AVICULTURA

Este trabajo revisa aspectos que relacionan el papel de la dieta en avicultura con la integridad intestinal, centrándose en los problemas de los PNA y las ventajas de la utilización de enzimas degradadoras de los mismos.

Efectos de la dieta sobre la integridad intestinal

M. Francesch[1]. J. Brufau de Barberà[1]. Ignacio Badiola[2]. Sergio Pérez[1].
[1]IRTA. Dpto. Nutrición Animal. Centro de Mas Bové. Reus.
[2]Centre de Recerca en Sanitat Animal. CreSA (UAB-IRTA).

Los autores consideran la integridad intestinal desde el aspecto de la ecología microbiana del digestivo relacionada con disbacteriosis intestinales, enteritis necrótica y coccidiosis, para finalizar con la morfología y estructura de la pared intestinal.

Durante la década de los noventa la industria avícola europea, y muy especialmente la española, ha sufrido desafíos importantes. Se empezó por un cambio, lento pero progresivo, en la formulación de raciones. De dietas basadas únicamente en maíz-soja se pasó a una mayor flexibilidad en la utilización de ingredientes, incorporando a las raciones de una manera habitual y amplia trigo y cebada y en menor cantidad centeno y avena, cereales con alto contenido en polisacáridos no amiláceos (PNA). Esto fue posible gracias a la disponibilidad en el mercado de enzimas degradadoras de PNA. La década finalizó con un nuevo reto: la suspensión por parte de la Comisión Europea de la mayoría de antibióticos promotores del crecimiento (APC) en la producción animal, por su posible implicación en la aparición de resistencias a ciertos antibióticos utilizados en medicina humana (http://europa.eu.int/comm/food/index_en.html). Las consecuencias asociadas a esta prohibición son tanto negativas como positivas. Por un lado, permite incrementar la confianza de consumir productos de origen animal, muy mermada por las últimas crisis en Europa (BSE, dioxinas, organismos genéticamente modificados, etc.) y va acorde a la tendencia política de produc-

* Ponencia presentada en el XXXVIII Symposium de la Sección Española de la WPSA.

ciones más verdes y seguras (Brufau de Barberà, 2000).

Los principales inconvenientes de esta suspensión son el incremento del coste del control de enfermedades subclínicas y las perdidas de productividad y calidad sanitaria del producto final. Últimamente también se esta replanteando la utilización de algunos coccidiostáticos y se están implementando programas de control de la coccidiosis mediante vacunas.

La combinación de todas estas circunstancias han ayudado a incrementar la incidencia de desórdenes entéricos, pero también han aumentado el interés en conocer los mecanismos de regulación de la microbiota intestinal y su papel en la digestión, así como conocer los efectos de componentes dietarios sobre la integridad y las funciones de pared intestinal.

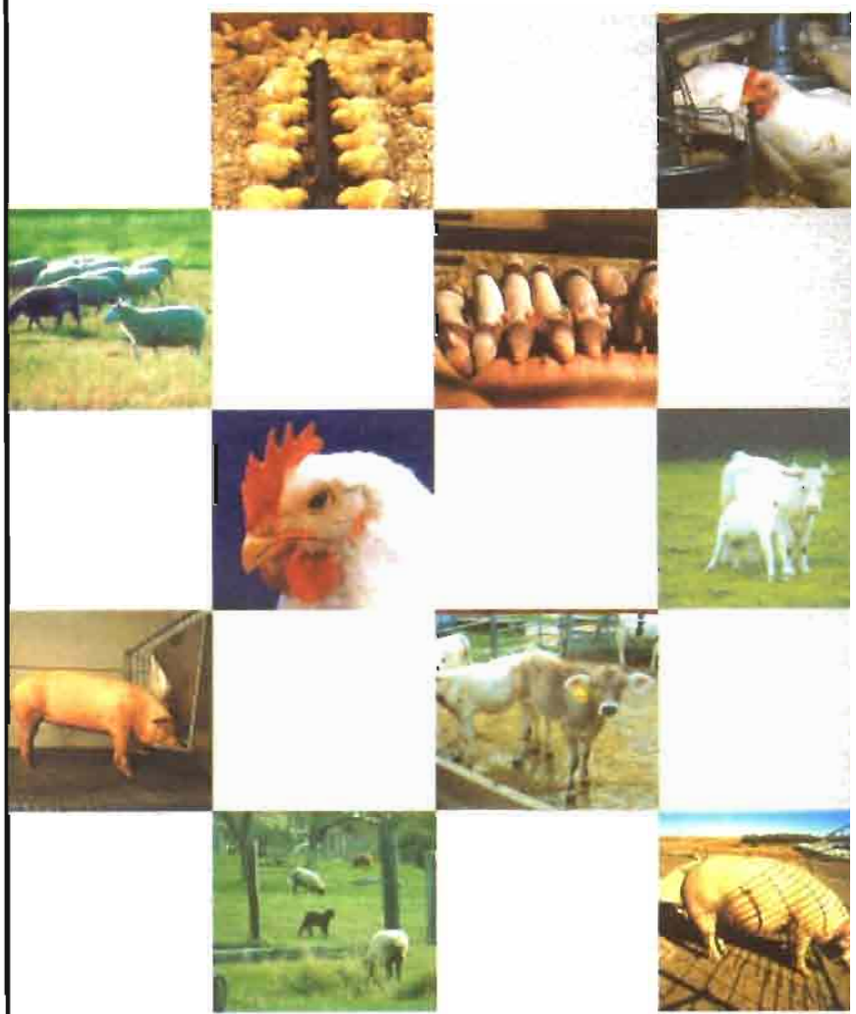
Efectos de los PNA y los enzimas sobre la microflora intestinal

Hoy en día, hay una evidencia clara de que un crecimiento bacteriano excesivo es la causa principal del empeoramiento de la digestión y la absorción de nutrientes en pollos alimentados con dietas ricas en PNA, debido a la viscosidad y/o a la acumulación de nutrientes en el intestino y un posible efecto sobre la morfología y fisiología de la pared intestinal. Además de las perturbaciones digestivas, estos cambios en el número o composición de las bacterias intestinales pueden romper la estabilidad y equilibrio del sistema, causar una disbacteriosis y contribuir a la colonización de microorganismos patógenos. La utilización de enzimas degradadoras de PNA puede ser una herramienta muy importante para modular, a través de la dieta, el ecosistema bacteriano del intestino del ave, cuando se utilizan cereales con alto contenido en PNA.

Es bien conocido que la ingesta de polisacáridos viscosos reduce la velocidad de tránsito de la digesta a través del digestivo (Salih y cols. 1991; Almirall y Esteve-Garcia, 1994). Con un tránsito intestinal más lento, la acción de vaciado del intestino también se reduce, lo que facilita una mayor capacidad multiplicativa de la flora bacteriana y la posibilidad de que la misma colonice tramos superiores del digestivo. La presencia de nutrientes no digeridos ni absorbidos en la parte media del intestino también facilita la proliferación bacteriana, pudiéndose establecer una competencia entre la microflora y el animal en la utilización de los nutrientes de la digesta.

Al comparar la flora intestinal de animales sometidos a distintos tratamientos dietarios se ha podido observar cambios en la cantidad y composición de la comunidad bacteriana. Estos trabajos se han realizado por técnicas tradicionales de cultivo, y sólo ha sido posible el estudio de algunas bacterias o familias de bacterias muy específicas. En general, altos niveles de PNA en la dieta tienden a incrementar el crecimiento de cierto grupo de bacterias saprofitas, mientras que la utilización de enzimas parece ser que ayuda a mantener un equilibrio entre las distintas poblaciones, favoreciendo el crecimiento de las bacterias beneficiosas y frenando la proliferación del grupo de patógenas. Más concretamente, Vahjen y cols. (1998) muestran que

Fosfato Bicálcico 18-24



■ Aporte de fósforo en nutrición animal.

■ Con la tecnología "Phosphoric Feed-Grade" (PFG).

■ Homogeneidad y calidad.

INAGRO
TERUEL

INICIATIVAS AGROINDUSTRIALES DE TERUEL, S.L.

Oficinas Centrales:
Pol. Industrial La Paz, 185.
44195 - TERUEL (Spain)
Tel.: 978 60 26 46 - 978 61 05 35.
Fax: 978 61 05 41

Fábrica:
Pol. Industrial Los Llanos,
calle B, nave 2.
44760 - UTRILLAS (Teruel)

Móvil: 699 96 26 78 e-mail: marques@mixmail.com

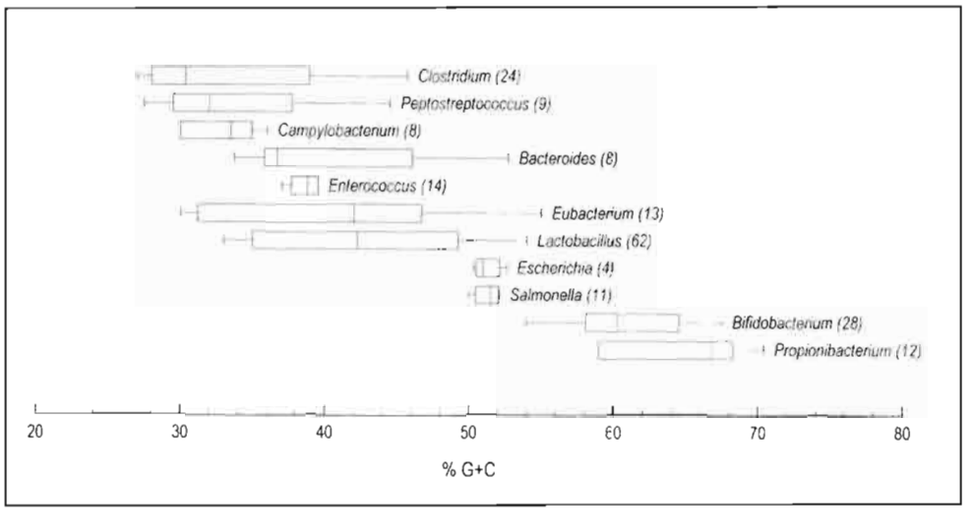


Figura 1. Rangos de contenido de G+C expresado en porcentaje de bacterias presentes en el digestivo del ave. La barra indica el rango, la línea vertical la media para cada género y entre paréntesis el número de especies (extraído de Apajalahti y col., 2001).

la suplementación con xilanasa en una dieta de trigo reduce la proliferación de cocos Gram + y enterobacterias en el lumen, e incrementa el número de lactobacilos adheridos en la pared intestinal. La adición de pectinas de alta metilación y viscosidad incrementan los recuentos de enterococos, bacteroidaceas, *Clostridium* y *E. coli* (Langhout y cols., 1999). Con carboximetilcelulosa, Smits y cols., (1998) observan un incremento de *Clostridium*, lactobacilos y bacteroides. Choct y cols. (1996), al añadir pentosanos a una dieta de maíz observaron un incremento de ácidos grasos volátiles en el íleon, indicador de un aumento de la actividad microbiana. La adición de xilanasa redujo la cantidad de ácidos grasos volátiles al nivel de la dieta control. En una dieta de centeno, la suplementación con xilanasa redujo significativamente los enterococos, enterobacterias y el número total de anaerobios adheridos en el epitelio **(Cuadro I),** pero este efecto era dependiente del tipo de grasa utilizada, mayor con sebo que con aceite de soja (Dänicke y cols., 1999). Resultados obtenidos en nuestro departamento muestran claramente que el tipo de cereal utilizado, la adición o no de enzima y APC, modifica el número de unidades formadoras de colonias de *E. coli* y *Clostridium perfringens* y que existen muchas interacciones entre los tres factores estudiados (Francesch y cols., 1999; Pérez-Moya y cols., 2000).

Actualmente se empieza a disponer de algunos métodos moleculares que permiten calcular proporciones y identificar a la globalidad de los componentes de la microbiota intestinal. Una de estas técnicas se basa en la de extracción del DNA y fraccionamiento del mismo de acuerdo a su porcentaje de guanina+citosina (G+C), mediante un análisis de gradiente con cesium chloride-bisbenzimidazole (Holben y cols., 1988). En general, las bacterias de una misma especie tienen un porcentaje similar de G+C en su DNA, siendo la media de este porcentaje distinto para las diferentes especies de bacterias. El problema de esta técnica es que, en algunos casos, existe solapamiento entre especies de distintas familias en cuanto a porcentaje de G+C, tal como se indica en la **Figura 1,** extraída de Apajalahti y cols. (2001). El mismo grupo fue capaz de observar diferencias en los perfiles de frecuencias relativas de %G+C en animales alimentados con maíz, trigo o centeno (Apajalahti y Bedford, 2000) **(Figura 2).** Las proporciones de G+C podrían coincidir con una reducción del número de *Clostridium* y *Campylobacter* con maíz, con un aumento de lactobacilos y enterococos con centeno y un aumento de propionibacterias y bifidobacterias con trigo.

En nuestro grupo estamos trabajando en la puesta a punto de la técnica T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms) de los genes que codifican el componente 16S del RNA ribosomal descrita por Liu y cols. (1997). Esta técnica permite una aproximación más cercana al estudio de la diversidad bacteriana de un ecosistema al ser una técnica cualitativa, permitiendo diferenciar las bacterias al nivel de especie, y semi-cuantitativa, reflejada por diferencias en la intensidad de las bandas de electroforesis. Los primeros resultados preliminares parecen indicar que existen diferencias cuantificables en los perfiles bacterianos del contenido del

CUADRO I. Efecto del tipo de grasa y de la adición de enzimas en el recuento de bacterias adheridas al epitelio intestinal en pollos alimentados con centeno (Dänicke y cols., 1999).

Segmento del intestino	Tipo de grasa	Xilanasa	Enterobacterias	Cocos Gram +	Enterococos
				cfu/log10	
Yeyuno	Aceite soja	-	6.35	4.62	3.43
		+	4.42	4.06	2.95
	Sebo	-	5.73	5.26	4.01
		+	5.71	4.82	3.88
Ileum	Aceite soja	-	6.13	4.25	3.80
		+	6.13	4.85	4.29
	Sebo	-	6.49	6.35	5.90
		+	5.03	5.06	3.58

CUADRO II. Efectos de la dieta y de la adición de enzimas en los parámetros productivos, lesiones por coccidia y viscosidad de la digesta en pollos broilers con o sin infección de Eimeria (Morgan y Catchpole, 1996).

Dieta	Infección *Eimeria*	GMD (g) 14-21 d	GMD (g) 21-28 d	Lesiones	Viscosidad cps
Maíz/trigo	-	342	408	0	8.6
Maíz/trigo	+	264	441	4.1	4.7
Trigo	-	329	478	0	18.4
Trigo	+	242	396	3.7	6.1
Trigo/enzima	-	347	426	0	6.3
Trigo/enzima	+	244	467	3.9	2.7

Grasas Vegetales

ISO 9002

Aporte de Energía Natural de extracción directa de la Palma, para animales de Alta Producción

MAGNAPAC
Máxima eficiencia by-pass
Energía fácil para todas las especies

HIDROPALM
Perlas energéticas hidrogenadas
Energía directa para altas producciones

BetaPAC
Grasa by-pass específica para cebo
Óptima consistencia de la canal

Vetalgras
La alternativa en grasa líquida
El manejo más eficaz

...y una amplia gama de alternativas

NOREL

NOREL&NATURE
NUTRICIÓN

Jesús Aprendiz, 19, 1º A y B · 28007 Madrid · Tel. +34 915 014 041 Fax +34 915 014 644 · norel@norel.net · www.norel.net

CUADRO III. Efectos de la adición de enzimas (amilasa, xilanasa y proteasa) en los parámetros productivos, lesiones por coccidia y excreción de ooquistes en pollos infectados con Eimeria (Foster y cols., 2002).

Infección Eimeria	-	+	+
Enzimas	-	+	-
Peso vivo a los 26 días (g)	676 [a]	619 [b]	688 [a]
Lesiones			
E. acervulina	0.0 [b]	0.5 [a]	0.5 [a]
E. máxima	0.0 [b]	1.0 [a]	0.5 [b]
E. tenella	0.0 [b]	0.5 [a]	0.5 [a]
Peso intestino	36.0 [a]	31.0 [c]	32.6b [b]
Excreción ooquistes	0.0 [b]	2.9 106 [a]	1.8 106 [b]

íleum de pollos alimentados con maíz o centeno, con o sin adición de enzimas. Mientras que en las muestras procedentes de animales alimentados con maíz hay un número inferior de bacterias pero una mayor biodiversidad, en los animales alimentados con centeno hay menor biodiversidad, pero las especies presentes se hallan a mayor concentración. En los perfiles de los pollos con enzima añadido a la dieta aparece un nuevo grupo de bacterias, que coincide tanto con el maíz como en el centeno. El enzima con centeno aumenta la biodiversidad y disminuye la concentración, mientras que el enzima con maíz disminuye la biodiversidad y aumenta la concentración.

PNA y enzimas en la prevención de enteritis necrótica y coccidiosis

La prohibición de la mayoría de antibióticos promotores del crecimiento pone a la industria avícola actual y futura ante nuevos retos y estrategias para mantener y/o aumentar la productividad y evitar la aparición de problemas patológicos. Históricamente, la utilización de APC ha ayudado a la prevención de la enteritis necrótica causada por *Clostridium perfringens* (Cp). También es conocido que existen ciertos factores que predisponen a una manada a desarrollar una enteritis necrótica: condiciones de estrés en el manejo, ingredientes de la dieta, alteraciones del programa alimentario y coccidiosis subclínica (Shane y cols., 1985).

Anteriormente ya se ha mencionado que la presencia de PNA en la dieta puede aumentar los recuentos de Cp en intestino y ciegos. Además, trabajos más antiguos ya relacionaban directamente el uso de diferentes cereales, trigo (Branton y Reece, 1987), cebada (Hofshagen y Kaldhusdal, 1992) o trigo, cebada, centeno o avena en lugar de maíz (Riddell y Kong, 1992), con un aumento de la mortalidad debido a la enteritis necrótica producida por Cp. Tanto Takeda y cols. (1995) como más recientemente Craven (2000), con inoculación experimental de Cp, muestran claramente que el centeno, y no el maíz, predispone al incremento del número total unidades formadoras de colonias de *Clostridium*, tanto en ciegos como en otras partes del intestino. Por su parte, resultados obtenidos en nuestro departamento (Francesch y cols., 1999) muestran que el uso de cebada favorece el crecimiento de *Clostridrium* en yeyuno e íleon y que el uso de centeno favorece su crecimiento en el ciego. La adición de enzimas redujo en todos los casos esta colonización.

Los ionóforos utilizados como coccidiostáticos también son activos contra bacterias Gram-positivas, y en Suecia, en donde el uso de APC hace mucho tiempo que está suspendido, se consideran importantes para prevenir la colonización de Cp y la aparición de enteritis necrótica (Elwinger y cols., 1998). Teniendo en cuenta la supresión parcial de los APC y de algunos coccidiostá-

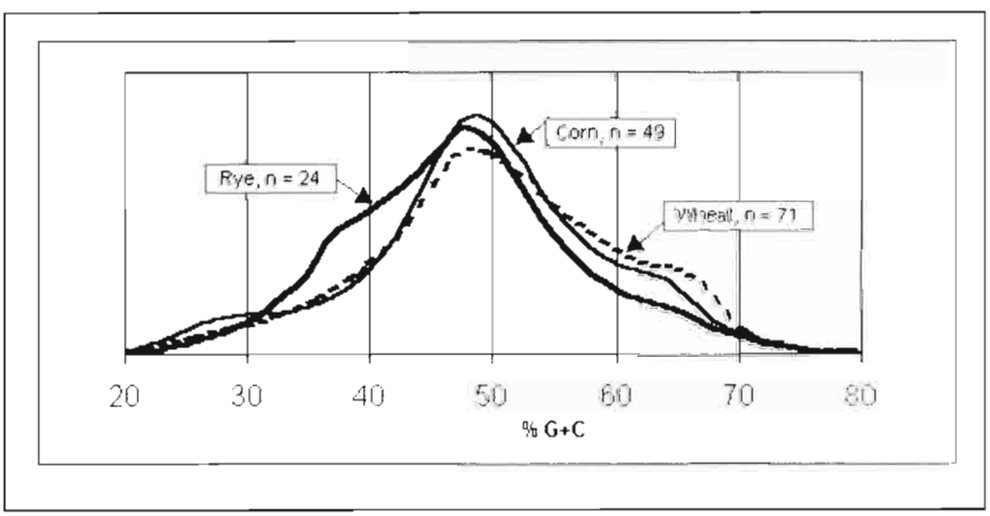


Figura 2. Efectos del cereal en el perfil medio de la comunidad bacteriana en ciegos de pollos broilers alimentados con maíz, trigo o centeno (extraído de Apajalahti y Bedford, 2000).

CUADRO IV. Efecto de la adición de pectina de alta (HCM) o baja (LCM) metilación en los parámetros productivos y la clasificación morfológica y medidas de las vellosidades de la mucosa del intestino delgado (Langhout y cols., 1999).

	Maíz	Maíz + 30 g HCM/kg	Maíz + 30 g LCM/kg	ES
Peso 21 días	766 [a]	618 [b]	750 [a]	16.3
Consumo diario	47.4 [a]	52.4 [a]	47.8 [a]	1.19
Índice de conversión	1.301 [b]	1.782 [a]	1.338 [b]	0.016
Vellosidades:				
Disposición en zig-zag	62 [a]	5 [b]	50 [a]	8.9
Forma vellosidades;				
Lengua	15 [b]	43 [a]	12 [b]	4.8
Hoja	43	47	45	5.8
Cresta	40 [a]	2 [b]	36 [a]	6.4
Enrevesado	3	9	7	3.8
Medida vellosidades:				
Longitud vellosidad mm	844	771	870	38.8
Profundidad cripta mm	133	129	131	7.6
Nº células goblet /100 vellosidades	29 [b]	48 [a]	43 [a]	4.27

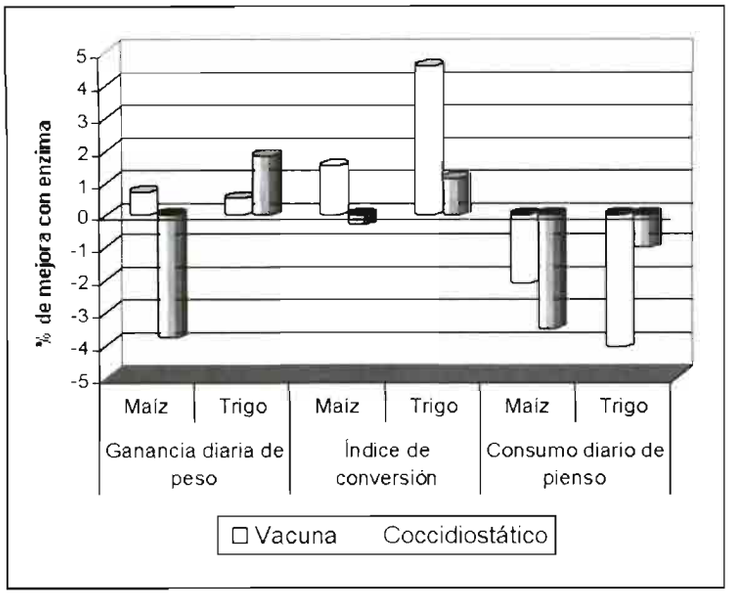


Figura 3. Mejoras en parámetros productivos con la adición de enzima en animales alimentados con maíz o trigo, con programa vacunal de coccidiosis o programa químico.

ticos, del incremento de la demanda de alimentos orgánicos y de la posibilidad de usar rotacionalmente programas vacunales para el control de la coccidiosis, los pollos alimentados con dietas tipo europeo, con alto contenido en PNA, pueden ser más susceptibles a padecer enteritis necrótica. En estas condiciones, sería posible que la utilización de enzimas ayudara a mantener el equilibrio de la microbiota y en ciertos aspectos reducir un poco la agresividad de infecciones por coccidia y las consecuentes perdidas.

Se ha descrito que la viscosidad de la digesta disminuye en animales inoculados con *Eimeria*, tanto en animales alimentados con trigo (Morgan y Cathpole, 1996) como con la adición de carboximetilcelulosa de alta viscosidad a una dieta maíz-soja (Wladenstedt y cols., 2000). Una posible causa de la reducción de la viscosidad de la digesta en los animales con coccidiosis podría ser los cambios osmóticos y de absorción en el tracto digestivo producido por el parásito, o cambios en el consumo de agua.

En cuanto al papel que pueden desarrollar los enzimas en procesos infecciosos por coccidias, hay pocos resultados disponibles y algunos de ellos son contradictorios. Morgan y Catchpole (1996) encontraron un mayor efecto de los enzimas en animales infectados que en animales no infectados **(Cuadro II).** Por otra parte, las mermas de productividad debido a la infección fueron mucho menores en los animales con enzima añadido al pienso. El enzima redujo la viscosidad tanto en los animales infectados como en los no infectados. Mas recientemente, Foster y cols. (2002) señalan que la adición de enzima en dietas con alto contenido en trigo puede ser negativo en animales infectados por coccidia **(Cuadro III)**. Al contrario, un trabajo reciente realizado en nuestro departamento en colaboración con Shering Plough, muestra que la adición de xilanasa a una dieta de trigo mejora significativamente el rendimiento productivo, de una manera más importante en los animales vacunados de coccidiosis que en animales con coccidiostático. La adición de xilanasa a la dieta de maíz no produjo ningún efecto o en algún caso un efecto negativo, especialmente en los animales con coccidiostático **(Figura 3).**

Morfología de la pared intestinal

Mantener la integridad de la mucosa intestinal es primordial para favorecer la absorción de nutrientes. La forma y disposición de las vellosidades intestinales incrementa por una parte el área de absorción y facilita el flujo de la digesta.

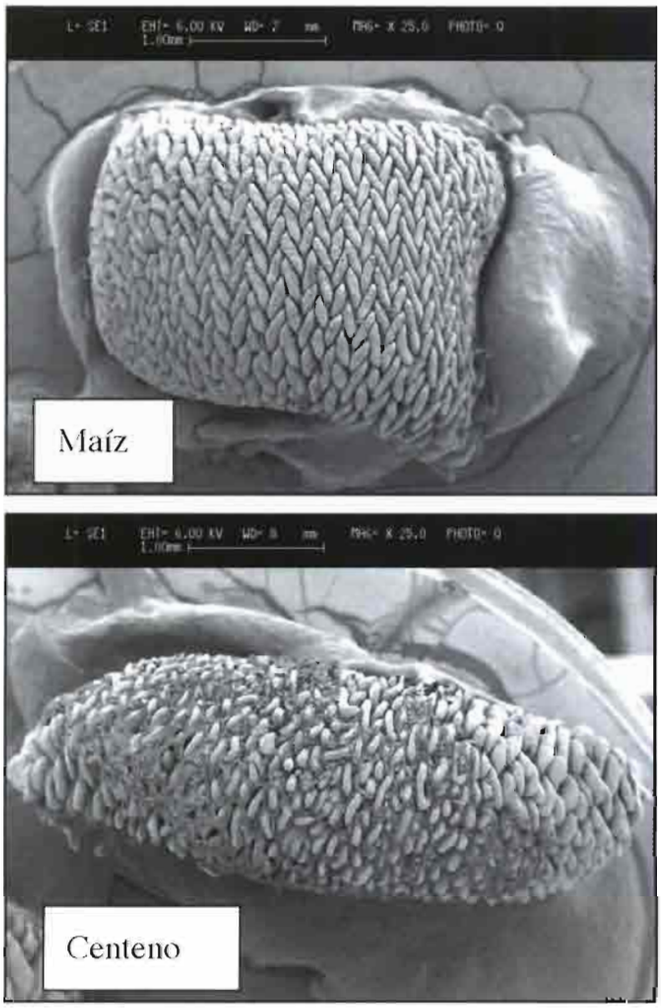


Figura 4. Epitelio intestinal del íleum de pollos alimentados con maíz o centeno. Microscopia electrónica de rastreo (x62).

La forma de las vellosidades cambia con la edad del animal, siendo primordialmente en forma de dedo en el primer día de vida, ensanchándose primero a forma de lengua y hoja para pasar al final a forma de cresta (van Leeuwen, 2002). Por otra parte el número de vellosidades disminuye con la edad, especialmente durante los 10 primeros días de vida (Yamauchi y Isshiki, 1991), incrementando la superficie por el alargamiento de las mismas y ensanchamiento. Se cree que la disposición de las vellosidades siguiendo un patrón regular transversal en zig-zag es beneficiosa para la absorción de los nutrientes, al retardar el fluir de la capa exterior de la digesta e incrementar su contacto con el epitelio. Al contrario, una disposición de las vellosidades en paralelo o de forma enrevesada podría representar cierto impedimento a la absorción.

Con relación a la viscosidad, microflora y morfología intestinal, se conoce que el incremento en la actividad microbiana en el tracto digestivo con dietas de alta viscosidad puede alterar las funciones secretivas y la morfología e histología del intestino reduciendo la superficie útil y la capacidad de absorción de nutrientes. Sakata (1987) observó en ratas, una relación directa entre el incremento de la actividad bacteriana y cambios en la morfología de la pared intestinal. Así mismo, Viveros y cols. (1994) encontraron una reducción de la longitud y anchura de las vellosidades, atrofia de las vellosidades y un aumento en el número y tamaño de células de goblet con el uso de cebada, en comparación con el uso de maíz, diferencias que no se observaron con la utilización de enzimas. Con segundillas de trigo, Jaroni y cols. (1999) obtuvieron resultados similares. Langhout et al. (1999), muestran claramente que la adición de pectinas solubles en agua de alta metilación en una dieta de maíz, reduce el porcentaje de área con vellosidades dispuestas en un patrón ordenado en zig.-zag, aumentando las áreas de disposición irregular. También observaron modificaciones en la clasificación morfológica de las vellosidades intestinales, aumentando el número de vellosidades en forma de lengua y disminuyendo las de forma de cresta. El número de células de goblet o calciformes, secretoras de mucina, también se vio incrementado con la adición de pectinas. Todos estos cambios estaban asociados a una reducción de los parámetros productivos **(Cuadro IV).** Más recientemente, van Leeuwen (2002) estudiando el efecto de factores dietarios y la infección con *Salmonella typhymurium* sobre la morfología de la mucosa intestinal llegan a los mismos resultados. La adición de pectina decrece el área con las vellosidades dispuestas en zig-zag y aumenta el área con disposición irregular **(Cuadro V).** La infección con *Salmonella* potencia los efectos negativos de la pectina sobre los parámetros productivos y la morfología de la mucosa.

Con relación al efecto de los enzimas sobre la morfología de la mucosa intestinal, resultados de nuestro departamento muestran que pollos alimentados con maíz presentan vellosidades más largas que pollos alimentados con centeno. La adición de enzimas reduce la longitud de las vellosidades en los animales alimentados con maíz y la incrementa en los animales alimentados con centeno. La presencia de mucina en la superficie epitelial es superior en los animales alimentados con centeno y la adición de enzimas reduce la presencia de mucina tanto en pollos alimentados con centeno como en pollos alimentados con maíz **(Figura 4).**

CUADRO V. Efectos de la adición de pectina de alta metilación con o sin infección de *Salmonella typhimurium* en los parámetros productivos y en la disposición y forma de las vellosidades de la mucosa del intestino delgado (Van Leeuwen, 2002).

Pectina (30 g/kg)	-	-	+	+
Infección *Salmonella*	-	+	-	+
Peso 21 días	798 [a]	795 [a]	598 [b]	599 [b]
Consumo diario 7-21 d (g)	51 [ab]	50 [a]	51 [ab]	53 [b]
Índice de conversión	1.35 [a]	1.31 [a]	1.78 [b]	1.84 [b]
(%) Área disposición en zig-zag	40 [d]	28 [bc]	18 [ab]	4 [a]
(%) Área disposición irregular	1 [a]	2 [ab]	20 [b]	27 [c]
(%) Área con vellosidades tipo:				
Lengua	52 [b]	37 [a]	39 [a]	34 [a]
Hoja	22 [b]	31 [c]	26 [b]	33 [c]
Cresta	26 [a]	32 [b]	35 [c]	33 [b]

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a la financiación recibida del INIA, dentro de la Acción "Recursos y Tecnologías Agrarias", enmarcada en el Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (Proyecto RTA01-086). ●