C. perfringens*; Tratamiento 2 (Control Positivo) – sin fitogénico y con desafío con *C. perfringens*; Tratamiento 3 (con aditivo fitogénico como preventivo) – con fitogénico en dosis preventiva desde el día 1 al 42 del experimento (0.5 kg/t de alimento) y con desafío con *C. perfringens*; Tratamiento 4 (con aditivo fitogénico como tratamiento) – con desafío a *C. perfringens* y con fitogénico en dosis de tratamiento (1 g/L de agua) por 5 días al observarse signos clínicos de la enfermedad.

Para la investigación, se elaboró una dieta basal (Tabla 1) para pollos de carne en tres fases nutricionales diferenciadas: inicio (1 a 21 días), crecimiento (22 a 35 días) y acabado (36 a 42 días). La elaboración de las fórmulas se hizo tomando como referencia los requerimientos energéticos y nutricionales de la línea genética de los pollos de engorde (Cobb 500, 2017), y las recomendaciones de Rostagno *et al.* (2017). Las dietas administradas fueron en forma de harina. Para todas las fases de producción, se incluyó un secuestrante de micotoxinas. Todas las dietas fueron isocalóricas e isoproteicas (Tabla 1), y estuvieron libres de APC. Tanto el alimento como el agua de bebida fueron administrados *ad libitum*.

Tras el desafío con *C. perfringens*, el manejo diario de las aves infectadas se realizó exclusivamente por un personal que no tuvo acceso a las aves del Control Negativo, para evitar una posible contaminación cruzada dentro de la Unidad Experimental.

Aditivo fitogénico

Para el estudio, se utilizó un bactericida comercial de origen vegetal (Alquermold Natural de BIOVET S.A. – Cataluña, España), a base de *Thymus vulgaris* (anillo cimenol proveniente del tomillo) y ácido cítrico (E-330).

Tabla 1. Composición centesimal y nutricional de las dietas experimentales* utilizadas en los pollos de engorde del ensayo realizado en Lima-Perú, 2017.

| | Inicio 1 a 14 d | Crecimiento 14 a 28 d | Acabado 28 a 42 d |
|--|--------------------|--------------------------|----------------------|
| INGREDIENTES (%) | % | % | % |
| Maíz amarillo | 57.539 | 62.543 | 64.396 |
| Torta de soya | 34.778 | 29.625 | 27.303 |
| Aceite de soya | 3.745 | 4.103 | 4.937 |
| Fosfato dicálcico | 1.752 | 1.640 | 1.440 |
| Carbonato de calcio | 0.942 | 0.891 | 0.824 |
| Sal común | 0.414 | 0.414 | 0.415 |
| DL-Metionina | 0.273 | 0.238 | 0.199 |
| Lisina HCl | 0.155 | 0.153 | 0.100 |
| Premix vit. y minerales ¹ | 0.120 | 0.120 | 0.120 |
| Cloruro de colina, 60 | 0.100 | 0.100 | 0.100 |
| Treonina | 0.057 | 0.048 | 0.041 |
| Antioxidante | 0.025 | 0.025 | 0.025 |
| Secuestrante | 0.050 | 0.050 | 0.050 |
| Aditivo fitogénico o caulín ² | 0.050 | 0.050 | 0.050 |
| Contenido nutricional analizada³ | | | |
| Energía metabolizable, kcal/kg | 3008 | 3086 | 3157 |
| Proteína total, % | 21.5 | 19.5 | 18.5 |
| Fibra total, % | 3.40 | 3.46 | 3.49 |
| Calcio, % | 0.90 | 0.84 | 0.76 |
| Fósforo disponible, % | 0.45 | 0.42 | 0.38 |
| Sodio, % | 0.18 | 0.18 | 0.18 |

*Tratamientos: T1: Control Negativo; T2: Control Positivo; T3: Tratamiento 3, aves con fitogénico en dosis preventiva desde el día 1 al 42 de edad; T4: Tratamiento 4, aves con fitogénico en dosis de tratamiento tras observarse signos clínicos de la enfermedad.

¹**Premix vitamina y minerales:** Ácido fólico 100 0000 mg/kg, Ac. Pantoténico 1620 mg/kg, Biotina 6100 mg/kg, Cobre 1220 0000 mg/kg, Colina 60 g/kg, Hierro 10.2 g/kg, Yodo 243 mg/kg, Mn 12.6 g/kg, Niacina 5000 mg/kg, Selenio 70 mg/kg, Vit. A 1.290,000 ui/kg, Vit. B1 410000 mg/kg, Vit. B12 1.730,00 mcg/kg, Vit. B2 800 mg/kg, Vit. B6 400,000 mg/kg, Vit. D3 350.000,00 UI/kg, Vit E 2.500 mg/kg, Vit. K 300,000 mg/kg, Zinc 12630 g/kg.

²**Tratamientos:** T1, T2 y T4 se adicionó caulín a 0.5 kg/t de alimento para equilibrar la dieta. El caulín es una arcilla blanca inerte que no es absorbida por los animales y no altera la composición. Solo al Tratamiento 3 (T3), adicionalmente sobre la dieta basal, se agregó el fitogénico en dosis 0.5 kg/t de alimento, desde el día 1 al 42.

³Dietas analizadas en base a materia seca en el Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos. Universidad Nacional Agraria La Molina.

Clostridium perfringens y desafío sanitario

Para el desafío, se obtuvo una cepa de *C. perfringens* tipo A, proveniente del Laboratorio de Patología Aviar de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, la cual fue aislada de aves positivas a *C. perfringens* y genotipificadas mediante PCR múltiple.

El desafío sanitario con *C. perfringens* se realizó en el agua de bebida por tres días consecutivos, en los días 19, 20 y 21 de la investigación. Todas las aves fueron desafiadas, excepto las del Control Negativo. Cada día, el cultivo de *C. perfringens* se disolvió en el agua a dosis de 1×10^8 UFC/ml y se administró vía oral en los bebederos manuales dispuestos. Previo a ello, se retiró el alimento y el agua, 4 y 2 horas antes del desafío, respectivamente, con la finalidad de garantizar que todos los pollos consuman el agua con *C. perfringens*. Las aves consumieron toda el agua en un lapso de 30 minutos. Terminado ese tiempo, se les brindó alimento y agua sin *C. perfringens*.

Desempeño productivo

A los 7, 14, 21, 35 y 42 días de edad, las aves y el alimento sobrante fueron pesados para determinar el peso corporal promedio, la ganancia de peso corporal, el consumo de alimento, el Índice de Conversión Alimenticia y la uniformidad. La mortalidad fue registrada diariamente y evaluada cada semana.

Histopatología intestinal

Para la histopatología, un ave de cada repetición fue seleccionada y sacrificada manualmente a los 18, 23 y 29 días de edad, correspondiendo su evaluación a un día antes del primer desafío, 2 y 8 días después del último desafío, respectivamente.

Las aves fueron sacrificadas por dislocamiento cervical, y todo el intestino fue expuesto para la toma de muestras. Se colectó segmentos del tracto intestinal a nivel de duodeno, yeyuno, íleon, colon y ciego, siendo en total cinco muestras por ave. Se tomaron porciones más o menos cuadradas de entre 0.5 y 0.7 cm de espesor para favorecer la penetración del fijador hasta las zonas centrales. Se procuró extraer tejido lesionado abarcando parte de tejido normal. Los cortes se hicieron en la región media de duodeno y yeyuno, en íleon cerca a los ciegos y en colon y ciego a un mismo nivel. El proceso desde el sacrificio hasta la colecta de las muestras no sobrepasó los 10 minutos. Inmediatamente tras la colecta, los tejidos fueron depositados en recipientes de plástico con cierre hermético, donde se fijaron por inmersión en formol tamponado y diluido al 10%. Tras las 24 horas, se realizó la reducción para la posterior preparación de la lámina histológica.

Se observaron las lesiones al microscopio y posteriormente se realizó la medición de la longitud de cada segmento, analizando altura de vellosidades y profundidad de criptas 10 veces en un campo de 250 μm con un objetivo 10X; luego, se calculó el promedio de las lecturas. Para la altura de las vellosidades, la medición fue desde la región basal, que coincide con la porción superior de las criptas, hasta el vértice; en contraste, las mediciones de la profundidad de las criptas se realizaron desde la base de la región de transición cripta-vellosidad.

Cuantificación de colonias de Clostridium perfringens en duodeno y ciegos

Para los análisis microbiológicos, un ave de cada repetición fue seleccionada y sacrificada manualmente a los 18, 23 y 29 días de edad, evaluando antes del primer desafío, 2 y 8 días después del último desafío, respectivamente. Se seleccionaron dos porciones del intestino por ave, correspondientes al duodeno y ciego. Se realizó un corte de 4 a 5 cm, con 1 a 2 g de contenido, para realizar las diluciones posteriores. Se trabajó en una placa Petri un machacado de la muestra en solución salina a fin de extraer todos los posibles agentes que pudieran encontrarse ese nivel del intestino. Luego, se filtró con una solución salina bufferada en doble o triple gasa a través de un embudo, y se separó el tejido que forma parte del intestino de los agentes que contenga. Se reservó ese filtrado y se realizaron tres diluciones para establecer un posterior recuento: 1 en 10 ml, 1 en 100 ml, 1 en 1000 ml.

El filtrado fue sembrado por incorporación al agar SPS, el cual es un medio de cultivo selectivo para el aislamiento de *Clostridium*. La incorporación consistió en colocar un volumen del filtrado en una placa Petri y agregar 8 ml del agar licuado atemperado (35°C); se homogenizó lentamente y se dejó reposar por 3 minutos. Luego, se agregó una segunda capa de agar y se dejó solidificar.

Las placas fueron dispuestas en jarras de anaerobiosis con capacidad aproximada para 10 placas, se incorporó un Anaerocult de Merck hidratado (comercial) con agua destilada y se cerró inmediatamente. Las jarras se colocaron dentro de la incubadora, a 35°C +/- 2°C por 48 horas. Posteriormente, se realizó el recuento de UFC. Al abrir las jarras, se evidenció, en el medio ámbar, el crecimiento de colonias positivas a *Clostridium* por el precipitado negro producido por la reducción de sulfitos. Por muestra, se seleccionaron 5 colonias presuntivas para *C. perfringens* para las pruebas bioquímicas. Para ello, las colonias se sembraron en un medio de Nitrato-movilidad por 24 horas y Agar gelatina por 48 horas. Se identificó el *C. perfringens* por ser inmóvil y por su capacidad de hidrólisis. Con base a los resultados, se calculó la proporción en porcentaje de *C. perfringens* del recuento inicial de *Clostridium*, lo cual se extrapó. El resultado negativo se expresó como < 10, pues el método detecta un mínimo de 10 bacterias.

Análisis estadístico

Los datos fueron procesados siguiendo el procedimiento GLM del programa estadístico SAS (versión 9.2). Se realizó la prueba de normalidad de los datos (Shapiro-Wilk) y el Análisis de Varianza (ANVA). Posteriormente, al encontrarse significancia del efecto de los tratamientos, se realizó la prueba de comparación de medias de Tukey, considerando un nivel de significancia de 5%. Los datos que no siguieron una distribución normal fueron transformados a valores arcoseno para su análisis.

3. Resultados y discusión

Desempeño productivo

En la Tabla 2, se observan los resultados del desempeño productivo de los pollos de engorde con y sin desafío con *C. perfringens* a los 42 días de edad. Hubo efectos significativos ($p < 0.05$) en los tratamientos experimentales sobre la ganancia de peso, consumo de alimento, índice de conversión alimenticia, uniformidad y mortalidad. El grupo de aves del T3 presentó mayor ganancia de peso y consumo de alimento, así como mejor I.C.A., en comparación con las aves del T2 (Control Positivo). Entre el Control Negativo (T1) y el T3, no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en ganancia de peso, consumo de alimento, I.C.A. o mortalidad, lo cual indica que la adición del fitogénico en dosis preventiva mitigó los efectos del desafío con *Clostridium* sobre el desempeño productivo. El T2 presentó menor uniformidad y mayor mortalidad que los otros tratamientos. El T4, que recibió el fitogénico en agua de bebida tras la observación de signos clínicos, aumentó el consumo de alimento y mejoró la ganancia de peso diaria, en comparación con el Control Positivo; asimismo, logró un menor I.C.A. y redujo la mortalidad. El tratamiento y prevención con el fitogénico (T3 y T4) permitió la recuperación de la uniformidad de los animales.

Así, las propiedades del aditivo fitogénico utilizado, el cual estaba formado por tomillo y ácido cítrico, pudieron contribuir al mejor desempeño productivo después del desafío con *C. perfringens* en las aves que lo recibieron como preventivo desde el primer día de edad. Estos resultados demostrarían que los extractos vegetales del tomillo y del ácido cítrico fueron más eficaces en combinación sobre la absorción de los nutrientes, ya que el anillo de cimenol del tomillo actuaría sinérgicamente con el ácido cítrico (Tesouro y Latasa, 2017), mejorando su efecto acidificante en el intestino. Estos resultados concuerdan con los hallazgos de Feizi *et al.* (2013), quienes indicaron que el tomillo tiene un efecto positivo sobre la salud intestinal, al tener propiedades antibacterianas y antiinflamatorias, lo que favorece el aprovechamiento de los nutrientes, llevando a que las aves tengan mayor ganancia de peso y menor conversión

alimenticia. Por otra parte, Cross *et al.* (2011) evaluó la inclusión del extracto de tomillo de manera individual y combinada con otros extractos naturales en dietas para pollos de engorde de 1 a 42 días de edad, no encontrando efectos significativos del uso del tomillo de manera independiente de otros extractos, pero sí hubo efectos significativos al combinarlo con otros extractos vegetales. Los autores atribuyeron esta respuesta a la sinergia que puede existir entre diferentes extractos, lo que potencializaría su acción en la digestibilidad de los nutrientes. Viola y Vieira (2007) sostienen que los ácidos orgánicos de cadena corta como el ácido cítrico promueven el aumento en el tamaño de las vellosidades intestinales por la proliferación celular en las criptas, y con ello, el incremento de su área de absorción.

Por otro lado, el uso de acidificantes en la dieta de los pollos de engorde promovería la salud intestinal, al favorecer el crecimiento de bacterias benéficas en los diferentes segmentos del intestino, fortaleciendo la microbiota intestinal, lo cual podría contribuir a una mayor absorción de nutrientes, al incrementar la hidrólisis de las proteínas en el tracto intestinal (Dhama *et al.*, 2015). Así, es posible que se haya producido un efecto sinérgico entre el tomillo y el ácido cítrico, favoreciendo su actividad, aumentando la funcionalidad del intestino y los órganos digestivos para la absorción de nutrientes, y mejorando el desempeño productivo en las aves que recibieron el fitogénico desde el día 1 de edad.

Tabla 2. Promedios de desempeño productivo en pollos de engorde con y sin desafío con *Clostridium perfringens* del ensayo realizado en Lima-Perú, 2017.

| Promedios | Tratamientos ¹ | | | | EPM ² | P-Valor |
|--------------------------|---------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|------------------|---------|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | | |
| Peso inicial (g) | 45.86 | 46.14 | 45.71 | 45.29 | 0.3072 | 0.203 |
| Peso final (g) | 3343.9 ^a | 3062.89 ^c | 3355.55 ^a | 3201.79 ^b | 89.343 | 0.033 |
| Ganancia de peso (g) | 3298.04 ^a | 3016.75 ^c | 3309.84 ^a | 3156.50 ^b | 94.437 | 0.014 |
| Consumo de alimento (g) | 5639.65 ^a | 5460.32 ^b | 5726.02 ^a | 5555.44 ^b | 98.57 | <0.001 |
| I.C.A (g/g) ³ | 1.71 ^c | 1.81 ^a | 1.73 ^c | 1.76 ^b | 0.0356 | 0.042 |
| Uniformidad (%) | 80.14 ^b | 74.14 ^c | 86.14 ^a | 81.76 ^b | 3.30 | <0.001 |
| Mortalidad (%) | 2.27 ^a | 9.09 ^c | 3.41 ^a | 4.55 ^b | 1.59 | <0.001 |

¹ **Tratamientos:** T1: Control Negativo; T2: Control Positivo; T3: Tratamiento 3, aves con fitogénico en dosis preventiva desde el día 1 al 42 de edad; T4: Tratamiento 4, aves con fitogénico en dosis de tratamiento tras observarse signos clínicos de la enfermedad.

² EPM: Error Padrón de la Media

³ I.C.A: Índice de Conversión Alimenticia

^{abc} Letras diferentes como superíndice indican diferencias estadísticamente significativas en la prueba de comparación de medias de Tukey, con un nivel de significancia de 5%.

Histología intestinal

En la Tabla 3, se observan los resultados de la longitud de las vellosidades intestinales y la profundidad de las criptas de Lieberkühn. A partir del desafío con *Clostridium*, se observa efectos significativos ($p < 0.05$) en los tratamientos, a nivel de duodeno, yeyuno, íleon y ciego, mas no en colon. En las dos evaluaciones después de concluida la administración del inóculo, el Control Positivo (T2) presentó menor longitud de vellosidades intestinales y mayor profundidad de criptas. El Control Negativo (T1) y el T3 presentaron vellosidades intestinales con mayor altura y criptas con menor profundidad. En las aves del T4, se observan valores intermedios. Estos resultados evidencian que el desafío con *Clostridium perfringens* afectó la estructura del intestino y redujo la superficie de absorción; por tanto, la capacidad de asimilación de nutrientes fue restringida. Porter (1998) indicó que el mayor daño producido por la presencia de *Clostridium* ocurre en la mucosa del yeyuno e íleon. En la última evaluación, el segmento más afectado fue el íleon, seguido de duodeno y yeyuno; a pesar de esto, en las aves del T3, se evidencia la conservación de la longitud de las vellosidades intestinales y una menor profundidad de criptas en dicha sección, estadísticamente comparable con el Control Negativo ($p < 0.05$), lo cual muestra que el fitogénico preservó el desarrollo de las vellosidades, conllevando a una mayor capacidad de digestión y absorción de nutrientes (Fernández-Rubio *et al.*, 2009), lo que finalmente se tradujo en una mayor ganancia de peso.

Para que el crecimiento de las aves se desarrolle adecuadamente, debe haber un equilibrio dinámico entre la mucosa intestinal y el contenido luminal; además, las características estructurales y funcionales de la mucosa se deben conservar dentro del patrón esperado (Hashemi y Davoodi, 2011). Por lo tanto, el mantenimiento de la integridad intestinal es esencial para los procesos eficientes de digestión y absorción, y se deben establecer criterios de gestión para mantener el control de los patógenos entéricos que puedan reducir la efectividad del proceso digestivo (Huyghebaert *et al.*, 2011).

Tabla 3. Promedios de longitud de vellosidades intestinales y profundidad de criptas de Lieberkühn en duodeno, yeyuno, íleon y ciego de pollos de engorde con y sin desafío de *Clostridium perfringens* del ensayo realizado en Lima-Perú, 2017.

| Tratamientos | Preinfección (18 d de edad) | | 2 días post-infección (23 d de edad) | | 8 días post-infección (29 d de edad) | |
|----------------|--------------------------------|--------------|---|-------------------|---|------------------|
| | *LVI (mm) | **PCL (mm) | *LVI (mm) | **PCL (mm) | *LVI (mm) | **PCL (mm) |
| Duodeno | | | | | | |
| T1 | 1171 | 171 | 1171 | 158 ^{bc} | 1186 ^a | 171 |
| T2 | 1176 | 172 | 1114 | 207 ^a | 986 ^b | 193 |
| T3 | 1187 | 171 | 1157 | 143 ^c | 1186 ^a | 170 |
| T4 | 1171 | 172 | 1143 | 171 ^b | 1157 ^{ab} | 186 |
| EPM | 10.26 | 5.5 | 11.09 | 13.68 | 73.26 | 21.11 |
| P-Valor | 0.234 | 0.152 | 0.079 | 0.047 | 0.003 | 0.087 |
| Yeyuno | | | | | | |
| T1 | 1157 | 175 | 1143 ^a | 107 ^c | 1143 ^{ab} | 157 |
| T2 | 1143 | 174 | 900 ^b | 200 ^a | 914 ^c | 243 |
| T3 | 1134 | 179 | 1143 ^a | 129 ^c | 1171 ^a | 165 |
| T4 | 1157 | 176 | 1114 ^a | 171 ^b | 1014 ^b | 184 |
| EPM | 9.78 | 1.87 | 71.73 | 19.68 | 73.25 | 18.79 |
| P-Valor | 0.109 | 0.233 | 0.049 | 0.001 | 0.026 | 0.057 |
| Íleon | | | | | | |
| T1 | 1073 | 177 | 1057 | 157 | 1100 ^a | 100 ^b |
| T2 | 1071 | 177 | 1043 | 171 | 771 ^c | 157 ^a |
| T3 | 1071 | 176 | 1057 | 107 | 1057 ^a | 114 ^b |
| T4 | 1072 | 174 | 1043 | 129 | 957 ^b | 152 ^a |
| EPM | 0.83 | 1.22 | 7 | 16.78 | 86.72 | 14.25 |
| P-Valor | 0.245 | 0.301 | 0.175 | 0.097 | 0.006 | 0.041 |
| Ciego | | | | | | |
| T1 | 643 | 93 | 586 ^a | 60 ^b | 593 | 80 |
| T2 | 600 | 93 | 370 ^c | 100 ^a | 433 | 100 |
| T3 | 614 | 93 | 543 ^a | 93 ^a | 586 | 82 |
| T4 | 629 | 94 | 464 ^b | 100 ^a | 500 | 89 |
| EPM | 16.1 | 0.43 | 42.13 | 6.56 | 32.3 | 7.70 |
| P-Valor | 0.268 | 0.343 | 0.002 | 0.014 | 0.078 | 0.104 |
| Colon | | | | | | |
| T1 | 500 | 99 | 500 | 100 | 529 | 100 |
| T2 | 521 | 98 | 517 | 92 | 408 | 103 |
| T3 | 543 | 98 | 536 | 100 | 575 | 100 |
| T4 | 521 | 96 | 521 | 100 | 529 | 100 |
| EPM | 15.2 | 1.09 | 13.82 | 3.46 | 32.29 | 1.30 |
| P-Valor | 0.311 | 99 | 0.235 | 100 | 0.092 | 100 |

¹Tratamientos: T1: Control Negativo; T2: Control Positivo; T3: Tratamiento 3, aves con fitogénico en dosis preventiva desde el día 1 al 42 de edad; T4: Tratamiento 4, aves con fitogénico en dosis de tratamiento tras observarse signos clínicos de la enfermedad.

²EPM: Error Padrón de la Media

^{abc} Letras diferentes como superíndice indican diferencias estadísticamente significativas en la prueba de comparación de medias de Tukey, con un nivel de significancia de 5%.

*LVI: longitud de vellosidad intestinal en duodeno, yeyuno e íleon y longitud de microvellosidad intestinal a nivel de colon y ciegos.

**PCL: Profundidad de criptas intestinales de Lieberkühn.

Cuantificación de colonias de Clostridium perfringens en duodeno y ciegos

En la Tabla 4, se observa el efecto de los tratamientos sobre la cantidad de UFC/g de *Clostridium* a nivel de duodeno y ciegos. Tras el desafío, hubo diferencias significativas entre los tratamientos sobre la presencia de sulfito-reductores. A los 2 y 8 días post-infección, en el duodeno, se evidenció valores menores a 10 UFC/g de *Clostridium perfringens* ($p > 0.05$); mientras que, a nivel de los ciegos, la cantidad de UFC/g fue significativamente superior en los tratamientos T2 y T4 ($p < 0.05$) y en mayor medida, en el recuento general de *Clostridium* sulfito-reductores. Esto coincide con Adams (2006), que señala que *Clostridium* puede colonizar rápidamente el ciego del pollo. En las aves del T3, el fitogénico en dosis preventiva mantuvo valores bajos de UFC/g en los ciegos tras el desafío; y en el duodeno, presentó cantidades menores a las del Control Positivo. Cross *et al.* (2011) no encontraron efectos significativos del tomillo sobre la carga bacteriana; sin embargo, notaron una reducción numérica de *Salmonella* y *Clostridium perfringens*, en comparación con las aves del grupo control. Khan *et al.* (2012) indicaron que el uso del tomillo como aditivo en la dieta de aves puede disminuir la carga de bacterias patógenas en el intestino, especialmente a nivel del intestino delgado, al tener acción antibacteriana, la cual se ve potencializada al promover la leucopoyesis, elevando los trombocitos de la sangre. En esta investigación, no se observó presencia de *Clostridium perfringens* mayor a 10 UFC/g en duodeno. Así, las cantidades encontradas corresponderían a la cantidad normal de la microbiota intestinal. Estudios reportados por Si *et al.* (2007) manifestaron que la proliferación de *Clostridium perfringens* a nivel intestinal está asociada a factores de estrés y presencia de coccidias, siendo necesario que se presenten ambas condiciones para que exista la proliferación de *Clostridium perfringens* en el intestino.

Adicionalmente, para evaluar la enteritis necrótica en condiciones experimentales, se pudo individualizar la administración del inóculo, aplicándolo directamente al buche de cada ave. Cabe mencionar que, en condiciones de campo, no se determina si existen estos factores estresantes antes de aplicar vacunas contra *C. perfringens*, posiblemente incurriendo en gastos de vacunación sin ser estos necesarios.

Tabla 4. Promedios de *Clostridium* sulfito-reductores y cantidad de *Clostridium perfringens* a nivel de duodeno y ciego en pollos de engorde con y sin desafío de *Clostridium perfringens* del ensayo realizado en Lima-Perú, 2017.

| Tratamientos | Preinfección (18 d de edad) | | 2 días post-infección (23 d de edad) | | 8 días post-infección (29 d de edad) | |
|----------------|---|---|---|--|---|---|
| | <i>Clostridium</i> Sulf. Red. UFC/g | Número <i>Clostridium</i> <i>perfringens</i> UFC/g | <i>Clostridium</i> Sulf. Red. UFC/g | Número <i>Clostridium</i> <i>perfringens</i> UFC/g | <i>Clostridium</i> Sulf. Red. UFC/g | Número <i>Clostridium</i> <i>perfringens</i> UFC/g |
| Duodeno | | | | | | |
| T1 | 540 | < 10 | 589 ^b | < 10 | 567 ^d | < 10 |
| T2 | 538 | < 10 | 780 ^a | < 10 | 7000 ^a | < 10 |
| T3 | 562 | < 10 | 765 ^a | < 10 | 2340 ^c | < 10 |
| T4 | 547 | < 10 | 782 ^a | < 10 | 5000 ^b | < 10 |
| EPM | 8.14 | ---- | 31.22 | ---- | 356.31 | ---- |
| P-Valor | 0.127 | ---- | 0.007 | ---- | <0.001 | ---- |
| Ciegos | | | | | | |
| T1 | 487 | < 10 | 240 ^c | < 10 ^c | 650 ^c | < 10 ^c |
| T2 | 491 | < 10 | 3000 ^a | 400 ^a | 4000 ^a | 200 ^a |
| T3 | 478 | < 10 | 345 ^c | < 10 ^c | 980 ^c | < 10 ^c |
| T4 | 473 | < 10 | 1800 ^b | 90 ^b | 2800 ^b | 90 ^b |
| EPM | 7.34 | ---- | 357.81 | 84.56 | 346.32 | 42.46 |
| P-Valor | 0.206 | ---- | <0.001 | 0.013 | <0.001 | 0.006 |

¹Tratamientos: T1: Control Negativo; T2: Control Positivo; T3: Tratamiento 3, aves con fitogénico en dosis preventiva desde el día 1 al 42 de edad; T4: Tratamiento 4, aves con fitogénico en dosis de tratamiento tras observarse signos clínicos de la enfermedad.

²EPM: Error Padrón de la Media

^{abc} Letras diferentes como superíndice indican diferencias estadísticamente significativas en la prueba de comparación de medias de Tukey, con un nivel de significancia de 5%.

4. Conclusión

El tratamiento con el fitogénico mejoró la ganancia de peso, el consumo de alimento, la conversión alimenticia y la uniformidad, y disminuyó la mortalidad.

El crecimiento de las vellosidades intestinales promovió una mayor absorción de nutrientes, lo que mejoró el desempeño productivo.

El uso de un fitogénico a base de tomillo y ácido cítrico usado como preventivo en la dieta puede ser una estrategia eficiente para mejorar los parámetros productivos y la longitud de las vellosidades intestinales en duodeno, yeyuno e íleon en aves desafiadas con *Clostridium perfringens*.

Bibliografía

Adams, C. A. Nutrition-based health in animal production. (2006). *Nutrition Research Reviews*, 19(1), 79–89.

Applegate, T.J., Klose, V., Steiner, T., Ganner, A., & Schatzmayr, G. (2010). Probiotics and phytogenics for poultry: myth or reality? *Journal of Applied Poultry Research*, 19(2), 194–210. <https://doi.org/10.3382/japr.2010-00168>

Bjerrum, L., Pedersen, K., & Engberg, R. M. (2005). The Influence of Whole Wheat Feeding on Salmonella Infection and Gut Flora Composition in Broilers. *Avian Diseases*, 49(1), 9–15. <https://doi.org/10.1637/7223-061504r>

Bortoluzzi, C., Vieira, B. S., Dorigam, J. C. de P., Menconi, A., Sokale, A., Doranalli, K., & Applegate, T. J. (2019). *Bacillus subtilis* dsm 32315 supplementation attenuates the effects of *Clostridium perfringens* challenge on the growth performance and intestinal microbiota of broiler chickens. *Microorganisms*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030071>

Craven, S. E., Cox, N. A., Bailey, J. S., & Cosby, D. E. (2003). Incidence and Tracking of *Clostridium perfringens* Through an Integrated Broiler Chicken Operation. *Avian Diseases*, 47(3), 707–711. <https://doi.org/10.1637/6010>

Cross, D. E., McDevitt, R. M., Hillman, K., & Acamovic, T. (2007). The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. *British Poultry Science*, 48(4), 496–506. <https://doi.org/10.1080/00071660701463221>

Dhama, K., Latheef, S. K., Mani, S., Samad, H. A., Karthik, K., Tiwari, R., Ullah Khan, R., Alagawany, M., Farag, M., Mahabubul, G., Laudadio, V., & Tufarelli, V. (2015). Multiple beneficial applications and modes of action of herbs in poultry health and production-a review. *International Journal of Pharmacology*, 11(3), 152–176. <https://doi.org/10.3923/ijp.2015.152.176>

Díaz Carrasco, J. M., Redondo, L. M., Redondo, E. A., Domínguez, J. E., Chacana, A. P., & Fernández Miyakawa, M. E. (2016). Use of Plant Extracts as an Effective Manner to Control *Clostridium perfringens* Induced Necrotic Enteritis in Poultry. *Hindawi Publishing Corporation*, 2016, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2016/3278359>

Feizi, A., Bijanzad, P., & Kaboli, K. (2013). Effects of thyme volatile oils on performance of broiler chickens. *Eur J Exp Biol*, 3, 250–254.

Fernández-Rubio, C., Ordóñez, C., Abad-González, J., García-Gallego, A., Honrubia, M. P., Mallo, J. J., & Balaña-Fouce, R. (2009). Butyric acid-based feed additives help protect broiler chickens from *Salmonella enteritidis* infection. *Poultry Science*, *88*(5), 943–948. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00484>

Hashemi, S. R., & Davoodi, H. (2010). Phytoenes as new class of feed additive in poultry industry. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, *9*(17), 2295–2304. <https://doi.org/10.3923/javaa.2010.2295.2304>

Hashemi, S. R., & Davoodi, H. (2011). Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition. *Veterinary Research Communications*, *35*(3), 169–180. <https://doi.org/10.1007/s11259-010-9458-2>

Hofacre, C. L., Froyman, R., George, B., Goodwin, M. A., & Brown, J. (1998). Use of aviguard, virginiamycin, or bacitracin MD against *Clostridium perfringens*-associated necrotizing enteritis. *Journal of Applied Poultry Research*, *7*(4), 412–418. <https://doi.org/10.1093/japr/7.4.412>

Huyghebaert, G., Ducatelle, R., & Immerseel, F. V. (2011). An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Veterinary Journal*, *187*(2), 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.03.003>

Jamroz, D., Wertelecki, T., Houszka, M., & Kamel, C. (2006). Influence of diet type on the inclusion of plant origin active substances on morphological and histochemical characteristics of the stomach and jejunum walls in chicken. *J Anim Physiol Anim Nutr*, *90*, 255–268.

Khan, R. U., Naz, S., Nikousefat, Z., Tufarelli, V., & Laudadio, V. (2012). Thymus vulgaris: Alternative to antibiotics in poultry feed. *World's Poultry Science Journal*, *68*(3):401–408. <https://doi.org/10.1017/S0043933912000517>

Porter, R. E. (1998). Bacterial Enteritides of Poultry. *Poultry Science*, *77*(8), 1159–1165. <https://doi.org/10.1093/ps/77.8.1159>

Si, W., Gong, J., Han, Y., Yu, H., Brennan, J., Zhou, H., & Chen, S. (2007). Quantification of cell proliferation and alpha-toxin gene expression of *Clostridium perfringens* in the development of necrotic enteritis in broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(21), 7110–7113. <https://doi.org/10.1128/AEM.01108-07>

Tesouro, A., & Latasa, C. (2017, Julio). Alquer mold natural reduces the ability of Salmonella to invade intestinal epithelial cells. En D.J. Caldwell (Presidencia), *Poultry Science Association*

106th Annual Meeting [Simposio]. Microbiology and Food Safety, Orlando, FL, USA.
https://poultryscience.org/files/galleries/2017-PSA-Annual_Meeting_Abstracts.pdf

Van der Sluis, W. (2000). Clostridial enteritis a syndrome emerging world wide. *World Poultry*, 16, 5657.

Van der Sluis, W. (2000). Clostridial enteritis is an often underestimated problem. *World Poultry*, 16, 4243.

Viola, E. S., & Vieira, S. L. (2007). Suplementação de acidificantes orgânicos e inorgânicos em dietas para frangos de corte: Desempenho zootécnico e morfologia intestinal. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36(4), 1097–1104. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982007000500016>

Windisch, W., Schedle, K., Plitzner, C., & Kroismayr, A. (2008). Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *Journal of Animal Science*, 86(14), E140–E148. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0459>