

---

## MORFOLOGIA DE L'INTESTÍ DE POLLASTRES INOCULATS AMB *SALMONELLA* ENTERITIDIS I ALIMENTATS AMB UNA DIETA SUPLEMENTADA AMB UN PRODUCTE RIC EN $\beta$ -GALACTOMANNANS (SALMOSAN®)

---

**Maria Teresa Brufau, Ruth Ferrer i Raquel Martín-Venegas**

Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona

REBUT: 15 d'abril de 2013 - ACCEPTAT: 20 de novembre de 2013

### RESUM

El consum de productes avícoles contaminats amb *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*Salmonella*) és la principal causa de salmonel·losi en humans. Per tal de disminuir l'elevada prevalença de *Salmonella* en animals de granja, s'està estudiant la inclusió de  $\beta$ -galactomannans en les dietes. L'objectiu d'aquest treball ha estat determinar l'efecte del Salmosan® (1 g/kg, suplement nutricional procedent de la goma de garrofi rica en  $\beta$ -galactomannans) sobre la morfologia de l'epiteli intestinal de l'ili i de la tonsil·la cecal de pollastres inoculats amb *Salmonella* per microscòpia electrònica de rastreig. Els resultats s'han comparat amb els obtinguts amb les parets cel·lulars de *Saccharomyces cerevisiae* (0,5 g/kg) amb activitat prebiòtica demostrada i amb l'antibiòtic colistina (0,5 g/kg del dia 5 a l'11). Les imatges demostren que el Salmosan® i les parets de *Saccharomyces cerevisiae* redueixen la presència de bacteris adherits a l'epiteli i mantenen, a diferència de la colistina, la integritat de la mucosa. També s'ha observat un increment de les cèl·lules caliciformes i la conseqüent producció de moc. Així, doncs, la utilització de Salmosan® constitueix una bona estratègia per tal de controlar i prevenir la contaminació per *Salmonella* en productes avícoles destinats al consum humà.

PARAULES CLAU: goma de garrofi, microscòpia electrònica de rastreig, cèl·lules caliciformes, *Saccharomyces cerevisiae*, colistina.

Correspondència: Maria Teresa Brufau. Av. de Joan XXIII, s/n. 08028 Barcelona. A/e: [teresabrufau@gmail.com](mailto:teresabrufau@gmail.com).

**MORFOLOGÍA DEL INTESTINO DE POLLOS INOCULADOS  
CON *SALMONELLA* ENTERITIDIS Y ALIMENTADOS CON UNA DIETA  
SUPLEMENTADA CON UN PRODUCTO RICO EN  $\beta$ -GALACTOMANANOS  
(SALMOSAN®)**

**RESUMEN**

El consumo de productos avícolas contaminados con *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*Salmonella*) es la principal causa de salmonelosis en humanos. Para disminuir la elevada prevalencia de *Salmonella* en animales de granja, se está estudiando la inclusión de  $\beta$ -galactomananos en las dietas. El objetivo de este trabajo ha sido determinar el efecto de Salmosan® (1 g/kg, suplemento nutricional procedente de la goma de garrofín rica en  $\beta$ -galactomananos) sobre la morfología del epitelio intestinal del íleon y de la amígdala cecal de pollos inoculados con *Salmonella* por microscopía electrónica de barrido. Los resultados se han comparado a los obtenidos con las paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* (0,5 g/kg) con actividad prebiótica demostrada, y con el antibiótico colistina (0,5 g/kg del día 5 al 11). Las imágenes demuestran que el Salmosan® y las paredes de *Saccharomyces cerevisiae* reducen la presencia de bacterias adheridas al epitelio y mantienen, a diferencia de la colistina, la integridad de la mucosa. También se ha observado un incremento de las células caliciformes y la consecuente producción de moco. Así pues, la utilización de Salmosan® constituye una buena estrategia para controlar y prevenir la contaminación por *Salmonella* en productos avícolas destinados al consumo humano.

PALABRAS CLAVE: goma de garrofín, microscopía electrónica de barrido, células caliciformes, *Saccharomyces cerevisiae*, colistina.

**INTESTINAL MORPHOLOGY OF CHICKENS INOCULATED  
WITH *SALMONELLA* ENTERITIDIS AND FED A DIET WITH A  
 $\beta$ -GALACTOMANNAN-RICH SUPPLEMENT (SALMOSAN®)**

**ABSTRACT**

The consumption of poultry products contaminated with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*Salmonella*) is the leading cause of salmonellosis in humans. In order to reduce the high prevalence of *Salmonella* in farm animals, the addition of  $\beta$ -galactomannans to their diet is under study. The aim of this research was to determine by scanning electron microscopy the effect of Salmosan® (1 g/kg), a nutritional supplement produced from  $\beta$ -galactomannan-rich locust bean gum, on the morphology of the intestinal

## Morfologia de l'intestí de pollastres inoculats amb *Salmonella* Enteritidis

epithelium of the ileum and the caecal tonsil in chickens inoculated with *Salmonella*. The results were compared to those obtained with *Saccharomyces cerevisiae* cell walls (0.5 g/kg) possessing proven prebiotic activity, and with the antibiotic colistin (0.5 g/kg, from day 5 to 11). The images show that Salmosan® and *Saccharomyces cerevisiae* cell walls reduce the presence of bacteria attached to the epithelium and maintain, unlike colistin, the integrity of the mucous membrane. We also observed an increase in goblet cells and the resulting production of mucus. Thus, the use of Salmosan® is a good strategy to control and prevent *Salmonella* contamination in poultry products intended for human consumption.

KEYWORDS: locust bean gum, scanning electron microscopy, goblet cells, *Saccharomyces cerevisiae*, colistin.

### 1. INTRODUCCIÓ

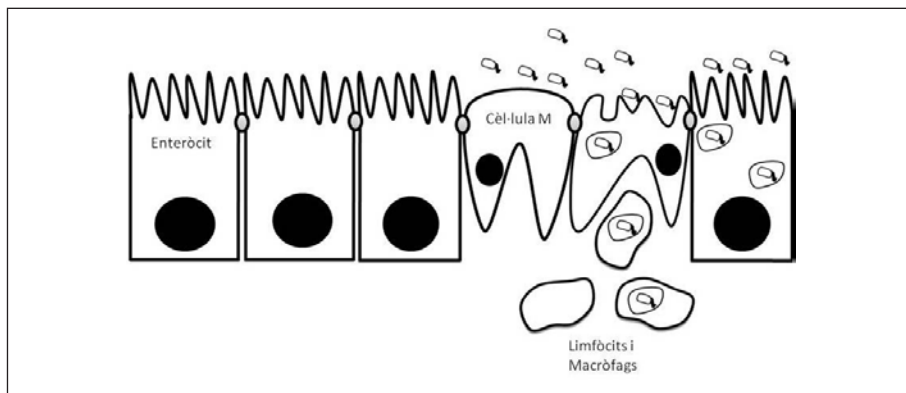
#### 1.1. Salmonel·losi

La salmonel·losi és una malaltia infecciosa causada per diferents soques del bacteri gramnegatiu *Salmonella*. Aquest bacteri inclou dues espècies (segons estudis d'homologia d'àcid desoxiribonucleic [DNA]): *S. enterica* i *S. bongori*. Fins ara, s'han descrit més de 2.500 serotips, la majoria dels quals pertanyen a la subespècie *enterica* (European Food Safety Authority, 2012).

##### 1.1.1. Patogenicitat

Un cop ingerida, la *Salmonella* és capaç d'envair i replicar-se en les cèl·lules M localitzades en les plaques de Peyer de la regió terminal de l'intestí prim (Murray *et al.*, 2006). L'adhesió a aquestes cèl·lules està mediada per fimbries de tipus 1 específiques de l'espècie (Althouse *et al.*, 2003), que reconeixen carbohidrats presents en la membrana de les cèl·lules intestinals (Baumler *et al.*, 1997). En la invasió de la mucosa intestinal, intervé el sistema de secreció de tipus III (T3SS) codificat en la regió cromosòmica anomenada *Salmonella pathogenicity island-1* (SPI) (Boyle *et al.*, 2006). El T3SS introdueix les proteïnes d'invasió produïdes pel bacteri (Sips o Ssps) a les cèl·lules M, i dóna lloc a una reorganització de l'actina amb la consegüent formació d'ondulacions a la membrana apical. Aquesta membrana rodeja i engoleix la *Salmonella*, cosa que permet la seva replicació intracel·lular en el fagosoma, la destrucció final de la cèl·lula hoste i l'extensió de la infecció a les cèl·lules epitelials veïnes i al teixit limfoide (figura 1).

**FIGURA 1.** *Salmonella* creuant la barrera epitelial a través de les cèl·lules M i dels enteròcits. Els esdeveniments posteriors inclouen la destrucció de les cèl·lules M i la invasió subepitelial dels macròfags. Els bacteris indueixen l'apoptosi dels macròfags i estimulen la resposta immunitària i inflammatòria



Font: Elaboració pròpia.

### 1.1.2. *Epidemiologia*

L'any 2010, el nombre total de casos de salmonel·losi en humans en els vint-i-set països de la Unió Europea (UE) va ser de 99.020. Aquesta dada reflecteix una disminució del 26 % en comparació amb la de 2008 (134.579 casos confirmats; European Food Safety Authority, 2012). En canvi, a l'Estat espanyol, el nombre de casos es va incrementar un 15 % durant el mateix període (3.822 casos el 2008 i 4.420 casos el 2010). El pic de casos informats es produeix normalment entre l'estiu i la tardor, amb una davallada important durant l'hivern.

Els serotips causants de la majoria d'aquestes infeccions a la UE són *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium*. El primer està associat al consum d'ous i carn d'au de corral contaminats, mentre que la infecció per *S. Typhimurium* està associada al consum de carn de porc i de boví contaminades (European Food Safety Authority, 2012). Un problema afegit és que en el cas dels animals són molt comunes les infeccions subclíniques. En porcs, poques vegades apareix febre o diarrea (Althouse *et al.*, 2003), i en els pollastres és normal que la infecció passi completament desapercibuda. Aquestes infeccions, com que no són detectades, faciliten la transmissió als humans a través d'aliments on el bacteri es pot multiplicar a causa d'un mal emmagatzematge, falta de cocció o contaminació creuada en menjars preparats (European Food Safety Authority, 2012).

### 1.1.3. Prevenció

La utilització de tractaments descontaminants en carn i ous seria la manera més efectiva de controlar la contaminació per *Salmonella*, però a la UE, l'ús de desinfectants sobre canals està prohibit i la descontaminació dels ous és difícil.

Per evitar, doncs, la contaminació, els productes avícoles han de ser controlats a les granges de producció, durant el transport i a l'escorxador. Una primera opció prou vàlida i que ja és obligatòria és crear una barrera sanitària que inclogui mesures higièniques per als animals, el personal i els equípaments. En aquesta barrera sanitària també s'inclou la modificació de la composició de la dieta (Vandeplas *et al.*, 2010) seguint diferents estratègies que es descriuen a continuació:

— Incorporació de fibra i polisacàrids per modificar la microbiota i les propietats fisicoquímiques del contingut intestinal, i així reduir la susceptibilitat davant la infecció. Pot ser útil per reduir la susceptibilitat a diferents patògens entre els quals es troba la *Salmonella*.

— Acidificació dels aliments i de l'aigua de beguda amb àcids grassos de cadena curta. Aquests àcids són produïts normalment per la microbiota anaeròbica intestinal com a producte final del metabolisme. Com s'ha demostrat *in vitro* (Thompson i Hinton, 1997), aquests àcids tenen propietats bacteriostàtiques i bactericides contra bacteris principalment gramnegatius com la *Salmonella*.

Tot i així, aquesta barrera sanitària no és infal·lible, cosa que ha provocat el desenvolupament de noves estratègies centrades, principalment, a millorar la resposta immunològica de l'animal. Algunes d'aquestes estratègies es basen a utilitzar:

- Anticossos específics contra algun element del bacteri.
- Pèptids antimicrobians; interaccionen amb les càrregues negatives presents a la membrana dels patògens.
- Vacunes; a la UE s'han registrat i comercialitzat vacunes per a diferents soques de *Salmonella* que no arriben, però, a tenir una efectivitat del 100 %.
- Antibiótics; a partir de 1950, els antibiótics es varen introduir en pinsos per a aviram amb la finalitat de controlar les infeccions bacterianes. Posteriorment, es varen utilitzar a nivells subterapèutics amb l'objectiu d'augmentar la taxa de creixement i millorar l'eficiència dels pinsos, utilitzant-los extensivament com a promotors de creixement (Baurhoo *et al.*, 2007). Tanmateix, l'ús subterapèutic d'antibiótics en la producció ramadera ha estat subjecte a una gran controvèrsia, atès que ha estat vinculat a l'aparició de resistències a antibiótics que comporten una amenaça per a la salut humana. Com

a resultat d'aquests estudis, l'1 de gener de 2006 la UE va prohibir l'ús de nivells subterapèutics d'antibiòtics com a promotors de creixement. Avui, els antibiòtics estan restringits a casos especials (Reglament CE núm. 2160/2003 del Parlament Europeu i del Consell).

— Additius alimentaris moduladors de la microbiota; entre aquests additius es poden destacar:

- Probiòtics; suplement dietètic de microorganismes vius (per exemple: *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Bacillus* i *Saccharomyce*) beneficiosos per a l'hoste. Equilibren el balanç microbià de l'animal (Howarth, 2010).
- Prebiòtics; molècules no digeribles ni metabolitzables en passar pel tub digestiu de l'animal (Gibson i Roberfroid, 1995). L'acció pot ser directa, en unir-se al patògen tot impeding que aquest s'adhereixi als enteròcits, o bé indirecta, ja que són substrats de la microbiota intestinal i n'estimulen el metabolisme i el creixement, inhibint, així, la colonització dels patògens per exclusió competitiva. A més a més, estimulen la producció de metabòlits antibacterians com l'àcid làctic, àcids grassos volàtils i bacteriocines. Els prebiòtics es classifiquen en funció del seu pes molecular (Musatto i Mancilha, 2007). Els més utilitzats són els disacàrids i els oligosacàrids, entre els quals cal ressaltar els fructooligosacàrids i els mannanoligosacàrids.
- Simbiòtics; es tracta d'una combinació de probiòtics i prebiòtics en la qual els prebiòtics afavoreixen selectivament el creixement dels probiòtics.
- Exclusió competitiva; per addició de moduladors de la microbiota. Es tracta de reemplaçar la microbiota de pollastres joves amb la de pollastres adults, protegint així els pollastres de les infeccions per *Salmonella*, entre d'altres (Vilà *et al.*, 2009).

— Noves estratègies; utilització de bacteriòfags, productes clorats, etcètera (Burkey *et al.*, 2004).

Cap d'aquests tractaments, però, és eficaç per eliminar completament la *Salmonella*. Tot i així, la combinació de diferents estratègies pot arribar a reduir la prevalença d'aquest patògen en les granges.

### **1.1.3.1. Els mannanoligosacàrids**

Els mannanoligosacàrids són complexos no digeribles rics en mannososa. La principal font d'aquests prebiòtics són les parets cel·lulars del llevat *Saccharomyces cerevisiae* que en contenen un 45 % (Burkey *et al.*, 2004; Solís de los Santos *et al.*, 2007). Els mannanoligosacàrids s'utilitzen com a prebiòtics,

## Morfologia de l'intestí de pollastres inoculats amb *Salmonella* Enteritidis

ja que proporcionen condicions favorables per al creixement de *Lactobacillus* intestinals beneficiosos. A més, tenen la capacitat d'aglutinar bacteris gramnegatius com a conseqüència de la interacció de les lectines específiques presents a les fimbries tipus 1 dels bacteris (Duguid *et al.*, 1966; Newman, 1994; Becker i Galletti, 2008; Burkey *et al.*, 2004) amb els residus de mannanosa dels mannanoligosacàrids (Baumler *et al.*, 1997). Així, els mannanoligosacàrids proporcionen llocs d'unió per als patògens, de tal manera que no s'adhereixen a l'intestí, cosa que afavoreix la seva eliminació. En aquest sentit, recentment, en un estudi realitzat en col·laboració amb l'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries i la Universitat Autònoma de Barcelona (IRTA-UAB), hem observat en cultius de cèl·lules epitelials d'ili de porc IPI-2I que els  $\beta$ -galactomannans obtinguts a partir de la goma de garrofi (*Ceratonia siliqua*) són capaços de reduir l'adhesió de *S. Typhimurium* i l'expressió de citocines proinflamàtòries induïdes per la seva infecció (Badia *et al.*, 2012).

## 2. OBJECTIUS

L'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) ha desenvolupat un suplement nutricional anomenat Salmosan<sup>®</sup>, procedent de la goma de garrofi i amb un alt contingut en mannanosa (mannosa:galactosa 4:1), per tal d'utilitzar-lo com a prebiòtic. L'objectiu d'aquest treball és determinar l'efecte del Salmosan<sup>®</sup>, en comparació amb les parets de *Saccharomyces cerevisiae* (que contenen mannans i  $\beta$ -glucans) i amb la colistina (antibiòtic utilitzat abans de la prohibició per disminuir la presència de *Salmonella enterica* serotip Enteritidis [d'ara en endavant, *Salmonella*], i potenciar el creixement dels animals) sobre la morfologia de l'epiteli intestinal de l'ili i de la tonsil·la cecal de pollastres inoculats amb *Salmonella*.

## 3. MATERIAL I MÈTODES

### 3.1. Infecció i tractaments

Els pollets *broiler* mascles (pollastres per a la producció de carn) d'un dia de vida de la soca comercial Ross 308 es varen mantenir estabulats durant vint-i-un dies en gàbies de 0,4 m<sup>2</sup> (6 animals en cada gàbia) a l'estació experimental de l'IRTA - Nutrició Animal de Valls, amb llum artificial programable i temperatura i humitat controlades. Els procediments experimentals varen ser aprovats pel Comitè Ètic per a l'Experimentació Animal de l'IRTA, seguint els principis de la UE per a l'experimentació animal en el marc de les normes de bones pràctiques clíniques.

Es va comprovar l'absència de *Salmonella* en els cecs d'aquests animals i es varen distribuir a l'atzar en vuit tractaments inoculats i no inoculats amb *Salmonella* i alimentats amb pinsos control (taula i) o bé suplementats amb antibiòtic (colistina 5 mg/kg del dia 7 a l'11), Salmosan® (1 g/kg) o parets cel·lulars de *Saccharomyces cerevisiae* (1 g/kg).

La *Salmonella* (phage type 4, soca resistent a l'àcid nalidíxic, Centre de Recerca en Sanitat Animal, IRTA-UAB, Bellaterra) es va cultivar durant divuit hores a 37 °C en el brou de cultiu *tryptic soy agar* (TSA, Difco, Barcelona), complementat amb 200 µg/mL d'àcid nalidíxic (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MA, EUA). Per a la inoculació es va preparar una suspensió en solució salina amortidora de fosfats de pH 7,2 (PBS) fins a obtenir una densitat òptica

**TAULA I.** *Ingredients i composició nutricional de la dieta control*

Ingredients	(g/kg de pinso)	Composició nutricional	(g/kg de pinso)
Blat	326,3	Matèria seca	873,8
Blat de moro	150,0	Minerals	60,5
Ordi	150,0	Fibra	35,2
Soja integral extrusionada	100,0	Extracte eteri	54,6
Farina de soja (48 % de proteïna)	217,8	Proteïna bruta	213,0
Greix alimentari	17,4	Calci	9,3
Clorhidrat de L-lisina	2,5	Fòsfor total	6,6
L-treonina	0,8	Fòsfor inorgànic	4,2
DL-metionina	2,2	Lisina	11,6
Clorur de colina	0,5	Treonina	7,4
Sal	4,6	Metionina	5,0
Carbonat càlcic	9,0	Metionina + cistina	8,2
Fosfat bicàlcic	15,7	Triptòfan	2,0
Etoxiquin 66 %	0,2		
Corrector vitamínic i mineral <sup>1</sup>	3,0		
Energia metabolitzable (kcal/kg)			2.895

1. Corrector vitamínic i mineral: vitamina A, 13.500 UI; vitamina D<sub>3</sub>, 4.800 UI; vitamina E, 45 mg; vitamina B<sub>1</sub>, 3 mg; vitamina B<sub>2</sub>, 9 mg; vitamina B<sub>6</sub>, 4,5 mg; vitamina B<sub>12</sub>, 16,5 µg; vitamina K<sub>3</sub>, 3 mg; pantotenat de calci, 16,5 mg; àcid nicotínic, 51 mg; àcid fòlic, 1,8 mg; biotina, 30 µg; Fe, 54 mg; I, 1,2 mg; Co, 0,6 mg; Cu, 12 mg; Mn, 90 mg; Zn, 66 mg; Se, 0,18 mg; Mo, 1,2 mg.

FONT: Elaboració pròpia.



## Morfologia de l'intestí de pollastres inoculats amb *Salmonella* Enteritidis

de 0,824 a 450 nm. Els animals varen ser inoculats oralment el setè dia d'edat amb 1 mL d'inòcul que contenia  $10^8$  unitats formadores de colònies de *Salmonella*.

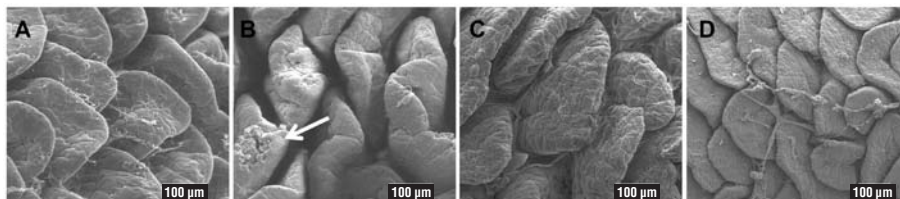
Tots els animals inoculats o no inoculats amb *Salmonella* es varen mantenir en el mateix programa d'alimentació durant el temps de l'experiment a excepció del tractament amb antibiòtic, que es va administrar durant set dies (del dia 5 a l'11). L'accés al pinso i a l'aigua de beguda va ser *ad libitum*. Els animals es varen sacrificar per dislocació cervical als vint-i-un dies d'edat. Per a l'estudi morfomètric, es varen sacrificar sis pollastres per cada tractament. Es varen prendre mostres de l'ili i, de tres d'aquests animals, de la tonsil·la cecal. Un cop netes amb PBS (4 °C, 0,1 mol/L), els segments es varen obrir longitudinalment i es varen agafar tres porcions d'uns 4 mm<sup>2</sup> de superfície de la zona distal de l'ili, la més propera a la unió ileocecal, per a microscòpia electrònica de rastreig (SEM). Les mostres, fixades amb glutaraldehyd al 2,5 % i paraformaldehyd al 2 % en PBS (0,1 mol/L, pH 7,4), es varen traslladar en fred (4 °C) directament des de l'estació experimental de l'IRTA a la Unitat de Microscòpia Electrònica dels Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (campus Casanova) per a ser processades. Un cop allí, les mostres es renten amb PBS 0,2 mol/L, es postfixen amb OsO<sub>4</sub> a l'1 % i ferrocianur potàssic al 0,8 % en PBS (0,2 mol/L, pH 7,4), es renten amb PBS (0,2 mol/L, pH 7,4) i es deshidraten en una sèrie gradual d'etanol. A continuació, es transfereixen a acetat d'isoamil per a la realització del punt crític amb CO<sub>2</sub> i, finalment, es recobreixen amb or. Les mostres han estat examinades en un microscopi Zeiss DSM 940A (Alemanya) que opera a 15 kV.

## 4. RESULTATS

### 4.1. Efectes sobre l'epiteli de l'ili

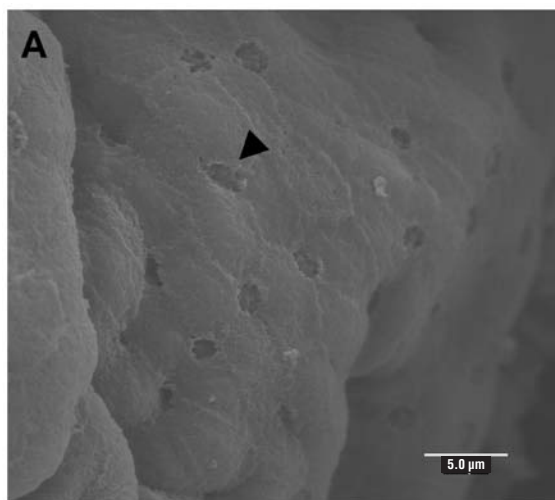
Les imatges de les vellositats dels pollastres no inoculats (figura 2) posen de manifest que la inclusió a la dieta de colistina, Salmosan® i parets cel·lulars de llevat no afecta la disposició ni l'estructura de les vellositats. A les imatges també es pot observar que la dieta amb colistina produeix lesions a l'epiteli (imatge D). Per a aquest mateix tractament, també s'observa que tant l'epiteli com el moc estan més lliures de bacteris que a la resta de tractaments. En el cas de les dietes amb Salmosan® i parets cel·lulars, s'ha detectat, en tots els pollastres analitzats, que la quantitat de moc produïda és superior que al control. Aquest fet es pot relacionar amb la presència d'un nombre més elevat de cèl·lules caliciformes, tal com s'observa a la figura 3 corresponent a la dieta amb Salmosan®.

**FIGURA 2.** Imatges de l'ili de pollastres no inoculats obtingudes per SEM. A, pollastre control; B, pollastre colistina; C, pollastre Salmosan®; D, pollastre parets cel·lulars de llevat. A la figura es mostra una imatge per a cada tractament representativa de  $n = 6$  pollastres analitzats. La fletxa de la imatge B indica una lesió a l'epiteli



FONT: Elaboració pròpia al microscopi electrònic de rastreig.

**FIGURA 3.** Imatge de l'epiteli intestinal dels pollastres no inoculats tractats amb Salmosan®. El cap de la fletxa indica una cèl·lula caliciforme

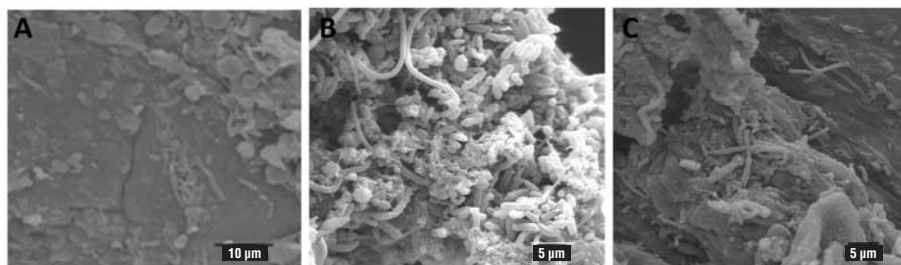


FONT: Elaboració pròpia al microscopi electrònic de rastreig.

En els pollastres inoculats amb *Salmonella* (figura 4, imatge A), es pot observar un increment del nombre de microorganismes adherits tant a l'epiteli intestinal com al moc. En els pollastres corresponents a les dietes Salmosan® i parets cel·lulars de llevat, es confirma l'increment de la producció de moc (imatges B i C), ja descrit per als pollastres no inoculats. Tal com es pot observar, aquest moc conté un gran nombre de bacteris adherits. Aquest increment també es pot atribuir a un augment del nombre de cèl·lules caliciformes (figura 5).

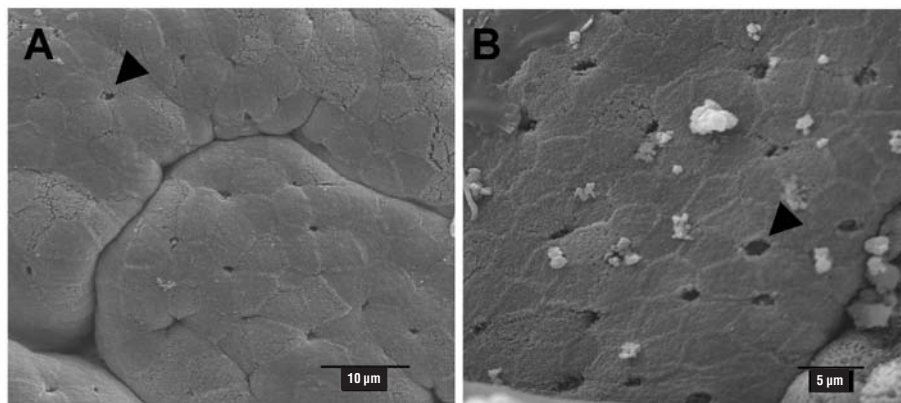
## Morfologia de l'intestí de pollastres inoculats amb *Salmonella* Enteritidis

**FIGURA 4.** Imatges de l'ili de pollastres inoculats amb *Salmonella* obtingudes per SEM. A, pollastre control; B, pollastre Salmosan®; C, pollastre parets cel·lulars de llevat. A la figura es mostra una imatge per a cada tractament representativa de  $n = 6$  pollastres analitzats



FONT: Elaboració pròpia al microscopi electrònic de rastreig.

**FIGURA 5.** Imatges de l'ili de pollastres inoculats amb *Salmonella* obtingudes per SEM. A, pollastre Salmosan®; B, pollastre parets cel·lulars de llevat. A la figura es mostra una imatge per a cada tractament representativa de  $n = 6$  pollastres analitzats. El cap de la fletxa indica una cèl·lula caliciforme

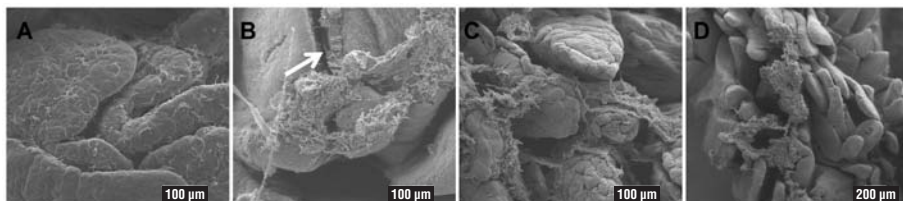


FONT: Elaboració pròpia al microscopi electrònic de rastreig.

### 4.2. Efectes sobre l'epiteli de la tonsil·la cecal

A les imatges de la tonsil·la cecal dels pollastres no inoculats (figura 6), s'observa la forma característica de les vellositats d'aquesta zona de l'intestí; vellositats ben desenvolupades i amb un cert desordre en la seva distribució. Pel que fa a l'efecte dels diferents tractaments, els resultats són molt similars als detectats a l'ili. Així, per la dieta amb colistina s'observen lesions

**FIGURA 6.** Imatges de la tonsil·la cecal de pollastres no inoculats obtingudes per SEM. A, pollastre control; B, pollastre colistina; C, pollastre Salmosan®; D, pollastre parets cel·lulars de llevat. A la figura es mostra una imatge per a cada tractament representativa de  $n = 3$  pollastres analitzats. La fletxa de la imatge B indica una lesió a l'epiteli

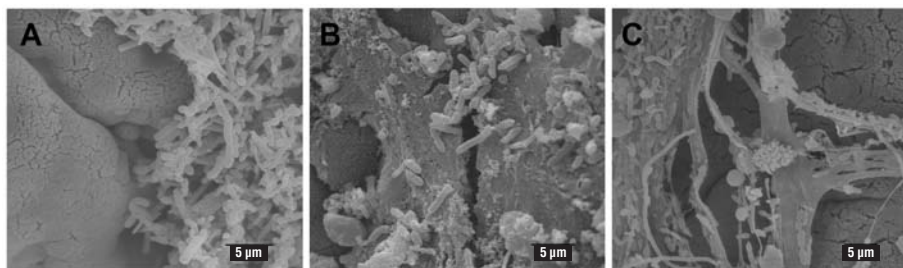


FONT: Elaboració pròpia al microscopi electrònic de rastreig.

epiteliaus i una reducció del nombre de microorganismes adherits a l'epiteli (imatge B). En el cas de les dietes amb Salmosan® i parets cel·lulars de llevat, es torna a confirmar un increment de la producció de moc (imatges C i D).

A la tonsil·la cecal dels pollastres inoculats (figura 7), tal com s'ha descrit per a l'ili, s'observa un increment del nombre de bacteris amb una estructura compatible amb la de la *Salmonella* (imatge A) (Badia *et al.*, 2012). En el cas dels pollastres sotmesos a les dietes amb Salmosan® i parets cel·lulars de llevat, aquests bacteris estan associats al moc. En aquests animals també s'ha detectat un increment de la producció de moc amb una gran quantitat de bacteris adherits (imatges B i C). Aquest increment també es pot atribuir a un augment del nombre de cèl·lules caliciformes (figura 8).

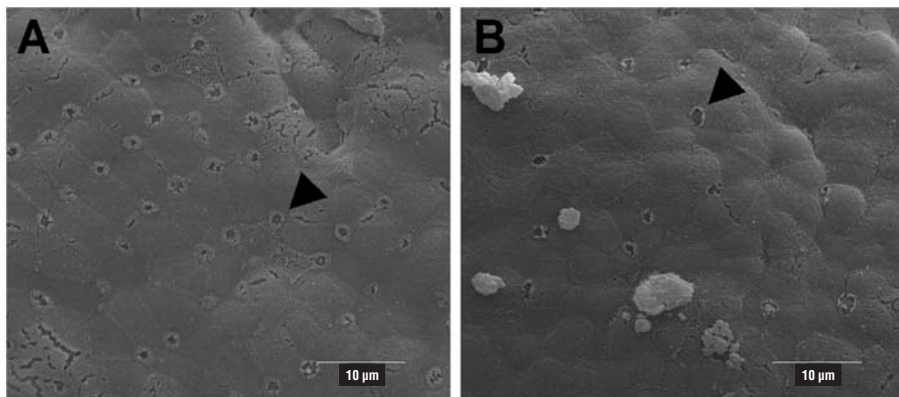
**FIGURA 7.** Imatges de la tonsil·la cecal de pollastres inoculats amb *Salmonella* obtingudes per SEM. A, pollastre control; B, pollastre Salmosan®; C, pollastre parets cel·lulars de llevat. A la figura es mostra una imatge per a cada tractament representativa de  $n = 3$  pollastres analitzats



FONT: Elaboració pròpia al microscopi electrònic de rastreig.

## Morfologia de l'intestí de pollastres inoculats amb *Salmonella* Enteritidis

**FIGURA 8.** Imatges de la tonsil·la cecal de pollastres inoculats amb *Salmonella* obtingudes per SEM. A, pollastre Salmosan®; B, pollastre parets cel·lulars de llevat. A la figura es mostra una imatge per a cada tractament representativa de  $n = 6$  pollastres analitzats. El cap de la fletxa indica una cèl·lula cal·liciforme



FONT: Elaboració pròpia al microscopi electrònic de rastreig.

## 5. DISCUSSIÓ

En el present treball s'ha estudiat el Salmosan® i les parets cel·lulars de *Saccharomyces cerevisiae* com a font de mannanoligosacàrids. També s'ha estudiat la colistina com a representant dels antibiòtics utilitzats tradicionalment i que, tot i que actualment estan prohibits, han demostrat la seva eficàcia a combatre la infecció per *Salmonella*.

Tenint en compte els resultats de Badia *et al.* (2012) obtinguts *in vitro*, es va decidir realitzar l'estudi en condicions *in vivo* en el pollastre. Es varen alimentar pollastres durant vint-i-un dies amb dietes que contenien els diferents productes subjectes d'estudi, és a dir, colistina, Salmosan® i les parets cel·lulars *S. cerevisiae*, tant en animals sans com en animals inoculats amb *Salmonella*. Els pollastres que varen seguir la dieta control presenten la morfologia de les vellositats característica de l'intestí d'aquesta espècie animal amb una distribució en ziga-zaga (Chichlowski *et al.*, 2007). L'epiteli dels pollastres inoculats i alimentats amb la dieta control presenta un aspecte normal. La infecció provocada per la inoculació amb *Salmonella* no va provocar alteracions morfològiques.

En el cas dels pollastres tractats amb antibiòtic, tant els no inoculats com els inoculats amb *Salmonella*, s'observa a l'ili i a la tonsil·la cecal una reducció de la presència de bacteris i la formació de lesions epitelials, tal com ja

havia estat descrit anteriorment també en pollastres (Chichlowski *et al.*, 2007). En canvi, l'epiteli dels pollastres alimentats amb prebiòtics (Salmosan® i parets cel·lulars de llevat) té un aspecte similar al control. Per a aquests tractaments, les imatges revelen un increment del nombre de cèl·lules caliciformes i, per tant, més producció de moc, resultats similars als obtinguts en estudis anteriors (Baurhoo *et al.*, 2007; Chichlowski *et al.*, 2007) i en el gall dindi (Solis de los Santos *et al.*, 2007). En aquests animals, també s'ha observat un increment de bacteris adherits al moc i, per tant, una reducció de la presència de bacteris adherits a l'epiteli. En aquest sentit, ja s'havia descrit amb anterioritat la capacitat dels mannanoligosacàrids de reduir la presència de *S. Dublin* (Spring *et al.*, 2000), *S. Typhimurium* (Oyoyo *et al.*, 1989) i *S. Enteritidis* (Allen *et al.*, 1997; Fernandez *et al.*, 2000) en el tracte digestiu dels pollastres.

A partir dels resultats obtinguts en aquest estudi, podem concloure que:

— La infecció per *Salmonella* no afecta la integritat de l'epiteli intestinal.

— El tractament amb antibiòtic és efectiu, ja que disminueix la presència de bacteris, però altera la integritat de l'epiteli per la formació de lesions.

— El tractament amb els prebiòtics Salmosan® i parets de *S. cerevisiae* manté la integritat de l'epiteli i redueix la presència de bacteris adherits a l'epiteli. Les imatges suggereixen que aquest efecte és degut a l'increment de la producció de moc, que es correlaciona amb un increment del nombre de cèl·lules caliciformes i que dificulta la invasió de l'epiteli intestinal.

Així, doncs, la suplementació de les dietes destinades a la producció avícola amb productes rics en mannans pot ser una bona estratègia per tal de reduir la contaminació per *Salmonella* en productes destinats a consum humà. A més, els resultats obtinguts fins ara amb Salmosan® atorguen un valor addicional a un producte com la goma de garrofi, molt abundant al nostre país.

## **6. AGRAÏMENTS**

Aquest treball ha estat subvencionat pel projecte FBG-IRTA 305948. Els autors agraeixen la tasca desenvolupada pel personal de la Unitat de Microscòpia Electrònica dels Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (campus de Casanova).

## BIBLIOGRAFIA

- ALLEN, V. M.; FERNANDEZ, F.; HINTON, M. H. (1997). «Evaluation of the influence of supplementing the diet with mannose or palm kernel meal on *Salmonella* colonization in poultry». *British Poultry Science*, núm. 38 (5), p. 485-488.
- ALTHOUSE, C.; PATTERSON, S.; FEDORKA-CRAY, P.; ISAACSON, R. E. (2003). «Type 1 fimbrae of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium bind to enterocytes and contribute to colonization of swine *in vivo*». *Infection and Immunity*, núm. 71, p. 6446-6452.
- BADIA, R.; BRUFAU, M. T.; GUERRERO-ZAMORA, A. M.; LIZARDO, R.; DOBRESCU, I.; MARTIN-VENEGAS, R.; FERRER, R.; SALMON, H.; MARTÍNEZ, P.; BRUFAU, J. (2012). « $\beta$ -Galactomannan and *Saccharomyces cerevisiae* var. *Bouardii* modulate the immune response against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in porcine intestinal epithelial and dendritic cells». *Clinical and Vaccine Immunology*, núm. 19 (3), p. 368-376.
- BAUMLER, A. J.; TSOLIS, R. M.; HEFFRON, F. (1997). «Fimbrial adhesions of *Salmonella* Typhimurium. Role in bacterial interactions with epithelial cells». *Advances in Experimental Medicine and Biology*, núm. 412, p. 149-158.
- BAURHOOD, B.; PHILLIP, L.; RUIZ-FERIA, C. A. (2007). «Effects of purified lignin and mannan oligosaccharides on intestinal integrity and microbial populations in the ceca and litter of broiler chickens». *Poultry Science*, núm. 86 (6), p. 1070-1078.
- BECKER, P. M.; GALLETI, S. (2008). «Food and feed components for gut health-promoting adhesion of *E. coli* and *Salmonella enterica*». *Journal of the Science of Food and Agriculture*, núm. 88 (11), p. 2026-2035.
- BOYLE, E. C.; BROWN, N. F.; FINLAY, B. B. (2006). «*Salmonella enterica* serovar Typhimurium effectors SopB, SopE, SopE2 and SipA disrupt tight junction structure and function». *Cellular Microbiology*, núm. 8 (12), p. 1946-1957.
- BURKEY, T. E.; DRITZ, S. S.; NIETFIELD, J. C.; JOHNSON, B. J.; MINTON, J. E. (2004). «Effects of dietary mannanoligosaccharide and sodium chlorate on the growth performance, acute-phase response, and bacterial shedding of weaned pigs challenged with *Salmonella enterica* serotype Typhimurium». *Journal of Animal Science*, núm. 82 (2), p. 397-404.
- CHICHLOWSKI, M.; CROOM, W. J.; EDENS, F. W.; MCBRIDE, B. W.; QIU, R.; CHIANG, C. C.; DANIEL, L. R.; HAVENSTEIN, G. B.; KOCI, M. D. (2007). «Microarchitecture and spatial relationship between bacteria and ileal, cecal, and colonic epithelium in chickens fed a Direct-Fed Microbial, PrimaLac, and Salinomycin». *Poultry Science*, núm. 86 (6), p. 1121-1132.
- DUGUID, J. P.; ANDERSON, E. S.; CAMPBELL, I. (1966). «Fimbriae and adhesive properties in Salmonellae». *The Journal of Pathology and Bacteriology*, núm. 92 (1), p. 107-137.

- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2012). «The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010». *EFSA Journal*, núm. 10 (3). Disponible en línea a: <www.efsa.europa.eu/efsajournal>.
- FERNANDEZ, F.; HINTON, M. H.; VAN GILS, B. (2000). «Evaluation of the effect of mannan-oligosaccharides on the competitive exclusion of *Salmonella* Enteritidis colonization in broiler chicks». *Avian Pathology*, núm. 29 (6), p. 575-581.
- GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. (1995). «Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics». *Journal of Nutrition*, núm. 125, p. 1401-1412.
- HOWARTH, G. S. (2010). «Probiotic-derived factors: probiotaceuticals?». *Journal of Nutrition*, núm. 140, p. 7-11.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFEALLER, M. A. (2006). *Microbiología médica*. 5a ed. Barcelona: Elsevier.
- MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. (2007). «Non-digestible oligosaccharides: a review». *Carbohydrate Polymers*, núm. 68 (3), p. 587-597.
- NEWMAN, K. (1994). «Mannan-oligosaccharides natural polymers with significant impact on the gastrointestinal microflora and the immune system». A: LYONS, T. P.; JACQUES, K. A. (ed.). *Biotechnology in the feed industry*. Nottingham: University Press, p. 167-174.
- OYOFO, B. A.; DELOACH, J. R.; CORRIER, D. E.; NORMAN, J. O.; ZIPRIN, R. L.; MOLLENHAUER, H. H. (1989). «Prevention of *Salmonella* Typhimurium colonization of broilers with D-mannose». *Poultry Science*, núm. 68 (10), p. 1357-1360.
- SOLIS DE LOS SANTOS, F.; DONOGHUE, A. M.; FARNELL, M. B.; HUFF, G. R.; HUFF, W. E.; DONOGHUE, D. J. (2007). «Gastrointestinal maturation is accelerated in turkey poulters supplemented with a mannan-oligosaccharide yeast extract (Alphamune)». *Poultry Science*, núm. 86 (5), p. 921-930.
- SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, K. A.; NEWMAN, K. E. (2000). «The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of *Salmonella*-challenged broiler chicks». *Poultry Science*, núm. 79 (2), p. 205-211.
- THOMPSON, J. L.; HINTON, M. (1997). «Antibacterial activity of formic and propionic acids in the diet of hens on salmonellas in the crop». *British Poultry Science*, núm. 38 (1), p. 59-65.
- VANDEPLAS, S.; DUBOIS DAUPHIN, R.; BECKERS, Y.; THONART, P.; THÉWIS, A. (2010). «*Salmonella* in chicken: current and developing strategies to reduce contamination at farm level». *Journal of Food Protection*, núm. 73 (4), p. 774-785.
- VILÀ, B.; FONTGIBELL, A.; BADIOLA, I.; ESTEVE-GARCIA, E.; JIMÉNEZ, G.; CASTILLO, M.; BRUFAU, J. (2009). «Reduction of *Salmonella enterica* var. Enteritidis colonization and invasion by *Bacillus cereus* var. *toyoi* inclusion in poultry feeds». *Poultry Science*, núm. 88, p. 975-979.