

## UNA APROXIMACIÓN CUANTITATIVA PARA LA EVALUACIÓN DE LA SALUD INTESTINAL EN AVES

E. Teirlynck, A. Gholamiandehkordi, V. Eeckhaut, R. Ducatelle, F. Pasmans, F. Haesebrouck y F. Van Immerseel.

Department of Pathology, Bacteriology and Avian Diseases, Research Group Veterinary Public Health and Zoonoses, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, Belgium.

### 1.- INTRODUCCIÓN

Desde la entrada en vigor en la Unión Europea de la prohibición para el uso de promotores de crecimiento antimicrobianos en piensos de avicultura en Enero de 2006, se ha producido un aumento repentino en el número de casos registrado de enteritis necrótica, así como en el número de granjas de broilers con ‘vagos’ problemas de salud intestinal pero con una fuerte reducción de los rendimientos productivos. Estos últimos casos se refieren normalmente como ‘disbacteriosis’.

La enteritis necrótica es una enfermedad clínica severa que afecta a pollos entre 3 y 4 semanas. Se caracteriza por un aumento agudo de la frecuencia de muertes súbitas sin síntomas previos. Este aumento de mortalidad se extiende generalmente a lo largo de una semana. La lesión característica en la necropsia es la presencia de múltiples focos de distinto tamaño en la mucosa intestinal. La bacteria *Clostridium perfringens* perteneciente al toxotipo A se considera la principal causa de esta enfermedad, aunque bacterias de este tipo se encuentran también en el contenido intestinal de broilers clínicamente sanos (Gholamiandekhordi et al., 2006). Nuestro grupo ha desarrollado recientemente un modelo *in vivo* altamente reproducible para estudiar esta enfermedad, y hemos publicado un informe sobre la cuantificación de las lesiones con este modelo (Gholamiandekhordi et al., 2007).

La disbacteriosis es la denominación que se usa generalmente para definir un síndrome subclínico a nivel de una granja, que debe cumplir los siguientes criterios:

- i) Baja eficacia alimenticia y reducida ganancia de peso.
- ii) Heces húmedas con presencia de partículas de alimento no digeridas.
- iii) En la necropsia, presencia de bolsas finas, frágiles y distendidas, llenas de mucina y partículas de alimento no digeridas.

Para el estudio de la disbacteriosis, hemos desarrollado igualmente un modelo *in vivo* (Teirlynck et al., 2008a), así como métodos para cuantificar las lesiones (Teirlynck et al., 2008b).

La enteritis necrótica puede considerarse como un prototipo para problemas agudos de salud intestinal (aunque también pueden darse casos subclínicos), mientras que la disbacteriosis es el prototipo de problema de salud intestinal subclínica.

## **2.- CUANTIFICACIÓN DE LAS LESIONES INTESTINALES EN LA ENTERITIS NECRÓTICA**

Las infecciones con *Clostridium perfringens* en aves se presentan habitualmente como una enfermedad clínica aguda (enteritis necrótica), aunque estas infecciones pueden también pasar sin síntomas clínicos (Kaldhusdahl et al., 2001). El modelo que hemos desarrollado resulta en una enfermedad subclínica, evitando un incremento de la mortalidad, que puede plantear cuestiones éticas y que en cualquier caso es un criterio altamente variable e impredecible.

La metodología experimental ha sido establecida después de varios ensayos. Es una modificación adicional de diferentes protocolos descritos previamente (Gholamiandekhordi et al., 2007). Broilers de un día de edad fueron obtenidos de incubadoras comerciales y se mantuvieron en aislamiento estricto. Fueron alimentados con harina húmeda que contenía trigo (50%) y cebada (10%) como principales fuentes de energía y harina de soja como fuente proteica. Desde los 20 días de edad en adelante, la fuente de proteína pasó a ser harina de pescado (30%). El día 1, las aves fueron inoculadas oralmente con una dosis 10 veces superior a la recomendada de vacuna de coccidios viva. Durante los días 18, 19, 20 y 21, las aves fueron inoculadas oralmente con  $4 \times 10^8$  ufc de una cepa (nº 56) de *Clostridium perfringens* tres veces al día. Las aves fueron sacrificadas los días 22, 23 ó 24. La cuantificación de la severidad de las lesiones se hizo usando una combinación de diferentes parámetros. Las principales lesiones en el intestino delgado (desde el duodeno hasta el íleon) se clasificaron de 0 a 6 según los siguientes criterios: 0 = sin lesiones graves, 1 = mucosa intestinal congestionada; 2 = pequeñas erosiones focales

(1-5 foci); 3 = necrosis focal o ulceración (6-15 foci); 4 = necrosis focal o ulceración (16 foci o más); 5 = áreas necróticas de 2-3 cm de largo; 6 = necrosis difusa típica. Valoraciones superiores a 2 se consideraron casos de enteritis necrótica positiva. El resto de parámetros se clasificaron a partir de secciones histológicas obtenidas de muestras de duodeno, yeyuno e íleon. La longitud de los villi, la profundidad de las criptas y la relación entre longitud y profundidad se determinaron sobre 10 villi y 10 criptas seleccionados al azar en cada sección histológica, utilizando un sistema de análisis de imágenes asociado a un PC. La fusión de los villi se valoró utilizando un sistema propio (Gholamiandekhordi et al., 2007; Teirlynck et al., 2008b) basado en el número y extensión de los villi fusionados. De forma similar se valoraron los defectos epiteliales, con especial atención al aplastamiento de células epiteliales y a la magnitud de las erosiones. Igualmente se valoraron semicuantitativamente la congestión intestinal, las hemorragias en la mucosa y la precipitación de residuos en el lumen intestinal.

En varios experimentos repetidos utilizando la misma metodología descrita anteriormente, aproximadamente un 50% de las aves desarrollaron lesiones necróticas fácilmente visibles. La valoración de las lesiones fue altamente reproducible. Como consecuencia, se concluyó que este modelo puede utilizarse para evaluar diferentes aditivos alimenticios y otros tratamientos propuestos para el control de la enteritis en broilers. Las evaluaciones histológicas fueron complementarias de la valoración de las lesiones, ya que permitían detectar daños moderados que no son fácilmente visibles y que pueden encontrarse en el 50% de aves que no desarrollan graves lesiones después de la doble inoculación con coccidios y *Clostridium perfringens*, o después de la inoculación individual con alguno de estos dos agentes infecciosos. Esto parece indicar que una sobredosis de vacuna viva de coccidios unida a *Clostridium perfringens* actúan de forma sinérgica para inducir el desarrollo de lesiones necróticas en el aparato digestivo. Cuando estas aves con síntomas subclínicos son sacrificadas a edades más tardías no se encuentran lesiones necróticas en el intestino. Esto parece indicar que este tipo de lesiones moderadas de la mucosa no resultan fatales para el animal. Está todavía por determinar si la toxemia, situaciones de shock, coagulación vascular diseminada u otras complicaciones son las responsables de la mortalidad en situaciones prácticas de granjas comerciales.

### **3.- CUANTIFICACIÓN DE LOS PROBLEMAS INTESTINALES EN CASOS DE DISBACTERIOSIS**

Las disbacteriosis han sido observadas como la patología dominante en broilers desde la prohibición de los promotores de crecimiento antimicrobianos. Es bien conocido que estos promotores pueden compensar los denominados efectos anti-nutritivos de los polisacáridos no amiláceos que se encuentran en altas concentraciones en los granos de cereales (Choi y Ryu, 1987). Estos efectos anti-nutritivos se han asociado con un aumento

de la viscosidad de los contenidos intestinales y una reducción de la digestibilidad y absorción de nutrientes.

En nuestro Departamento hemos desarrollado un modelo *in vivo* basado en los efectos anti-nutritivos de los polisacáridos no amiláceos del trigo y el centeno (Teirlynck et al., 2008a). En este modelo, los pollos broiler recibieron piensos de arranque, crecimiento y acabado que cubrían todas sus necesidades de energía y proteína, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales. Para cada uno de los tres periodos (arranque, crecimiento y acabado), se formularon dos piensos diferentes. Estos piensos eran similares en todos sus aspectos con la única diferencia de que el contenido energético en una fórmula procedía principalmente de trigo (50%) y centeno (5%), mientras que en la otra la principal fuente de energía era maíz (56%). El resto de los ingredientes se mantuvo lo más constante posible. Las aves se mantuvieron aisladas, libres de patógenos infecciosos. A las 2, 4 y 6 semanas de edad, los pollos fueron pesados y se determinó el índice de conversión. A cada edad se sacrificó un grupo de pollos. Se obtuvieron muestras de duodeno, yeyuno, íleon y ciego que fueron procesadas para histología. Se determinó la longitud de los villi y el espesor de la capa muscular mediante un sistema de análisis de imágenes instalado en un PC. También se evaluó el grado de fusión de los villi. Todos estos análisis cuantitativos se hicieron sobre secciones de tejidos teñidas con hematoxilina y eosina. El número de células de Goblet se determinó en secciones de tejido teñidas con Periodic acid Schiff. Para la identificación de linfocitos-T se realizó una tinción inmuno-histoquímica de las secciones en parafina. Esta población de células se cuantificó usando el parámetro 'área proporcional' en un sistema automático de análisis de imágenes. La técnica de marcado de terminales de uridina (TUNEL) se usó para identificar las células epiteliales apoptóticas. Finalmente, la composición de la microbiota intestinal se estableció mediante técnicas T-RFLP después de la extracción total de DNA de contenido cecal.

Tal como se esperaba, el suministro de un pienso basado en trigo y centeno como principales fuentes de energía, sin suplementación con promotores antibióticos de crecimiento o xilanasas, resultó en un empeoramiento del índice de conversión. Además, la alimentación con trigo/centeno resultó en un incremento significativo de la fusión de villi, una capa muscular más fina y un aumento en el número de células Goblet situados sobre los villi intestinales. También se observó con este pienso la presencia de un mayor número de células apoptóticas tanto en los ápices de los villi como en las criptas. El número de linfocitos-T infiltrados fue marcadamente más elevado en el grupo alimentado con trigo/centeno, especialmente en los animales de mayor edad. Todos estos cambios en la mucosa intestinal estuvieron acompañados por un cambio en la composición de la flora microbiana determinada por T-RFLP, especialmente a las dos semanas de edad. Sin embargo, la naturaleza de los componentes de la microbiota que son estimulados o deprimidos por el tipo de pienso no puede determinarse con precisión con esta técnica.

La microbiota puede tener influencia en los cambios en el contenido en mucinas en el lumen intestinal. En este sentido, se ha documentado que las bacterias pueden inducir la expresión de genes responsables de la producción de mucinas, mientras que por otro lado producen enzimas capaces de degradar esas mucinas (Deplancke and Gaskins, 2001; Deplancke et al., 2002). En el presente modelo, hubo un incremento evidente en la producción de mucina ligado a un aumento de la proporción de células epiteliales en los villi. Esto puede explicar el mayor contenido en mucinas en el lumen intestinal, como también se observa en casos prácticos de disbacteriosis. Las bacterias presentes en el intestino pueden interactuar con las células epiteliales de los villi. Estas interacciones pueden tener diferentes efectos sobre la mucosa. Así, hemos demostrado recientemente que la bacteria *Campylobacter* puede entrar y salir de las células epiteliales (Van Deun et al., 2008a). Este proceso no causa aparentemente una respuesta inflamatoria en la mucosa digestiva de broilers (Van Deun et al., 2008b).

Otras bacterias pueden activar receptores TLR presentes en las células epiteliales, dando lugar a inflamación intestinal (Gribar et al., 2008). Una interacción bien documentada es la existente entre bacterias Gram negativas y receptores TLR-4, mediada por el enlace específico del lipopolisacárido de la bacteria Gram negativa sobre el TLR-4. Estudios sobre la composición de la microbiota intestinal en broilers han demostrado que, en el íleon, el 70% de los microorganismos presentes están relacionados con *Lactobacillus*, mientras que en el ciego un 65% están relacionados con Clostridios y sólo un 8% con *Lactobacillus* (Lu et al., 2003). En el colon humano las bacterias Clostridiaceae suponen entre un 30 y un 60% del total y están relacionadas con los clusters IV y XIVa (Hold et al., 2002). Recientemente, hemos conseguido aislar en el ciego de broilers la bacteria *Butyricoccus pullicaecorum* una cepa de clostridio relacionada con el cluster IV (Eeckaut et al., en prensa). La mayor parte de estas Clostridiaceae parecen consumir acético y/o láctico y producir grandes cantidades de butírico (Belenguer et al., 2006). Se ha demostrado que el butirato contribuye a inhibir la inflamación, a través de la inhibición del factor nuclear kappa B y de la deacetilación de histonas, y a estabilizar las uniones epiteliales (Hamer et al., 2008). Esta es posiblemente la razón por la que el butirato puede mejorar los rendimientos productivos en broilers (Leeson et al., 2005). En los grupos alimentados con piensos trigo/centeno en el presente modelo, la disponibilidad de grandes cantidades de beta glucanos para la microbiota intestinal, puede conducir a un desequilibrio entre poblaciones microbianas pro-inflamatorias (activadoras de receptores TLR) y bacterias productoras de butirato. Esto puede explicar los daños observados en la mucosa y la importante respuesta inflamatoria que da lugar al empeoramiento del índice de conversión.

#### 4.- CONCLUSIONES

Se han desarrollado modelos experimentales para el estudio de la enteritis necrótica por un lado y las disbacteriosis por otro. Ambas situaciones reflejan diferentes manifestaciones de problemas de salud intestinal que constituyen actualmente un importante problema para la industria avícola. Estos modelos constituyen herramientas útiles para el estudio de los mecanismos de los problemas de salud intestinal. Además, pueden ser utilizados para evaluar diferentes aditivos y de otros métodos actualmente en desarrollo para mejorar la salud intestinal en aves.

#### 5.- REFERENCIAS

- BELENGUER, A., DUNCAN, S., CALDER, A., HOLTROP, G., LOUIS, P., LOBLEY, G. y FLINT, H. (2006) *Applied and Environmental Microbiology* 72: 3593-3599.
- CHOI, J. y RYU, K. (1987) *Br. Poult. Sci.* 28: 113-118.
- DEPLANCKE, B. y GASKINS, H. (2001) *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 1131-1141.
- DEPLANCKE, B., VIDAL, O., GANESSUNKER, D., OVAN, S., MACKIE, R. y GASKINS, H. (2002) *Am. J. Clin. Nutr.* 76: 1117-1125.
- EECKHAUT, V., VAN IMMERSEEL, F., TEIRLYNCK, E., PASMANS, F., FIEVEZ, V., SNAUWAERT, C., HAESBROUCK, F., DUCATELLE, R., LOUIS, P. y VANDAMME, P. (2008) *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (in press)
- GRIBAR, S., ANAND, R., SODHI, C. y HACKHAM, D. (2008) *Journal of Leucocyte Biology* 83: 493-498.
- GHOLAMIANDEKHORDI, A., DUCATELLE, R., HEYNDRIKX, M., HAESBROUCK, F. y VAN IMMERSEEL, F. (2006) *Vet. Microbiology* 113: 143-152.
- GHOLAMIANDEHKORDI, A., VAN IMMERSEEL, F., TIMBERMONT, L., LANCKRIET, A., PASMANS, F., HAESBROUCK, F. y DUCATELLE, R. (2007) *Avian Pathology* 36: 375-382.
- HAMER, H., JONKERS, D., VENEMA, K., VANHOUTVIN, S., TROOST, F. y BRUMMER, R. J. (2008) *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 27: 104-119.
- HOLD, G., PRYDE, S., RUSSELL, V., FURRIE, E. y FLINT, H. (2002) *FEMS Microbiology Ecology* 39: 33-39.
- KALDHUSDAHL, M., SCHNEITZ, C., HOFSHAGEN, M. y SKJERVE, E. (2001) *Avian Diseases* 45: 149-156.
- LEESON, S., NAMKUNG, H., ANTONGIOVANNI, M. y LEE, E. (2005) *Poul. Sci.* 84: 1418-1422.
- LU, J., IDRIS, U., HARMON, B., HOFACRE, C., MAURER, J. y LEE, M. (2003) *Applied and Environmental Microbiology* 69: 6816-6824.

- TEIRLYNCK, E., VAN IMMERSEEL, F. y DUCATELLE, R. (2008a) *World's Poult. Sci. J.* 64: 365-366.
- TEIRLYNCK, E., EECKHAUT, V., PASMANS, F., HAESEBROUCK, F., DUCATELLE, R. y VAN IMMERSEEL, F. (2008b) *World's Poult. Sci. J.* 64: 482.
- TRUSCOTT, R. y AL-SHEIKHLY, F. (1977) *American Journal of Veterinary Research* 33: 537-549 (1977)
- VAN DEUN, K., PASMANS, F., VAN IMMERSEEL, F., DUCATELLE, R. y HAESEBROUCK, F. (2008a) *Br. J. Nutr.* 14: 1-5
- VAN DEUN, K., HAESEBROUCK, F., VAN IMMERSEEL, F., DUCATELLE, R. y PASMANS, F. (2008b) *Avian Pathology* 37: 379-383

FEDNA