

Comportamiento productivo y respuesta inmune de pollos alimentados con dietas sorgo-soya con y sin aflatoxina y paredes celulares de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*)

Productive performance and immune response in broilers fed a sorghum+ soy diet supplemented with yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell walls, in the presence or absence of aflatoxin B1

Gabriela Gómez Verduzco^a, Arturo Cortés Cuevas^a, Carlos López Coello^a, José Arce Menocal^b, Carlos Vásquez Pelaez^c, Ernesto Avila González^a

RESUMEN

Se realizaron dos experimentos con pollos Ross 308 alimentados con dietas sorgo+ pasta de soya. En el Exp 1, se empleó un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos y tres repeticiones de 36 pollos con una duración de 49 días. Los tratamientos fueron: 1) dieta sorgo+ pasta de soya, 2) como 1+ paredes celulares de levadura (PCL), 3) como 1+ antibiótico promotor bacitracina cinc 30 ppm (APC) y 4) como 1+ PCL+APC. Los resultados en 49 días indicaron que las PCL y los APC mejoraron la ganancia de peso ($P < 0.05$), incrementando este efecto cuando se adicionaron juntas las PCL y el APC en la dieta. La respuesta inmune celular y la respuesta humoral sistémica ($P < 0.05$) aumentaron por efecto de las PCL. La adición de PCL y APC incrementaron ($P < 0.05$) la longitud de las vellosidades intestinales medidas en duodeno a los 21 días edad. En el Exp 2, se empleó un arreglo factorial 2 x 2 con seis réplicas de seis pollos con una duración de 21 días de edad. Los factores a considerar fueron: con y sin la adición de 0.05 % PCL; y con y sin la contaminación de 400 mg/t de aflatoxina B1. Los datos a los 21 días de edad para ganancia, consumo y conversión fueron similares ($P > 0.05$) para ambos factores; sin embargo la respuesta inmune humoral y la respuesta celular ($P < 0.05$) incrementaron con PCL y disminuyeron con AFB1. Los resultados de este estudio indican que las PCL, mejoran el crecimiento de los pollos e incrementan la respuesta celular y humoral.

PALABRAS CLAVE: Paredes celulares, *Saccharomyces cerevisiae*, Respuesta inmune, Aflatoxina, Bacitracina.

ABSTRACT

Two experiments were conducted on broilers Ross 308 fed sorghum-soybean meal diets. In Exp 1, broilers from 0 to 49 d of age were used in a completely randomized design with four treatments and three replicates of 36 chicks each one, the treatments were: 1) Control diet, 2) As 1+ wall cell yeast (YWC), 3) As 1+ Bacitracine zinc 30 ppm (GPA) and 4) As 1+ YWC+ GPA. The YWC and GPA improved at 49 d the weight gain ($P < 0.05$), being greater the effect when the YWC + GPA. The cell immune response evaluated by the basophilic hypersensitivity test and the humoral immune response measured by antibodies titers against Newcastle disease (ND) ($P < 0.05$), the YWC ameliorated the response. The addition of YWC and GPA increased ($P < 0.05$) the duodenal villi length measured at the 21 d age. In Experiment 2, Ross broilers from 1 to 21 d of age were fed diets contaminated or not with aflatoxin B1 (AFB1). A completely randomized design 2 x 2 factorial arrangement with six repetitions of six chickens each one were used. The factors were presence or absence of 0.05% YWC and presence or absence of AFB1 (400 mg/t). The 21 d of age data for weight gain, feed intake, feed conversion were similar ($P > 0.05$) for both factors; nevertheless the humoral immune response against NCD and the cellular immune response increased ($P < 0.05$) with YWC and decreased with AFB1. These data indicated that the YWC added in sorghum-soybean meal diets improve the growth and increase the cellular and humoral immune response of broilers.

KEY WORDS: Yeast cell walls, *Saccharomyces cerevisiae*, Immune response, Aflatoxin, Bacitracin.

Recibido el 12 de septiembre de 2008. Aceptado para su publicación el 24 de noviembre de 2008.

^a Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 04510, México, D.F. gagove@servidor.unam.mx. Correspondencia al primer autor.

^b Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

^c Departamento de Bioestadística y Genética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

INTRODUCCIÓN

El empleo de los antibióticos promotores del crecimiento (APC), como aditivo en la alimentación animal desde hace más de 50 años, ha mostrado la posibilidad de generar microorganismos resistentes a este tipo de antibióticos⁽¹⁾. En 2006, se prohibieron en la comunidad europea y se estudian alternativas a los APC⁽²⁾.

En la alimentación de las aves se utilizan cereales y otros granos, los cuales se pueden contaminar con hongos. Los del género *Aspergillus*; algunas especies producen compuestos heterocíclicos denominadas aflatoxinas cuyos efectos biológicos sobre los organismos pueden ser carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos. Estos efectos son influidos por variaciones de especie, sexo, edad, estado nutricional, efectos con otros químicos, dosis y el período de exposición^(3,4). El problema que producen es hepatotóxico, pudiendo provocar también problemas renales⁽³⁾. Su efecto citotóxico se debe por la peroxidación de lípidos; las aflatoxinas también inhiben la síntesis de DNA y RNA, producen transversiones de guanina por timina, e inducen la separación de DNA, que se traduce en mutaciones y formación de tumores (efectos carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos)⁽⁵⁾. Se ha encontrado un efecto en la reducción la síntesis de vitamina K y un efecto inmunodepresor⁽⁶⁾.

Para evitar el efecto nocivo de las aflatoxinas, se debe evitar su producción por parte del hongo, la destoxificación de alimento y bodegas contaminados y por último, la inhibición de la absorción de aflatoxinas en el tracto digestivo⁽³⁾.

Las paredes celulares de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* (PCL) pueden ser una alternativa a los APC⁽⁷⁾. Los oligosacáridos⁽⁸⁾ de las PCL de *Saccharomyces cerevisiae* en su mayoría son β -glucanos y mananoligosacáridos (MOS). El porcentaje de oligosacáridos presentes en las PCL es del 85 al 90 % siendo el 10 o el 15 % restante proteínas. Estudios con la suplementación de PCL^(9,10,11), fracciones purificadas de estas en dietas para pollos y pavos mejoraron los parámetros productivos^(11,12). Los mecanismos específicos de

INTRODUCTION

Antibiotic growth promoters (AGP) have been included in animal diets for over 50 years, but it is now known that their use can generate antibiotic-resistant microorganisms⁽¹⁾. Partially due to this phenomenon, the European Union prohibited the use of APG in 2006, adding impetus to the search for viable alternative growth promoters⁽²⁾.

Poultry diets normally include cereals and other grains, which can become contaminated with fungi. *Aspergillus* genus fungi produce heterocyclic compounds called aflatoxins with carcinogenic, mutagenic and teratogenic effects. These effects vary by species, sex, age, nutritional condition, interaction with other chemicals, dosage and length of exposure^(3,4). Aflatoxins hepatotoxic properties can lead to renal problems⁽³⁾. They can also be cytotoxic due to lipid peroxidation; inhibit DNA and RNA synthesis; produce transversion of guanine and thymine; and induce DNA separation, which can translate into mutations and tumor formation (i.e. carcinogenic, mutagenic and teratogenic effects)⁽⁵⁾. In addition, they are known to reduce vitamin K synthesis and to have an immunodepressant effect⁽⁶⁾. Aflatoxins toxic effects can be avoided by preventing their production by fungi, detoxifying contaminated feed and warehouses, and/or inhibiting their absorption in the digestive tract⁽³⁾.

Cell walls of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* have been proposed as an alternative to AGP⁽⁷⁾. The oligosaccharides in *S. cerevisiae*, mainly β -glucans and mannanoligosaccharides, account for 85 to 90 % of its cell walls, the remaining 10 to 15 % being proteins. Supplementation of chicken and turkey diets with *S. cerevisiae* cell walls, or purified fractions, improves productive parameters⁽⁹⁻¹²⁾. The specific action mechanisms behind this response have not been identified, although it does positively affect intestinal integrity⁽¹³⁾, pathogen exclusion, and immunostimulation against Salmonella infections^(14,15). Mannan oligosaccharides have been shown capable of sequestering aflatoxin B1 and thus reducing its gastrointestinal absorption⁽¹⁶⁾. Administration of β -glucans in murine models has

acción no han sido determinados, pero se detectó un efecto positivo sobre integridad intestinal⁽¹³⁾ exclusión de patógenos e inmunoestimulación contra infecciones por *Salmonella*^(14,15). En un estudio, se demostró la capacidad de los MOS para secuestrar aflatoxina B1 (AFB1) reduciendo su absorción gastrointestinal⁽¹⁶⁾. Por otra parte, la administración de β -glucanos en modelos murinos demostraron efecto positivo y adyuvante en la respuesta inmune⁽¹⁷⁻²¹⁾. Su uso en dietas para perros, aumentó la actividad de los neutrófilos en respuesta a la vacunación⁽²²⁾. Con estos antecedentes se planteó el presente estudio, para evaluar la adición de PCL en dietas con base en sorgo-soya, con y sin un contaminante, para pollos de engorda en su comportamiento productivo y respuesta inmunológica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron 2 experimentos; todos los procedimientos de manejo que involucraron a las aves cumplieron con los requisitos señalados por el Comité Institucional para el cuidado y uso de los animales experimentales (CICUAE FMVZ-UNAM con base en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999). La temperatura de crianza fue disminuida gradualmente iniciando con 32 °C, hasta llegar a 21 °C en el día 28 de edad. Las dietas empleadas en los tratamientos fueron a base de sorgo-soya. El agua y el alimento se proporcionaron a libre acceso.

Experimento 1

Se realizó con 432 pollitos mixtos (50 y 50 % de cada sexo) Ross 308, de 1 día de edad, los cuales se alojaron de manera aleatoria en 12 pisos con cama de viruta de madera. Se empleó un diseño completamente al azar de cuatro tratamientos, con tres réplicas de 36 pollos cada una. Tratamiento 1, dieta testigo (iniciación y finalización) sin promotores de crecimiento; Tratamiento 2, como 1 + PCL (Saf-mannan.Lesaffre Feed Additives) 0.05 %; Tratamiento 3, como 1 + APC (Bacitracina cinc 30 ppm); y Tratamiento 4, como 1 + 0.05 % PCL y 30 ppm de APC (Cuadro 1).

shown a positive and adjuvant effect in immune response⁽¹⁷⁻²¹⁾, and when used in diets for dogs has increased neutrophil activity in response to vaccination⁽²²⁾. Considering the above results, the present study objective was to compare productive parameters in broiler chicks fed sorghum-soybean diets containing *S. cerevisiae* cell walls and/or the antibiotic growth promoter zinc bacitracin, and evaluate productive parameters and immune response in broiler chicks fed a sorghum-soybean diet containing *S. cerevisiae* cell walls, in the presence and absence of aflatoxin B1.

MATERIALS AND METHODS

Two experiments were carried out which complied with poultry management guidelines of the Institutional Committee for care and use of experimental animals (CICUAE FMVZ-UNAM based on Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999). Temperature during the experiments was lowered gradually from 32 °C at one day of age to 21 °C at 28 d of age. All diets were based on sorghum and soybean, and water and feed were provided ad libitum. Birds and feed were weighted throughout the experiments to generate weight gain, feed intake and feed conversion ratio (FCR) data. All data are for 0 to 21 d and 0 to 49 d, if effect was observed.

Experiment 1

A total of 432, one-d-old Ross 308 chicks (1:1 sex ratio) were distributed randomly in 12 floors with sawdust. Experimental design was completely random with four treatments of three replicates each, and 36 chicks per replicate. The treatments consisted of a control diet containing no growth promoters (Treatment 1, starting and finishing) (Table 1); Treatment 2, the control diet with added 0.05% yeast wall cells (YWC; Saf-mannan, Lesaffre Feed Additives); Treatment 3, the control diet with added 30 ppm antibiotic growth promoter (AGP; zinc bacitracin); and Treatment 4, the control diet with added 0.05% YWC and 30 ppm AGP.

Experiment 2

A total of 144, one-d-old Ross 308 chicks (1:1 sex

Experimento 2

Se emplearon 144 pollitos mixtos (50 y 50 % de cada sexo) Ross 308, de 1 día de edad, los cuales se alojaron de manera aleatoria en baterías de ambiente controlado Petersime. Se empleó un diseño completamente al azar, con arreglo factorial 2 x 2, con seis réplicas de seis pollos cada una. Un factor fue con y sin la adición de 0.05 % PCL a la dieta testigo de iniciación (Cuadro 1) y el otro factor con y sin la contaminación de 400 mg/t de AFBI.

Las aflatoxinas se obtuvieron por contaminación natural de maíz, con *Aspergillus flavus link*; el cual produce aflatoxinas B1 y B2. El material cuantificado en aflatoxina B1 fue donado por la unidad de investigación en granos y semillas de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Las aves y el alimento se pesaron, para obtener datos de la ganancia de peso, el consumo de alimento e índice de conversión. Los datos obtenidos fueron de 0 a 21 días y de 0 a 49 días de edad, si había un efecto.

Respuesta inmune humoral. Para conocer si existía efecto inmunoestimulante de PCL a nivel sistémico, se realizó una vacunación simultánea, por vía ocular virus vivo y vía subcutánea, virus inactivado con el virus de la enfermedad Newcastle. A los diez días de edad en el Exp 1, se tomaron muestras de sangre a los días 7 y 14 días post-vacunación (cinco muestras/réplica). Para el Exp 2, las muestras se tomaron los días 4 y 11 días post-vacunación (9 muestras/tratamiento), se obtuvieron los sueros y se congelaron a -20 °C, para posteriormente determinar títulos de anticuerpos séricos específicos para el virus de Newcastle con la prueba de Inhibición de la hemoaglutinación.

IgA traqueal

Con hisopos estériles, se tomaron muestras en el Exp 2 de exudados traqueales, el día 21 de edad (cinco muestras/ tratamiento), que se colocaron en tubos con PBS estéril y se centrifugaron a 1,200 xg, se tomó el sobrenadante y se congeló a -20 °C para su posterior evaluación con la prueba de ELISA.

ratio) were distributed randomly in environmentally-controlled Petersime batteries. Experimental design was completely random with a 2 x 2 factorial arrangement and six replicates of six chicks each. One factor was presence and absence of 0.05% YCW in diet (Table 1) and the other factor was

Cuadro 1. Composición de las dietas testigo empleadas en los experimentos (kg/t)

Table 1. Starting and finishing control diet composition (kg/t)

Ingredients	Starting (0-3 wk)	Finishing (4-7 wk)
Sorghum	522.926	563.932
Soybean meal	382.754	332.153
Vegetable oil	50.566	60.369
Orthophosphate	18.737	16.558
Calcium carbonate	13.678	12.573
NaCl	4.194	3.716
DL-Methionine	2.512	1.949
Vitamin premix*	1.000	1.000
Mineral premix**	1.000	1.000
Choline chloride 60%	1.000	0.800
L-lysine HCl	0.983	0.000
Cocciostat***	0.500	0.500
Antioxidant	0.150	0.150
Yellow coloring (<i>Tagetes erecta</i>)	0.000	5.300
Total	1000	1000
	Calculated analysis	
ME, kcal/kg	3100	3200
Crude protein, %	22.00	20.09
Lysine, %	1.20	1.00
Methionine + cysteine, %	0.900	0.800
Calcium, %	1.00	0.90
Available phosphorous, %	0.50	0.45

*Provides per kilogram: Vitamin A, 12'000,000 UI; Vitamin D3, 2'500,000 UI; Vitamin E, 15,000 UI; Vitamin K3, 2.0 g; Vitamin B1 2.25 g; Vitamin B2, 7.5 g; B12 20 mg; Pyridoxine, 3.5 g; Calcium pantothenate, 12.5 g; Niacin, 45 g; Biotin, 125 mg; Choline chloride, 250 g; Folic acid, 1.5 g.

**Provides per kilogram: Selenium, 200 mg; Cobalt, 0.20 g; Iodine, 0.30 g; Copper, 12 g; Zinc, 50 g; Iron, 50 g; Manganese, 110 g; Vehicle sufficient for 1000 g.

***Starting (Nicarbazin), Finishing (Salinomycin).

**** All added contaminated corn, YCW and zinc bacitracin replaced an equal amount of sorghum.

IgA intestinal

En el Exp 1, se sacrificaron por dislocación cervical 10 pollos por tratamiento, se tomaron 10 cm de duodeno, posteriormente se realizaron lavados con 10 ml de PBS frío y estéril, pasando tres veces el PBS en la fracción del lumen intestinal, se recolectó y se centrifugó a 1,200 $\times g$; se tomó el sobrenadante y se congeló a -20 °C para su posterior evaluación con la prueba de ELISA.

ELISA

Las placas de 96 pozos de fondo plano se cubrieron con IgA (Chicken IgA ELISA¹ Quantitation Kit Bethyl Laboratories Inc PO Box 850 Montgomery TX 77356) de pollo previamente reconstituida en buffer de carbonatos (0.05M pH 9.6) toda la noche a 4 °C. Se lavaron tres veces con PBS adicionado de Tween-20 al 0.05 %, Se añadió solución de bloqueo PBS leche descremada al 0.5 %, Sacarosa 0.2 %, se lavaron y se depositaron las muestras de los lavados intestinales y traqueales y se incubaron 1 h a 37 °C. Posteriormente se retiraron y se lavaron cinco veces con PBS Tween-20 al 0.05 %. Se añadió el conjugado HRP (goat anti-chicken IgA-HRP de Bethyl Laboratorios Inc.) incubándose, y nuevamente se realizaron cinco lavados, para añadir el sustrato ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid), con el que se incubó durante 20 min, la reacción se detuvo con la adición de solución de paro (H₂SO₄ 2M) se realizó la lectura de la absorbancia 405 nm en un espectrofotómetro Beckton Dickenson.

Respuesta inmune celular

Hipersensibilidad cutánea basofílica. La evaluación se llevó a cabo en ambos experimentos, el día 14 de edad mediante una prueba de hipersensibilidad tardía⁽²³⁾, como respuesta a la inoculación intradérmica en la membrana interdigital de las falanges 3 y 4 de la extremidad inferior derecha, empleándose 2 pollos/ réplica, 12/tratamiento, con Phitoheamaglutinina (PHA-A Sigma-Aldrich, Inc) a una concentración de 0.1 mg/0.1 ml. En la membrana interdigital de la pata izquierda, se realizó el mismo procedimiento utilizando solución salina estéril (0.1 ml) como testigo. A las 24 h

presence or absence of 400 mg/t aflatoxin B1 (AFB1). Aflatoxins were obtained from natural inoculation of corn (*Zea mays*) with *Aspergillus flavus link*, which produces aflatoxins B1 and B2. Material with quantified AFB1 was donated by the Grain and Seed Research Unit of the Cuautitlán Faculty of Higher Studies (Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán), Autonomous National University of Mexico (Universidad Nacional Autónoma de México).

Humoral immune response

Any immune stimulant effect of the YCW at the systemic level was identified by inoculating live Newcastle disease virus (NDV) in the eyes and inactive NDV subcutaneously. In Exp 1, vaccinations were done at d 10 and serum samples were taken 7 and 10 d post-vaccination (5 samples/replicate). In Exp 2, vaccinations were done at d 10 and samples taken 4 and 11 d post-vaccination (9 samples/replicate). Serum samples were stored at -20 °C. Newcastle disease virus blood antibody titers were determined using the haemagglutination inhibition test.

Tracheal IgA

As part of Exp 2, tracheal exudates were taken at 21 d (five samples/treatment) using sterile swabs. Swabs were placed in tubes with sterile PBS, centrifuged at 1200 $\times g$, the supernatant collected and stored at -20 °C for later analysis by ELISA.

Intestinal IgA

In Exp 1, 10 chicks per treatment were sacrificed by cervical dislocation and a 10 cm section removed from the gut of each animal. Gut sections were washed with 10 ml of cold, sterile PBS by passing the PBS three times through the section. The sample was collected, centrifuged at 1200 $\times g$, the supernatant collected and stored at -20 °C for later analysis by ELISA.

ELISA

Chicken IgA (ELISA¹ Quantification Kit, Bethyl Laboratories, Inc., PO Box 850, Montgomery, TX 77356) previously reconstituted in carbonate buffer (0.05M, pH 9.6) was placed on a 96-well flat-bottom plate and left overnight at 4 °C. After that

pos-inoculación, se determinó el grosor de la membrana interdigital con un vernier digital.

Hematología

Se tomaron muestras de sangre con s-monovette EDTA (Sarstedt AG & Co) de las venas radiales de tres pollos por réplica /tratamiento los días 21, 35 y 49 (Exp 1). Se realizó el conteo leucocitario diferencial en frotis sanguíneos teñidos con Wright, Las cuentas totales se determinaron indirectamente por el cálculo de los porcentajes de la célula y de cuentas totales⁽²⁴⁾.

Histología

En el Exp 1, se sacrificaron 10 de pollos de cada tratamiento a los 21 días de edad, se tomaron muestras de tejido intestinal de 2 cm de longitud, posteriores al divertículo Meckel, se fijaron en formalina buferada al 10 %, para posteriormente ser procesados, montados en portaobjetos y teñidos con hematoxilina-eosina (Sigma Aldrich) conforme al método de rutina convencional⁽²⁵⁾, para su posterior observación y evaluación mediante microscopía óptica. Se midió en micras (µ) la longitud y el grosor de las vellosidades intestinales.

the plates were washed three times with PBS containing 0.05% Tween-20. PBS blocking solution (0.5% skim milk, 0.2% sucrose) was added and incubated. The intestinal and tracheal wash samples were then incubated for 1 h at 37 °C, removed and washed three times with PBS containing 0.05% Tween-20. Goat anti-chicken IgA-HRP conjugate (Bethyl Laboratories, Inc.) was added, and the plates were incubated again and washed. ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) substrate was added, the samples were incubated for 20 min, and the reaction was stopped with stop solution (2M H₂SO₄). Absorbance was read with a spectrophotometer (Beckton Dickenson) at 405 nm.

Cellular immune response

Basophilic cutaneous hypersensitivity. A delayed basophilic hypersensitivity test⁽²³⁾ was done in both experiments at 14 d of age. Response was measured to intradermal inoculation of 0.1 mg/0.1 ml phytohemagglutinin (PHA-A Sigma-Aldrich, Inc.) in the interdigital membrane between phalanges 3 and 4 of the right foot (two animals per replicate, i.e. 12 animals per treatment). As a control, 0.1 ml sterile saline solution was injected intradermally at

Cuadro 2. Efecto de la adición paredes celulares de levadura y Bacitracina cinc en dietas de pollos de engorda de 0 a 21 y 0 a 49 días de edad (Exp. 1)

Table 2. Production parameters in broilers fed diets supplemented with yeast cell walls and/or zinc bacitracin at 21 and 49 d of age (Exp. 1)

Variable	Age (days)	Treatments				Prob. <i>F</i>
		Control	YCW*	AGP**	YCW* +AGP**	
Weight gain, g	21	713±6.3 ^b	732±3.5 ^{ab}	720±18.5 ^{ab}	750±3.8 ^a	0.000
	49	3040±24.0 ^a	3137±47.9 ^{ab}	3091±7.3 ^{ab}	3160±57.0 ^a	0.05
Mean		1876±520 ^b	1935±538 ^{ab}	1905±530 ^{ab}	1955±539 ^a	
Feed intake, g	21	959±17.23 ^a	1025±18.98 ^a	995±13.28 ^a	969±16.38 ^{ab}	0.000
	49	5914±22.50 ^b	6045±88.81 ^b	5777±47.55 ^b	5955±62.46 ^b	0.063
Mean		3436±1108 ^a	3535±1123 ^a	3386±1067 ^a	3461±1115 ^a	
FCR ^{***} , g/g	21	1.33±0.02 ^a	1.4±0.02 ^a	1.38±0.02 ^a	1.35±0.05 ^a	0.509
	49	1.94±0.02 ^b	1.92±0.04 ^b	1.86±0.01 ^b	1.88±0.03 ^b	0.298
Mean		1.63±0.14 ^a	1.67±0.12 ^a	1.62±0.11 ^a	1.62±0.12 ^a	

*Yeast cell walls; **Antibiotic growth promoter (zinc bacitracin); ***Feed conversion ratio.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de las variables en estudio, se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza conforme al diseño experimental empleado. Las variables productivas así como el índice hematológico del Exp 1, se analizaron mediante un diseño completamente al azar con mediciones repetidas según el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS⁽²⁶⁾. Cabe mencionar también, que los títulos de anticuerpos en ambos experimentos, se sometieron a una transformación logarítmica base 2.

RESULTADOS

Experimento 1

Los resultados de las variables productivas, se muestran en el Cuadro 2. Se puede apreciar que la ganancia de peso, ($P < 0.05$), mejoró con la adición de PCL, APC y la suplementación conjunta de PCL y APC. Para consumo de alimento y conversión alimenticia, no se detectaron diferencias entre los tratamientos ($P > 0.05$).

La inclusión de PCL y APC en la dieta de los pollos incrementó la longitud de las vellosidades intestinales, siendo mayor este efecto con la adición conjunta ($P < 0.01$); sin embargo, el grosor de las vellosidades ($P < 0.05$) disminuyó con la suplementación de ambos promotores (Cuadro 3).

El perfil hematológico mostró diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.01$) en linfocitos, heterófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos

the same site on the left foot. Interdigital membrane thickness was measured 24 h post-inoculation with a digital vernier.

Hematology

In Exp 1, blood samples were taken from the radial vein (three animals per replicate/treatment) at 21, 35 and 49 d, using S-monovette/EDTA tubes (Sarstedt AG & Co., Numbrecht, Germany). Differential leukocyte counts were done in Wright-stained blood smears. Total counts were calculated indirectly based on cell counts and total counts⁽²⁴⁾.

Histology

In Exp 1, ten chicks per treatment were killed at 21 d of age and 2 cm long samples taken of gut tissue, after to Meckel's diverticulum. Samples were fixed in 10% buffered formalin, sections were cut and put on slides and stained with hematoxylin-eosin (Sigma-Aldrich) following a conventional method⁽²⁵⁾. Measurements of intestinal villus length and thickness were taken in microns (μ) with an optical microscope.

Statistical analysis

Study variables were analyzed with an ANOVA following the experimental design. In Exp 1, the productive variables and hematological index were analyzed with a completely random design including repeated measurements using the GLM procedure in the SAS statistical package⁽²⁶⁾. Antibody titers in both experiments were base-two logarithm transformed.

Cuadro 3. Grosor y longitud de las vellosidades intestinales en duodeno de pollos suplementados con paredes celulares de levadura y bacitracina cinc (Exp. 1)

Table 3. Intestinal (duodenum) villus length and width in broilers fed diets supplemented with yeast cell walls and/or zinc bacitracin (Exp. 1)

	Treatments				Prob. <i>F</i>
	Control	YCW*	AGP**	YCW*+AGP**	
Villus					
Thickness (μ)	106.39±6.74 ^{ab}	109.93±8.08 ^a	91.28±5.02 ^{ab}	87.06±3.53 ^b	0.05
Length (μ)	1274.75±54.10 ^b	1457±44.09 ^{ab}	1493.33±24.45 ^a	1570±44.21 ^a	0.01

*Yeast cell walls; **Antibiotic growth promoter (zinc bacitracin).

Cuadro 4. Índices hematológicos en pollos de engorda con paredes celulares de levadura y bacitracina cinc (Exp. 1)
 Table 4. Hematological index in broilers fed diets supplemented with yeast cell walls and/or zinc bacitracin (Exp. 1)

Cell	Day	Treatments				SE	Prob. <i>F</i>
		Control	YCW*	AGP**	YCW*+AGP**		
Lymphocytes, %	8	61.9	64.9	61.8	65.1	3.15	0.0001
	17	54.9	65.0	65.0	69.9		
	24	55.0	69.2	66.2	67.3		
	Average	58.8 ^c	64.4 ^a	66.2 ^b	67.4 ^a		
Heterophils, %	8	22.2	20.7	21.6	20.7	2.29	0.0001
	17	24.6	22.0	22.4	19.1		
	24	28.8	19.4	20.8	20.1		
	Average	25.2 ^a	20.7 ^{bc}	20.8 ^b	20.0 ^c		
Eosinophils, %	8	1.8	1.2	2.1	1.6	0.70	0.0001
	17	1.6	1.1	0.7	0.3		
	24	1.6	0.8	0.7	0.7		
	Average	1.6 ^a	1.0 ^b	0.7 ^b	0.9 ^b		
Basophils, %	8	3.3	2.3	3.4	2.3	0.87	0.0001
	17	2.4	1.8	2.2	1.3		
	24	3.2	1.1	1.3	1.7		
	Average	3.0 ^a	1.7 ^b	1.3 ^c	1.8 ^b		
Monocytes, %	8	10.8	10.9	11.1	10.3	1.39	0.002
	17	12.0	10.1	9.7	9.3		
	24	11.4	9.7	11.0	10.2		
	Average	11.4 ^a	10.2 ^b	11.0 ^b	10.0 ^b		

*Yeast cell walls; **Antibiotic growth promoter (zinc bacitracin).

(Cuadro 4). Se observa en general que los linfocitos aumentaron al adicionar los promotores de crecimiento en la dieta; sin embargo, el porcentaje de heterófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos disminuyó ($P < 0.01$) con la suplementación de PCL Y APC.

La respuesta inmune humoral sistémica que aparece en el Cuadro 5, mostró que los títulos de anticuerpos séricos contra el virus de la enfermedad de Newcastle, en los tratamientos con PCL y APC+ PCL fueron mayores ($P < 0.05$).

La respuesta inmune humoral local, cuantificando la concentración de IgA intestinal; fue mayor ($P < 0.05$) en los tratamientos con PCL+ APC.

Para la respuesta celular evaluada con la prueba de hipersensibilidad tardía basofílica, se encontró un

RESULTS

Experiment 1

Weight gain improved ($P < 0.05$) in the YCW, AGP and YCW+ AGP treatments (Table 2). No differences ($P > 0.05$) were observed between treatments for feed intake and FCR. Intestinal villus length increased in the YCW and AGP treatments, and was longest ($P < 0.01$) in the YCW+ AGP treatment. However, villus thickness decreased ($P < 0.05$) in the AGP and YCW+ AGP treatments (Table 3). The hematological profiles showed that lymphocyte counts generally increased in the PWC, AGP and YCW+ AGP treatments, although the heterophil, eosinophil, basophil and monocyte percentages decreased ($P < 0.01$) in all treatments (Table 4). Blood element percentages differed ($P < 0.01$) between treatments. Blood NDV antibody titers were higher ($P < 0.05$) in the YCW and

Cuadro 5. Respuesta inmune humoral y celular en dietas de pollo de engorda con paredes celulares de levadura y bacitracina cinc (Exp. 1)

Table 5. Blood and cellular immune response in broilers fed diets supplemented with yeast cell walls and/or zinc bacitracin (Exp. 1)

Variable	Treatments				SE	ProbF
	Control	YCW*	AGP**	YCW*+AGP**		
NDV HI ^{log2+}	5.75 ^c	7.75 ^a	6.37 ^{bc}	7.5 ^{ab}	0.22	0.01
Intestinal IgA OD ⁺⁺	0.891 ^c	0.998 ^{bc}	1.272 ^{ab}	1.337 ^a	0.05	0.05
DBH mm ⁺⁺⁺	0.5722 ^b	0.7656 ^{ab}	5456 ^b	0.8744 ^a	0.0873	0.05

*Yeast cell walls; **Antibiotic growth promoter (zinc bacitracin); +Base-two transformed titers from Newcastle disease virus hemagglutination inhibition test. ++Optic density. +++Delayed basophilic hypersensitivity.

aumento en el grosor interdigital ($P < 0.05$) en los pollos suplementados con PCL+ APC.

Experimento 2

En el Cuadro 6, se aprecia que no se encontró diferencia ($P > 0.05$) entre factores, para ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia.

En el Cuadro 7, a los 11 días postvacunación (21 días de edad), se nota que los títulos de anticuerpos fueron mayores ($P < 0.05$) para la adición de PCL. En la evaluación de IgA traqueal no se encontró diferencia entre los factores, ni efecto de interacción.

Para la respuesta celular evaluada con la prueba de hipersensibilidad tardía basofílica, aumentó el grosor interdigital ($P < 0.05$) en los pollos por la adición de PCL, y hubo disminución con el factor aflatoxina ($P < 0.01$).

En el perfil hematológico, se mostró un efecto de interacción ($P < 0.05$) PCL x AFB1 en los leucocitos, linfocitos y heterófilos (Cuadro 8). Se aprecia que los leucocitos aumentaron con la suplementación de PCL, siendo mayor el porcentaje con la dieta sin contaminar, y los heterófilos disminuyeron con todas las dietas excepto el testigo. La población de linfocitos se incrementó con la adición de PCL; sin embargo en los pollos con las dietas contaminadas con AFB1 no se notó un efecto significativo.

Cuadro 6. Efectos mayores de la adición de paredes celulares de levadura en dietas sorgo-soya de pollos de 0 a 21 días de edad con y sin aflatoxina B1 (Exp. 2)

Table 6. Productive performance in broilers fed sorghum+soybean diets supplemented with yeast cell walls in the presence or absence of aflatoxin B1 at 21 d of age (Exp. 2)

	Weight gain (g)	Feed intake (g)	FCR ^{***}
YCW*			
Absent	785	1125	1.34
Present	797	1031	1.32
AFB1 ^{**}			
Absent	798	1101	1.34
Present	784	1055	1.31
SE	3.86	24.47	0.01
Source of variation			
YCW	0.125	0.577	0.183
AFB1	0.144	0.099	0.505
YCW + AFB1	0.531	0.561	0.631

*Yeast cell walls; **Aflatoxin B1; ***Feed conversion ratio.

YCW+ AGP treatments (Table 5). Local immune response (e.g. intestinal IgA concentration) was higher ($P < 0.05$) in the YCW+ AGP treatment. Finally, the delayed basophilic hypersensitivity test showed increased ($P < 0.05$) interdigital thickness in animals fed with the YCW+ AGP treatment.

Experiment 2

No differences ($P > 0.05$) between treatments were observed in weight gain, feed intake and FCR (Table 6).

DISCUSIÓN

La tendencia mundial hacia la eliminación de antibióticos promotores del crecimiento (APC) en los alimentos balanceados, ha originado una búsqueda de alternativas con beneficios similares a los APC. Las PCL de *Saccharomyces cerevisiae* adicionadas en dietas sorgo-soya al 0.05% mejoraron la ganancia de peso de los pollos ($P < 0.05$) a los 49 días de edad, de manera similar a la bacitracina, este efecto promotor del crecimiento concuerda con lo encontrado por algunos autores⁽⁹⁾. Este efecto promotor del crecimiento fue potenciado cuando se administraron de manera simultánea PCL y el antibiótico. Además, los resultados de este estudio confirman lo reportado por algunos autores^(10,13), quienes señalan que varios promotores nutricionales influyen en la función del intestino, ya que las PCL de *Saccharomyces cerevisiae* favorecieron la longitud de las

Cuadro 7. Efectos mayores de la inclusión paredes celulares de levadura en la respuesta inmune humoral y celular (Exp.2)

Table 7. Humoral and cellular immune response in broilers fed sorghum+soybean diets supplemented with yeast cell walls in the presence or absence of aflatoxin B1 at 21 d of age (Exp. 2)

	NDV HIlog ₂ ⁺	Tracheal IgAng/ml	DBH ⁺⁺ mm
YCW*			
Absent	5.0 ^{ab}	0.165	0.2867 ^b
Present	5.7 ^a	0.193	0.4808 ^a
AFB1**			
Absent	5.05 ^{ab}	0.151	0.3075 ^a
Present	4.90 ^b	0.193	0.2383 ^b
SE	0.19	0.01	0.04
		Source of variation	
YCW	0.05	0.584	0.001
AFB1	0.093	0.188	0.002
YCW + AFB1	0.010	0.591	0.068

*Yeast cell walls; **Aflatoxin B1; +Base-two transformed titers from Newcastle disease virus hemagglutination inhibition test. ++Delayed basophilic hypersensitivity.

^{ab}Different letter superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$).

Antibody titers increased ($P < 0.05$) with the YCW factor 11 d post-vaccination (21 d of age) (Table 7). The tracheal IgA test showed no differences ($P > 0.05$) between factors and no effect from factor interaction. In the delayed basophilic hypersensitivity test, interdigital thickness increased ($P < 0.05$) in animals in the YCW treatment, but in the presence of AFB1 no response was observed ($P < 0.01$). The YCW+ AFB1 interaction affected ($P < 0.05$) leukocyte, lymphocyte and heterophil percentages (Table 8). The leukocyte percentage increased in the YCW treatment, particularly in the absence of AFB1, whereas the heterophil percentage decreased in all the treatments except the control. Lymphocytes increased in the treatments containing YCW, although when coupled with AFB1 this increase was not significant.

DISCUSSION

The worldwide trend towards eliminating antibiotic

Cuadro 8. Perfiles hematológicos mayores en pollos alimentados con dietas adicionadas con paredes celulares de levadura y aflatoxina B1 (Exp. 2)

Table 8. Hematological index in broilers fed diets supplemented with yeast cell walls in the presence or absence of aflatoxin B1 at 21 d of age (Exp. 2)

	Leukocytes X10 ⁹ /L	Heterophils X10 ⁹ /L	Lymphocytes X10 ⁹ /L
YCW*			
Absent	4.4 ^a	1.51	2.2 ^b
Present	5.5 ^b	1.97	2.7 ^a
AFB1**			
Absent	5.2	2.09 ^a	2.4
Present	4.8	1.39 ^b	2.5
Control	4.23 ^b	2.74 ^a	1.97 ^b
YCW	6.20 ^a	1.44 ^b	2.93 ^a
AFB1	4.68 ^{ab}	1.20 ^b	2.56 ^{ab}
YCW+AFB1	4.89 ^{ab}	1.59 ^b	2.57 ^{ab}
SE	0.36	0.18	0.14
		Source of variation	
YCW	0.018	0.002	0.011
AFB1	0.312	0.02	0.502
YCW+AFB1	0.048	0.000	0.013

*Yeast cell walls; **Aflatoxin B1.

^{ab}Different letter superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$).

vellosidades intestinales, ejerciendo un efecto positivo en el tamaño ($P < 0.01$), esto a su vez pudiera favorecer la superficie de absorción de nutrientes. Los resultados del comportamiento productivo en el Exp 2, no se afectaron con la inclusión de AFB1 (400 µg/kg). Experimentalmente niveles 500 µg/kg durante tres semanas no causan reducción en el peso de los pollos⁽²⁷⁾; se ha observado reducción en el peso de las aves, con este nivel cuando se consume durante cuatro semanas⁽²⁸⁾. Díaz *et al*⁽²⁹⁾, proponen que la aflatoxicosis en aves puede generar un efecto de hormesis, fenómeno toxicológico que se caracteriza por estimular a dosis bajas e inhibir a dosis altas, la respuesta en los parámetros productivos.

La respuesta a la vacunación para evaluar funciones inmunes efectoras, como anticuerpos específicos para la enfermedad de Newcastle, indicó, que la adición de PCL incrementó el título de anticuerpos. Esto concuerda con lo publicado con algunos investigadores⁽³⁰⁾, quienes utilizaron una fracción purificada de PCL (mananoligosacáridos) y mostraron un aumento significativo en el título de anticuerpos en las reproductoras; así como, en la progenie.

Los hemogramas del Exp 1 indicaron un aumento de los linfocitos, lo que pudiera indicar que las PCL favorecieron el aumento de esta población celular, implicada de forma importante en la respuesta inmune. En los hemogramas del Exp 2, hubo cambios sólo en las poblaciones de leucocitos, heterófilos y linfocitos. Los pollos con aflatoxinas disminuyeron el porcentaje de leucocitos, neutrófilos y linfocitos en comparación con el tratamiento testigo provocando un estado de inmunodepresión⁽³¹⁾, esto puede deberse a lo descrito por Celik *et al*⁽³²⁾, quienes demostraron que en la inmunodepresión que inducen las aflatoxinas no sólo se deprimen las funciones celulares, sino también se disminuye el número de linfocitos T en sangre periférica y en tejidos linfoides. La dosis inmunotóxica de las aflatoxinas fue relativamente más baja, que las dosis necesarias para producir un decremento en el peso⁽³²⁾. Esto pudiera explicar que en el Exp 2 no se encontró efecto en los parámetros productivos, pero en el caso de las variables inmunológicas sí se encontró un efecto inmunodepresor por parte de la aflatoxina B1.

growth promoters (AGP) in balanced feed has led to a search for alternatives which provide benefits similar to AGP. The present results showed that addition of 0.05% cell walls from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum-soybean diets improved weight gain on broilers at 49 d of age to a similar degree to that observed with the AGP zinc bacitracin. This coincides with previously reported data⁽⁹⁾. The growth promoting properties of both the YCW and AGP were augmented when administered simultaneously. Nutritional growth promoters are also reported as influencing intestinal function^(10,13). The longer ($P < 0.01$) intestinal villus length observed here in the YCW treatments supports this statement in that it could increase the nutrient absorbing surface.

Addition of aflatoxin B1 (400 µg/kg) in the treatments in Exp 2 produced no effect on productive variables. The amount of AFB1 used here was lower than the 500 µg/kg used in other studies in which no weight reduction was observed after 3 wk in broilers⁽²⁷⁾; weight reduction has been reported at this dosage at 4 wk⁽²⁸⁾. In poultry, aflatoxicosis may generate an hormetic response, a toxicological phenomenon characterized by stimulation of productive parameters at low dosages and their inhibition at high dosages.

Evaluation of NDV antibodies indicated that addition of YCW increased the NDV antibody titer. This coincides with a reported increase in antibody titers in hens and chicks when administered mannan oligosaccharides (a purified YCW fraction)⁽³⁰⁾.

The increase in lymphocytes in Exp 1 may indicate that YCW favored an increase in the percentage of this cell type, which is vital to immune response. In Exp 2, changes were observed in leukocyte, heterophil and lymphocyte percentages. Birds administered AFB1 had lower leukocyte, neutrophil and lymphocyte percentages than the control, indicating immunodepression. This may be due to the fact that aflatoxin-induced immunodepression both lowers cellular function and diminishes the number of T-lymphocytes in peripheral blood and lymphoid tissues. The AFB1 dosage used here was lower than that required to produce weight loss⁽³²⁾. As a result, the productive parameters in Exp 2 were unaffected,

La respuesta inmune celular mostró que la adición en la dieta PCL, aumentó la respuesta celular evaluada por la prueba de hipersensibilidad cutánea basofílica; una posible explicación podría ser por la estructura química de las PCL, determinadas en su mayoría por azúcares, que funcionan como ligando de receptores de tipo lectinas, descritos en poblaciones celulares de linaje linfocítico. Por otro lado se ha descrito la presencia de los receptores tipo Toll^(33,34) presentes en diferentes células; que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos, (PAMP's) iniciando con la respuesta inmune innata. Se ha determinado, que los azúcares de tipo mananos y el zimosan; presentes en *Saccharomyces cerevisiae* estimulan TLR-4 y TLR-2 y TLR-6 respectivamente, lo que posteriormente desarrolla respuestas inmune específicas. Por estas implicaciones las PCL de *Saccharomyces cerevisiae*, se pueden considerar como estimulantes del sistema inmune, y promotoras del crecimiento al ser adicionadas en dietas sorgo + soya de pollos de engorda, por lo que resultan una alternativa al uso de antibióticos promotores del crecimiento como la bacitracina cinc.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Juan Carlos del Rio (FESC de la UNAM) por la donación del maíz con AFB1 para la realización de este trabajo. Al MVZ Miguel Angel Valadez (CEIEPA-FMVZ/UNAM) por su apoyo técnico en la realización de este trabajo.

LITERATURA CITADA

1. Jones FT, Ricke SC. Observations on the history of the Development of antimicrobials and their use in poultry feeds. *Poult Sci* 2003;82:613-617.
2. Patterson JA, Burkholder KM. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult Sci* 2003;82:627-631.
3. Mishra HN, Das C. A review on biological control and metabolism of aflatoxin. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2006;43:145-264.
4. Ellis WO, Smith JP, Simpson BK, Oldham JH. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. Review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1991;30:403-39.

whereas the immunological variables indicated an immunodepressant effect from AFB1.

Addition of YCW increased cellular immune response as documented by the basophilic cutaneous hypersensitivity test. This may result from the chemical structure of YCW, which consists mainly of sugars that function as a lectin-type receptor ligand, as described in lymphoid line cell populations. Toll-like receptors (TLRs) have been documented in different cells and function by recognizing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and then initiating the innate immune response^(33,34). The mannan and zimosan sugars present in *S. cerevisiae* stimulate TLR-4, and TLR-2 and TLR-6, respectively, which trigger specific immune responses. Cell walls of the yeast *S. cerevisiae* can therefore be considered an immune system stimulant and a growth promoter when added to sorghum+ soybean diets for broilers, and are a viable alternative to antibiotic growth promoters such as zinc bacitracin.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

The addition of cell walls of *Saccharomyces cerevisiae* in sorghum-soybean diets, increase growth on broilers and meliorate the immune responses cellular and humoral. A synergistic effect, was obtained when cell walls added with zinc bacitracin antibiotic growth promoter.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr. Juan Carlos del Rio (FESC, UNAM) for donation of AFB1-contaminated corn and Miguel Angel Valadez (CEIEPA-FMVZ/UNAM) for technical assistance.

End of english version

-
5. Hussein SH, Brasel JM. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 2001;167:101-134.
 6. Bababunmi EA, Thabrew I, Bassir O. Aflatoxin induced coagulopathy in different nutritionally classified animal species. *World Rev Nutr Diet* 1997;34:161-181.

7. Weststrate JA, Van Poppel G, Verschuren PM. Functional foods, trends and future. *Br J Nutr* 2002;88:233-235.
8. Swennen K, Courtin MC, Delcour JA. Non-digestible oligosaccharides with probiotic properties. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2006;46:459-469.
9. Arce MJ, Avila GE, López CC, García EA, García GF. Efecto de paredes celulares (*Sacharomyces cerevisiae*) en el alimento de pollo de engorda sobre los parámetros productivos. *Tec Pecu Mex* 2005;43:155-162.
10. Solis SF, Donoghue AM, Farnell MB, Huff GR, Huff WE, Donoghue DJ. Gastrointestinal maturation is accelerated in turkey poults supplemented with a mannan-oligosaccharide yeast extract (Alphamune). *Poult Sci* 2007;86:921-930.
11. Zhang AW, Lee BD, Lee SK, Lee KW, An GH, Song KB, Lee CH. Effects of yeast (*Sacharomyces cerevisiae*) cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broiler chick. *Poult Sci* 2005;84:1015-1021.
12. Chae BJ, Lohakare JD, Moon WK, Lee SL, Park YH, Hahn TW. Effects of supplementation of beta-glucan on the growth performance and immunity in broilers. *Res Vet Sci* 2006;80:291-298.
13. Arce MJ, Ávila GE, López CC. Comportamiento productivo y cambios morfológicos en vellosidades intestinales del pollo de engorda a 21 días de edad con el uso de paredes celulares de *Sacharomyces cerevisiae*. *Vet Méx* 2008;39:223-228.
14. Guo Y, Ali RA, Qureshi MA. The influence of β -glucan on immune responses in broiler chicks. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2003;25:461-472.
15. Spring P, Wenk C, Dawson KA, Newman KE. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella challenged broiler chicks. *Poult Sci* 2000;79:201-211.
16. Yiannikouris A, Andre G, Poughon L, Francois J, Dussap CG, Jeminet G, Bertin G, Jouany JP. Chemical and conformational study of the interactions involved in micotoxin complexation with β -D-Glucans. *Biomacromolecules* 2006;7:1147-1155.
17. Suzuki Y, Adachi Y, Ohno N. Th1/Th2 Balancing immunomodulating activity of gel forming (1-3) B-glucans from fungi. *Biol Pharma Bull* 2001;24:811-819.
18. Tsukada C, Yokoyama H, Miyaji C, Ishimoto Y, Kawamura H, Abo T. Immunomodulation of intraepithelial lymphocytes in the intestine by oral administration of β -glucan. *Cell Immunol* 2003;221:1-5.
19. Zhonggeum P, Otaka K, Maoka T, Hidaka K. Structure of β -glucan oligomer from *Laminarium* and its effect on Human Monocytes to inhibit the proliferation of U937 cells. *Biosci Biotech Biochem* 2005;69:553-558.
20. Harada T, Kawaminami H, Miura NN, Adachi Y, Nakajima M, Yadome T, Ohno N. Mechanism of enhanced hematopoietic response by soluble β -glucan SCG in cyclophosphamide-treated mice. *Microbiol Immunol* 2006;50:687-700.
21. Hida S, Miura NN, Adachi Y, Nakajima M, Ohno N. β -glucan derived from zymosan acts as an adjuvant for collagen-induced arthritis. *Microbiol Immunol* 2006;50:453-461.
22. Swanson KS, Grieshop CM, Flickinger EA, Healy HP, Dawson KA, Merchen NR, Fahey GC. Effect of supplemental fructooligosaccharides plus manna oligosaccharides on immune function and ileal and fecal microbial populations in adult dogs. *Arch Tierenahr* 2002;56:309-318.
23. Corrier DE, DeLoach JR. Evaluation of cell-mediated, cutaneous basophilic hypersensitivity in young chickens by an interdigital skin test. *Poult Sci* 1990;69:403-408.
24. Campbell TA. Avian hematology and cytology. 2nd ed. Iowa State University Press/Ames, 1995.
25. Luna, LG. Manual of histological staining methods of Armed Forces Institute of Pathology, 3rd ed. American Registry of Pathology. New York: McGraw-Hill; 1968.
26. SAS. SAS User's Guide: Statistics, (version 6 ed.) Cary NC, USA: SAS Inst Inc, 1995.
27. Tejada CIZ, Avila GE, Causaubon HMT, Cervantes ORA, Vásquez PC, Hernández BEM, Moreno ME. Biotransformation of aflatoxina contaminated chick feed. *Poult Sci* 2008;87:1569-1576.
28. Kubena LF, Harvey RB, Huff WE, Elissalde MH, Yersin AG, Phipps TD, Rottinghaus. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and diacetoxyscirperol. *Poult Sci* 1993;72:51-59.
29. Diaz GJ, Calabrese E, Blain R. Aflatoxicosis in chickens (*Gallus gallus*): an example of hormesis?. *Poult Sci* 2008;87:727-732.
30. Shashidhara RG, Devegowda G. Effect of dietary mannanoligosaccharide on breeder production traits and immunity. *Poult Sci* 2003;82:1319-1325.
31. Mitchell EB, Johns J. Avian hematology and related disorders. *Vet Clin Exot Anim* 2008;11:501-522.
32. Celik I, Oguz H, Demet O, Donmez HH, Boydak M, Sur E. Efficacy of polypyrrolidone in reducing the immunotoxicity of aflatoxin in growing broilers. *Br Poult Sci* 2000;41:430-439.
33. Roeder A, Kirschning CJ, Rupec RA, Schaller M, Weindl G, Korting HC. Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Rev Med Mycol* 2004;42:485-498.
34. Akira S. TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;311:1-16.

