



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA

**Elección de un método de conservación que
asegure la viabilidad de bacterias indígenas
probióticas y mejore la efectividad de
administración a terneros lactantes criados a
campo.**

AUTORA: Lic. Lorena Paola Soto

**DIRECTOR: Dr. Marcelo Raúl ROSMINI
CODIRECTOR: Dr. Osvaldo Luis Rossetti**

**Tesis para optar al grado de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas
Universidad Nacional del Litoral**

-2010-

A mi familia...

AGRADECIMIENTOS

A mi director, el Dr. Marcelo Rosmini por abrirme generosamente las puertas de su laboratorio y brindarme todo el apoyo y la confianza necesarios para poder crecer.

A mi codirector, el Dr. Osvaldo Rossetti, por aceptar gustosamente formar parte de este trabajo.

A las autoridades de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas por haber hecho posible la realización de mis estudios de posgrado.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias por haberme proporcionado el lugar físico para el desarrollo de esta tesis.

A los profesores del Departamento de Salud Pública Veterinaria: Prof. Rodolfo Dalla Santina, Prof. Enrique Martí y Prof. Gabriel Sequeira, por colaborar de diferentes maneras en este trabajo desde lo profesional, pero sobre todo por ser un grupo humano maravilloso.

A la memoria del Dr. Carlos Peralta, por su invaluable aporte en el estudio histopatológico de este trabajo, por la colaboración en los diseños de los experimentos y por compartir desinteresadamente su admirable caudal de conocimientos.

A la MSc. Natalia Salvetti y al Dr. Hugo Ortega por su imprescindible colaboración, cuya experiencia y predisposición, hicieron posible el estudio inmunohistoquímico,

A la Dra. Silvina Drago por su gran aporte en el desarrollo de los hidrolizados proteicos utilizados en esta tesis y por su gran predisposición en todo tiempo.

A mis compañeros y amigos Ezequiel Bertozzi y Virginia Zbrun, por estar cuando más los necesitaba, en la mesada, en el campo y en la vida.....Gracias!!!!

Al Dr. Marcelo Signorini por su aporte invaluable en los análisis estadísticos de este trabajo y su incondicional ayuda en todo momento y lugar.... Gracias Chelo!!!

A mis compañeros de trabajo en Córdoba: Luisina Lavari, Diego Valdés, Nadia Agüero, Mariano Garzón y todo el grupo colaborador, quienes llevaron adelante un arduo trabajo demostrando toda su profesionalidad y su gran calidad humana, convirtiendo las relaciones laborales en verdaderas amistades.

A mis alumnas pasantes Alejandra Diaz y Elizabeth Avataneo, quienes trabajaron incansablemente en diferentes partes de este trabajo.

A mi gran compañero y amigo Laureano Frizzo, quien me acompañó paso a paso durante todo este tiempo y cuya presencia fue imprescindible para que este trabajo se realizase. Ha sido un pilar básico en el diseño de los experimentos, aportando su experiencia en el laboratorio y plasmando los resultados en publicaciones, pero sobre todo ha sido mi gran sostén moral. Mis más sinceros y profundos agradecimientos.

LISTADO DE PRESENTACIONES A CONGRESOS Y PUBLICACIONES

Los resultados obtenidos en esta Tesis se difundieron parcialmente a través de las siguientes publicaciones y presentaciones a congresos:

Publicaciones:

Soto, L.P.; Frizzo, L.S.; Bertozzi, E.; Diaz A.; Martí, L.E.; Dalla Santina, R.; Sequeira, G.J. & Rosmini, M.R. 2009. Milk evaluation as growth and cold preservation medium of a probiotic inoculum for young calves. *J. Anim. Vet. Adv.* 8 (7), 1353-1360.

Soto, L.P.; Frizzo, L.S.; Bertozzi, E.; Avataneo, E.; Sequeira, G. & Rosmini, M. 2010. Molecular microbial analysis of *Lactobacillus* strains isolated from the gut of calves for potential probiotic use. *Med. Vet. Int.* In Press.

Comunicaciones a congresos:

Soto, L. P.; Frizzo, L. S.; Bertozzi, E., Bonazza, J. C; Sequeira, G.; Martí, E.; Rosmini, M. R. 2005. Aislamiento de ADN a partir de materia fecal de terneros lactantes para la obtención de amplicones del 16S rRNA del ecosistema bacteriano. VI Jornadas de Comunicaciones Técnico-Científicas de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL, 16, 17 y 18 de junio. p. 37.

Drago, S; Soto, L.P.; Frizzo, L.S.; Diaz, A.; Gonzalez, R. & Rosmini, M.R. 2006. Efecto de plasma bovino hidrolizado sobre el crecimiento de *Lactobacillus salivarius* DSPV 315T. II Simposio Internacional de Bacterias Lácticas. Primer encuentro Red BAL Argentina, San Miguel de Tucumán, 11 al 13 de octubre. p. 67.

Soto, L.P.; Drago, S; Frizzo, L.S.; Diaz, A.; Gonzalez, R. & Rosmini, M.R. 2006. Efecto de hidrolizados proteicos sobre el crecimiento de *Lactobacillus casei* DSPV 318T. II Simposio Internacional de Bacterias Lácticas. Primer encuentro Red BAL Argentina, San Miguel de Tucumán, 11 al 13 de octubre. p. 131.

Soto, L.; Frizzo, L.; Diaz, A.; Bertozzi, E.; Bonazza. J.; Sequeira, G.; Rosmini, M. 2006. La leche como medio de propagación y conservación de bacterias probióticas para terneros. Tercer Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 8 al 10 de noviembre. p.146.

- Soto, L.P.; Frizzo, L.S.; Bertozzi, E.; Avataneo, E.; Martí, L.E.; Sequeira, G.J.; Rosmini, M. R.** 2008. Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas integrantes de la microbiota intestinal de terneros jóvenes. IX Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas 2008. Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad Nacional de Rosario. Casilda, 6 de agosto de 2008. p. 226-227.
- Soto, L.P., Frizzo, L.S., Bertozzi, E., Zbrun, V., Sequeira G.J. & Rosmini M.R.** 2008. Application of *in vitro* methods for selection of bovine origin *Lactobacillus salivarius* strains as probiotics. V Congreso Argentino de Microbiología General. Sociedad Argentina de Microbiología General. Rosario, 25 y 26 de septiembre de 2008. p. 93.
- Soto, L.P.; Bertozzi, E.; Frizzo, L.S.; Avataneo, E.; Martí, L.E.; Rosmini, M.R.** 2008. Efecto de la bilis sobre el crecimiento de cepas de *Lactobacillus salivarius* de origen bovino. X Congreso y XXVIII Reunión Anual año 2008. Sociedad de Biología de Rosario. 3, 4 y 5 de diciembre. p. 151.
- Soto, L.P.; Frizzo, L.S.; Bertozzi, E.; Zbrun, M.V.; Martí, L.E.; Sequeira, G.J.; Rosmini, M. R.** 2009. Crecimiento de bacterias ácidos lácticas en diferentes condiciones de pH como criterio de selección de un inóculo probiótico para terneros. X Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas 2009. Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad Nacional de Rosario. Casilda, 16 de setiembre. p. 227-228.
- Soto, L.P.; Frizzo, L.S.; Zbrun, M.V.; Bertozzi, E.; Signorini, M.L.; Lavari, L.; Sequeira, G.; Dalla Santina, R.; Rosmini, M.R.** 2009. Modification of intestinal microbiota of young calves inoculated with lactic acid bacteria and infected with *Salmonella dublin*. III Simposio Internacional de II Bacterias Lácticas Segundo Encuentro de la Red Argentina de Bacterias Lácticas (Red-BAL). 15-17 de Septiembre. San Miguel de Tucumán-Tucumán, Argentina. p. 54.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Abreviaturas utilizadas	i
Índice de tablas	iv
Índice de figuras	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Diversidad de la microbiota intestinal e influencia en el estado de salud del hospedador	2
1.1.1. Funciones de la microbiota intestinal	2
1.1.2. Microbiota intestinal de terneros y utilización de antibióticos	3
1.2. Enfermedades infecciosas más comunes en terneros	5
1.2.1. <i>Salmonella</i>	5
1.2.2. <i>Escherichia coli</i>	6
1.3. Probióticos	7
1.3.1. Definición de probióticos	7
1.3.2. Mecanismos acción de los probióticos en el intestino	7
1.3.3. Microorganismos utilizados como probióticos	9
1.3.4. Técnicas de identificación de las diferentes especies	9
1.4. Selección de cepas probióticas	10
1.4.1. Capacidad de agregación	11
1.4.2. Producción de sustancias inhibitorias	12
1.4.3. Resistencia a las condiciones gastrointestinales	12
1.5. Propiedades tecnológicas del inóculo probiótico	12
1.5.1. Producción industrial	12
1.5.2. Enriquecimiento de los medios de cultivo	13
1.5.3. Conservación y administración de probióticos	14
1.5.3.1. Encapsulación	17
1.5.3.1.1. Técnicas de encapsulación	17
1.5.3.1.2. Materiales utilizados para encapsulación	21
2. OBJETIVOS	23
2.1. Hipótesis	24
2.2. Objetivo general	24

2.3. Objetivos específicos	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1. Aislamiento e identificación de BAL	26
3.1.1. Aislamiento de BAL	26
3.1.2. Aislamiento de ADN	26
3.1.3. Amplificación del gen 16S ARNr	26
3.1.4. ARDRA	27
3.1.5. Estudio <i>in silico</i>	27
3.1.6. Secuenciación	27
3.1.7. Números de acceso a las secuencias nucleotídicas	28
3.2. Evaluación de las propiedades probióticas de las cepas aisladas	28
3.2.1. Identificación de cepas patógenas utilizadas como indicadoras	28
3.2.2. Autoagregación	28
3.2.3. Coagregación con patógenos	29
3.2.4. Producción de sustancias inhibitoras	29
3.2.5. Influencia del pH sobre el crecimiento bacteriano	30
3.2.6. Efecto de diferentes concentraciones de bilis sobre el crecimiento bacteriano	30
3.3. Suplementación de leche con hidrolizados proteicos	31
3.3.1. Microorganismos	31
3.3.2. Medios de cultivo	31
3.3.3. Hidrolizados	31
3.3.4. Condiciones de crecimiento	31
3.3.5. Análisis estadístico	32
3.4. Conservación en condiciones de refrigeración y congelación	32
3.4.1. Microorganismos	32
3.4.2. Medios de propagación y conservación	32
3.4.3. Condiciones de crecimiento	32
3.4.4. Condiciones de almacenamiento	33
3.4.5. Análisis estadístico	33
3.5. Conservación de <i>L. casei</i> DSPV 318T por encapsulación en perlas de alginato de calcio y almidón	33
3.5.1. Ensayo de formación de cápsulas de alginato de calcio a partir de cultivos en diferentes medios	33

3.5.2.	Evaluación del efecto de la suplementación de leche sobre el crecimiento de <i>L. casei</i> DSPV 318T	34
3.5.3.	Producción de perlas de alginato de calcio con la adición de almidón	35
3.5.4.	Determinación del tiempo de secado de las cápsulas	36
3.5.5.	Producción y almacenamiento de perlas recubiertas con quitosano en diferentes condiciones de conservación	36
3.6.	Desafío experimental frente a <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T en terneros lactantes inoculados con lactosa y BAL conservadas por congelación	37
3.6.1.	Animales	37
3.6.2.	Diseño del experimento	38
3.6.3.	Microorganismos	38
3.6.4.	Selección de mutantes resistentes a antibióticos	38
3.6.5.	Preparación y administración del inóculo de BAL	38
3.6.6.	Inoculación del patógeno	39
3.6.7.	Recuperación del inóculo de BAL, <i>Lactobacillus</i> totales y otras poblaciones de la microbiota intestinal	39
3.6.8.	Perfil bioquímico sanguíneo y hemograma	40
3.6.9.	Toma de signos clínicos	40
3.6.10.	Detección de <i>Salmonella dublin</i> en sangre	41
3.6.11.	Detección de <i>Salmonella dublin</i> en materia fecal	41
3.6.12.	Necropsias	42
3.6.13.	Detección de <i>Salmonella dublin</i> en órganos del medio interno	42
3.6.14.	Procesamiento de las muestras para las técnicas histológicas	43
3.6.15.	Técnica de inmunohistoquímica	43
3.6.16.	Análisis de los resultados obtenidos con inmunohistoquímica	44
3.6.17.	Análisis de lesiones macro y microscópicas	45
3.6.18.	Análisis estadístico	48
3.7.	Evaluación de la performance de crecimiento de terneras suplementadas con 2 inóculos probióticos conservados por congelación	49
3.7.1.	Animales	49
3.7.2.	Diseño experimental	49
3.7.3.	Microorganismos	49

3.7.4. Selección de mutantes resistentes a antibióticos	50
3.7.5. Preparación y administración del inóculo de BAL	50
3.7.6. Recuento de la microbiota fecal	50
3.7.7. Análisis estadístico	50
4. RESULTADOS	51
4.1. Aislamiento e identificación de BAL	52
4.1.1. Identificación de BAL aisladas por la metodología de ARDRA	52
4.1.2. Estudio <i>in silico</i> de los perfiles de restricción	55
4.1.3. Identificación por secuenciación del gen 16S ARNr	55
4.2. Evaluación de las propiedades probióticas de las cepas aisladas	56
4.2.1. Identificación de cepas patógenas utilizadas como indicadoras	56
4.2.2. Autoagregación	56
4.2.3. Coagregación	58
4.2.4. Producción de sustancias inhibitoras	59
4.2.5. Influencia del pH sobre el crecimiento bacteriano	61
4.2.6. Efecto de diferentes concentraciones de bilis sobre el crecimiento bacteriano	65
4.3. Suplementación de leche con hidrolizados proteicos como medio de crecimiento de BAL	68
4.3.1. Obtención de los hidrolizados	68
4.3.2. Crecimiento de BAL en leche suplementada con hidrolizados de caseína	69
4.3.3. Crecimiento de BAL en leche suplementada con hidrolizados de gluten	70
4.3.4. Crecimiento de BAL en leche suplementada con hidrolizados de plasma	71
4.4. Conservación en condiciones de refrigeración y congelación	72
4.4.1. Conservación en refrigeración y congelación de los microorganismos multiplicados en MRS	72
4.4.2. Conservación en refrigeración y congelación de los microorganismos multiplicados en leche	73
4.4.3. Comparación entre medios de conservación y condiciones de almacenamiento	74
4.5. Conservación de <i>L. casei</i> DSPV 318T por encapsulación en perlas de alginato de calcio y almidón	76

4.5.1. Ensayo de formación de cápsulas de alginato de calcio a partir de cultivos en diferentes medios	76
4.5.2. Evaluación del efecto de la suplementación de leche sobre el crecimiento de <i>L. casei</i> DSPV 318T	78
4.5.3. Producción de perlas de alginato de calcio con la adición de almidón	79
4.5.4. Determinación del tiempo de secado	80
4.5.5. Producción y almacenamiento de perlas de alginato y almidón recubiertas con quitosano en diferentes condiciones de conservación	81
4.6. Desafío experimental frente a <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T en terneros lactantes inoculados con lactosa y BAL conservadas por congelación	82
4.6.1. Pesos de los terneros.	82
4.6.2. Signos clínicos	83
4.6.3. Supervivencia de los animales post infección con <i>S. dublin</i> DSPV 595T	86
4.6.4. Recuperación del inóculo de BAL, <i>Lactobacillus</i> totales y otras poblaciones de la microbiota intestinal	87
4.6.5. Detección de <i>Salmonella</i> en materia fecal y sangre	89
4.6.6. Evaluación de la traslocación bacteriana al medio interno	90
4.6.7. Perfil bioquímico sanguíneo y hemograma	91
4.6.8. Índice de peso esplénico	95
4.6.9. Lesiones macroscópicas	96
4.6.10. Lesiones microscópicas	101
4.6.11. Inmunomarcación de IgA en yeyuno	108
4.7. Evaluación de la performance de crecimiento de terneras suplementadas con 2 inóculos probióticos conservados por congelación	109
4.7.1. Peso de las terneras	109
4.7.2. Consumo de alimento y conversión alimentaria	110
4.7.3. Recuento de <i>Lactobacillus</i> en leche de tanque	111
4.7.4. Recuento de la microbiota fecal	111
5. DISCUSIÓN	115
5.1. Aislamiento e identificación de BAL	116
5.2. Selección de las cepas aisladas	118

5.2.1. Estudio de las propiedades probióticas <i>in vitro</i>	118
5.2.2. Estudio de la resistencia a condiciones gastrointestinales	120
5.3. Conservación en condiciones de refrigeración y congelación	121
5.4. Suplementación de leche con hidrolizados proteicos como medio de crecimiento de BAL	124
5.5. Conservación de <i>L. casei</i> DSPV 318T por encapsulación en perlas de alginato de calcio y almidón	125
5.6. Desafío experimental frente a <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T en terneros lactantes inoculados con lactosa y BAL conservadas por congelación	128
5.7. Evaluación de la performance de terneros suplementados con 2 inóculos probióticos conservados por congelación	133
6. CONCLUSIONES	138
7. RESÚMEN	142
8. ABSTRACT	146
9. BIBLIOGRAFIA	150

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARDRA	Análisis de la restricción de ADN ribosomal amplificado
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosomal
AST	Aspartatoaminotransferasa
BAL	Bacterias ácido lácticas
°C	Grados Centígrados
col.	Colaboradores
d	Día
DGGE	Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante
dl	Decilitros
DL₅₀	Dosis letal 50%
DO	Densidad óptica
DSPV	Departamento de Salud Pública Veterinaria
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
ELC	Extracto libre de células
ELISA	Ensayo de inmuno absorción ligado a enzimas
ETAs	Enfermedades transmitidas por alimentos
etc.	Etcétera
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
Fpa	Factor promotor de la agregación
g	Gramos
GC	Grupo control
GP	Grupo probiótico
GGT	Glutamyltranspeptidasa
h	Horas
Ig	Inmunoglobulina
IPE	Índice de peso esplénico
ITCA	Índice de tricloroacético
Kpb	Kilopares de bases

kg	Kilogramo
LAMVAB	Medio <i>Lactobacillus</i> Anaerobic MRS with Vancomicina and Bromocresol green
l	Litros
Log	Logaritmos decimales
M	Molar
ml	Mililitros
min	Minutos
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MRS	Medio De Man, Rogosa and Sharpe
NL	Nódulo Linfático
nm	Nanométros
NMR	Nivel mínimo recomendado
pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsado
PMN	Polimorfonucleares
p/v	Peso en volumen
PV	Peso vivo
RAPD	Amplificación al azar de ADN polimórfico
RFLP	Polimorfismo de longitud de los fragmentos de longitud – Reacción en cadena de la polimerasa
s	Segundos
SLA	Sin lesión aparente
SNC	Suero normal de cabra
TE	Buffer Tris-EDTA
U	Unidades enzimáticas
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultra violeta
v/v	Volúmen en volúmen

X g	Unidad de fuerza centrífuga relativa
W	Watts
μl	Microlitros
μM	Micromolar

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	TÍTULO	Página
TABLA 1	Formulaciones farmacéuticas de productos probióticos para uso veterinario en el mercado.	16
TABLA 2	Medios utilizados para la evaluación del crecimiento de <i>L. casei</i> DSPV 318T.	35
TABLA 3	Poblaciones estudiadas, medios y condiciones de cultivo utilizados.	39
TABLA 4	Niveles de deshidratación según Blood y col., 1986.	41
TABLA 5	Indicadores de la intensidad de las lesiones macroscópicas utilizados para la elaboración del índice de lesiones macroscópicas en los órganos diana estudiados.	46
TABLA 6	Indicadores de la intensidad de las lesiones microscópicas utilizados para la elaboración del índice de lesiones microscópicas.	47
TABLA 7	Número de aislamiento para cada grupo de ARDRA; frecuencia de aparición de cada especie y porción del intestino en la cual se obtuvieron los aislamientos.	53
TABLA 8	Lista de bacterias aisladas en este estudio y su filiación más cercana de acuerdo con la secuenciación del gen 16S ARNr o por la pertenencia al mismo grupo de ARDRA.	54
TABLA 9	Estudio <i>in silico</i> de los perfiles de restricción.	55
TABLA 10	Números de acceso a las secuencias de las cepas indicadoras en el GenBank.	56
TABLA 11	Tiempo de autoagregación de las cepas estudiadas.	57
TABLA 12	Tiempo de coagregación de las BAL estudiadas frente a bacterias patógenas.	59
TABLA 13	Ensayo de inhibición frente a patógenos.	60
TABLA 14	Propiedades probióticas <i>in vitro</i> de las BAL aisladas desde terneros jóvenes.	61
TABLA 15	Hidrolizados utilizados.	69

TABLA 16	Recuentos bacterianos en perlas producidas a partir de diferentes cultivos y con diferentes concentraciones de alginato de calcio.	77
TABLA 17	Crecimiento de <i>L. casei</i> DSPV 318T en 3 medios diferentes.	78
TABLA 18	Proporción de animales que presentan NPT en el GC y el GP.	108
TABLA 19	Conversión alimentaria durante las 3 semanas de experimentación.	111
TABLA 20	Recuento de <i>Lactobacillus</i> y pH en leche de tanque.	111

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	Página
FIGURA 1	Técnica de emulsión para encapsulación de microorganismos.	19
FIGURA 2	Técnica de extrusión para encapsulación de microorganismos.	20
FIGURA 3	Diseño experimental de la conservación de las cápsulas en diferentes condiciones de temperaturas.	37
FIGURA 4	Gel de agarosa con los diferentes grupos de restricción.	52
FIGURA 5	Ensayo de autoagregación <i>L. salivarius</i> DSPV 324T.	58
FIGURA 6	Cepas sensibles a pHs bajos.	62
FIGURA 7	Cepas con alto crecimiento a pH 5.	64
FIGURA 8	Cepas con crecimiento similar a pH 5 y a pH 6,5.	65
FIGURA 9	Grupo de cepas altamente sensibles a la presencia de bilis.	66
FIGURA 10	Cepas sensibles a las diferentes concentraciones de bilis.	67
FIGURA 11	Cepas poco sensibles a la presencia de bilis.	68
FIGURA 12	Crecimiento del inóculo en MRS, leche y leche suplementada con hidrolizados de caseína.	70
FIGURA 13	Crecimiento del inóculo en MRS, leche y leche suplementada con hidrolizados de gluten.	71
FIGURA 14	Crecimiento del inóculo en MRS, leche y leche suplementada con hidrolizados de plasma.	72
FIGURA 15	Viabilidad celular de <i>L. casei</i> DSPV 318T, <i>L. salivarius</i> DSPV 315T y <i>P. acidilactici</i> DSPV 006T durante su conservación en refrigeración (R) y congelación (C) en medio leche (L) y MRS.	76
FIGURA 16	Perlas de alginato de calcio.	78
FIGURA 17	Diferencia de pH entre las horas 6, 12, 18 y 24 y la hora 0 para el crecimiento de <i>L. casei</i> DSPV 318T en medio leche con diferentes suplementos.	79
FIGURA 18	Cápsulas de alginato 0,5% + almidón 0,5% en solución de cloruro de calcio.	80

FIGURA 19	Recuento de células en cápsulas de alginato 1% y alginato 0,5% + almidón 0,5%, a diferentes tiempo de incubación en medio leche suplementado.	80
FIGURA 20	Determinación del tiempo de secado de las cápsulas.	81
FIGURA 21	Viabilidad de las células encapsuladas y conservadas en diferentes condiciones.	82
FIGURA 22	Promedio de Pesos de los terneros en los días 0, 10 y 27.	82
FIGURA 23	Promedio de la temperatura rectal diaria del GC y GP.	83
FIGURA 24	Signos clínicos con diferentes niveles de severidad: consistencia de materia fecal, severidad de la diarrea, estado de las mucosas, secreción ocular y dificultad en la incorporación durante el periodo post infección con <i>S. dublin</i> DSPV 595T para el GC y el GP.	85
FIGURA 25	Signos clínicos con presencia-ausencia de signología a partir de la inoculación con el patógeno: extremidades frías, morro frío y debilidad en tren posterior.	86
FIGURA 26	Grado de deshidratación determinado por el tiempo de pliegue pre y post inoculación con <i>S. dublin</i> DSPV 595T y el hundimiento de ojos a partir del momento de la administración del patógeno.	86
FIGURA 27	Porcentaje de animales vivos del GC y GP a lo largo del experimento.	87
FIGURA 28	Recuento de las poblaciones de <i>Lactobacillus</i> , inóculo probiótico, coliformes, enterococos y levaduras, el día 1, 5, 10 y 27 del experimento en el GC y en el GP.	88
FIGURA 29	Relación entre las cantidades de diferentes poblaciones: <i>Lactobacillus</i> /Coliformes, <i>Lactobacillus</i> /Enterococos, <i>Lactobacillus</i> /Levaduras, Enterococos/Coliformes, Levaduras/Coliformes, en el GC y en el GP a lo largo del experimento.	89
FIGURA 30	Presencia de <i>Salmonella</i> en materia fecal los días 0, 15 y 27 y en sangre los días 15 y 27 del experimento en el GC y en el GP.	90
FIGURA 31	Detección de <i>Salmonella</i> en hígado, bazo, NL mesentérico, NL ileocecal y NL poplíteo en terneros que murieron espontáneamente (necropsias no programadas) y en los animales sacrificados al final del experimento (necropsias programadas) en el GC y el GP.	91

FIGURA 32	Serie Leucocítica. Recuento de leucocitos, neutrófilos en banda, neutrófilos, linfocitos, monocitos y eosinófilos en el GC y el GP a lo largo del experimento.	92
FIGURA 33	Relación linfocitos/neutrófilos en el GC y el GP a lo largo del experimento.	93
FIGURA 34	Serie eritrocítica. Determinación de eritrocitos, hemoglobina y hematocrito en el GC y el GP a lo largo del experimento.	94
FIGURA 35	Concentración de aspartatoaminotransferasa, glutamiltranspeptidasa y urea los días 1, 10, 20 y 27 del experimento para el GC y el GP.	95
FIGURA 36	Índice de peso esplénico.	96
FIGURA 37	Lesiones macroscópicas en necropsias no programadas de órganos diana: yeyuno, íleon, válvula ileocecal, hígado, bazo, NL ileocecal y NL mesentérico del GC y el GP.	97
FIGURA 38	Lesiones macroscópicas en necropsias no programadas de órganos no diana: articulaciones, paladar duro y blando, faringe y esófago, abomaso, duodeno, pulmones y NL poplíteo del GC y el GP.	98
FIGURA 39	Lesiones macroscópicas en necropsias programadas de órganos diana: yeyuno, íleon, válvula ileocecal, hígado, bazo, NL ileocecal y NL mesentérico del GC y el GP.	99
FIGURA 40	Lesiones macroscópicas en necropsias programadas de órganos no diana: articulaciones, paladar duro y blando, faringe y esófago, abomaso, duodeno, pulmones y NL poplíteo del GC y el GP.	100
FIGURA 41	Lesiones microscópicas del hígado.	102
FIGURA 42	Lesiones microscópicas del bazo.	103
FIGURA 43	Lesiones microscópicas del yeyuno.	104
FIGURA 44	Lesiones microscópicas de la válvula ileocecal.	105
FIGURA 45	Lesiones microscópicas de necropsias no programadas yeyuno, válvula ileocecal, hígado, bazo, NL ileocecal, NL mesentérico y NL poplíteo del GC y el GP.	106
FIGURA 46	Lesiones microscópicas de necropsias programadas en yeyuno, válvula ileocecal, hígado, bazo, NL ileocecal, NL mesentérico y NL poplíteo del GC y el GP.	107
FIGURA 47	Inmunomarcación para IgA en el yeyuno de terneros afectados por salmonelosis.	109

FIGURA 48	Peso de las terneras al inicio del experimento y durante las 3 semanas siguientes.	110
FIGURA 49	Consumo promedio de leche y balanceado por grupo de terneras.	110
FIGURA 50	Recuento de las poblaciones de coliformes, enterococos, <i>Lactobacillus</i> , inóculos probióticos y levaduras a lo largo del experimento.	113
FIGURA 51	Relación entre las cantidades de diferentes poblaciones: Inóculo/ <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactobacillus</i> /Coliformes, <i>Lactobacillus</i> /Enterococos, <i>Lactobacillus</i> /Levaduras, Enterococos/Coliformes y Levaduras/Coliformes, a lo largo del experimento.	114

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Diversidad de la microbiota intestinal e influencia en el estado de salud del hospedador

1.1.1. Funciones de la microbiota intestinal

Los animales sanos poseen en su tracto gastrointestinal una microbiota típica que después de la colonización durante los primeros días de vida, alcanza un estado de simbiosis. En un momento dado, una región específica del intestino puede contener más de 400 especies bacterianas, incluyendo la microbiota residente y las especies transientes que ocupan temporalmente un nicho vacío (Lu y Walker, 2001).

La flora habitante del tracto gastrointestinal tiene influencia sobre la bioquímica, inmunología, fisiología y resistencia no específica del huésped contra enfermedades infecciosas (Salminen y von Wright, 1998).

La mucosa intestinal representa la primera línea de defensa contra patógenos, garantizando la defensa inmunológica mediante el tejido linfoide asociado al intestino (Britti y col., 2006). Los linfocitos B y T migran desde los sitios de inducción (placa de Peyer y folículos linfoides que rodean las células M) a través de la linfa y sangre periférica, hacia los sitios efectores (lámina propia y compartimentos epiteliales) donde se hace efectiva la respuesta inmune. Los linfocitos B producen anticuerpos IgA que reconocen y remueven los antígenos de la mucosa sin activar la respuesta inflamatoria. Cuando los antígenos escapan de este primer mecanismo de defensa y alcanzan la lámina propia, ocurre una respuesta inflamatoria mediada por la activación del complemento con producción de IgG (Britti y col., 2006).

La colonización normal del intestino por las bacterias comensales y la interacción con las células epiteliales es fundamental para el correcto desarrollo del sistema inmune de mucosas (Rhee y col., 2004). Estas interacciones entre el sistema inmune de mucosas y los microorganismos mantienen una activación del tejido linfoide asociado al intestino fisiológicamente controlado a lo largo de la vida. También se sabe que los microorganismos que colonizan el intestino de los mamíferos neonatos pueden incrementar la circulación de anticuerpos antimicrobianos específicos (Cebra, 1999). Las reacciones del centro germinal de las placas de Peyer, que preferentemente generan IgA y células B específicas de antígeno, dependen de la estimulación por parte de los antígenos bacterianos entéricos (Shroff y col., 1995). Los estudios en animales gnotobióticos mostraron que en ausencia de microbiota, el sistema inmune intestinal

está subdesarrollado y la morfología del intestino está alterada. La ausencia de bacterias intestinales se asocia con reducciones en la renovación celular de la mucosa, la vascularización, el grosor de la pared muscular, la motilidad, la producción de citocinas, la actividad de las enzimas digestivas y con una defectuosa inmunidad mediada por células (Canny y McCormick, 2008). La capacidad funcional del sistema inmune adquirido es similar en animales gnotobióticos que en los convencionales, pero el número de linfocitos intestinales es reducido en los primeros. En la mayoría de los casos, en los animales gnotobióticos se produce predominantemente IgM, poca IgG y nada de IgA. Cuando los animales gnotobióticos son expuestos a las condiciones normales o alimentados con probióticos, su morfología intestinal y el sistema inmune de mucosas comienza a desarrollarse rápidamente y a producir una gran variedad de isotipos de anticuerpos, incluyendo anticuerpos específicos para las bacterias intestinales residentes (Lu y Walker, 2001).

Además, la microbiota normal, inhibe a los patógenos por diferentes mecanismos. Uno de éstos es la exclusión competitiva, que consiste en la competencia por nutrientes esenciales o los sitios de unión al epitelio (Al-Zenki y col., 2009) y otro, es la constitución de un ambiente desfavorable para ciertos patógenos (Corr y col., 2007).

Otra función benéfica de la microbiota es la contribución a la salud del hospedador a través de la producción de vitaminas (Tappenden y Deutsch, 2007), ácidos grasos de cadena corta (De Boeber y col., 2000), desconjugación de sales biliares (Pereira y col., 2003) y la detoxificación de metabolitos hepáticos e ingeridos (Humblot y col., 2005).

1.1.2. Microbiota intestinal de terneros y utilización de antibióticos

Al momento del nacimiento, el tracto gastrointestinal de los terneros es estéril. Los microorganismos se introducen durante el parto, a partir de la microbiota fecal, vaginal y del ambiente. Esta microbiota se mantiene relativamente estable a lo largo de la vida, aunque ocurren algunos cambios periódicamente, principalmente al momento del destete, por el uso de antibióticos o por la introducción de probióticos (Ewaschuk y col., 2004).

El impacto de la flora intestinal es de vital importancia en el estado nutricional del hospedador y es de especial interés en animales de granja que son criados en sistemas intensivos (Rosmini y col., 2004). El equilibrio del ecosistema se puede ver alterado en los sistemas intensivos de crianza debido a la separación de sus madres, la alimentación con sustitutos lácteos, la eliminación de los beneficios de la leche de vaca, la falta de calostro, situaciones de stress y por el uso de antibióticos. Este desbalance que provoca morbilidad y mortalidad de los terneros jóvenes, produce, en consecuencia grandes pérdidas económicas.

Este desequilibrio deja a los animales en un estado de mayor susceptibilidad a las infecciones, que pueden provocar perturbaciones en la cadena alimentaria. Estos patógenos presentes en los animales, pueden ser los causantes de brotes de enfermedades en humanos, ya sea por el consumo de productos cárnicos o sus derivados (enfermedades transmitidas por alimentos, ETAs) o por el contacto con los animales o sus desperdicios (Callaway y col., 2004). Los patógenos causantes de ETAs pueden ser encontrados en el tracto gastrointestinal de los animales pero son a menudo difíciles de diagnosticar en el campo ya que producen bajo a nulo impacto en la sanidad del animal y/o en la producción y son liberados esporádicamente. El tratamiento pre-faena es de vital importancia, ya que en muchos casos, las prácticas post faena utilizadas, no son suficientes para evitar dichas enfermedades (Callaway y col., 2002).

Los antibióticos han sido utilizados en la alimentación de terneros desde 1950. Muchos investigadores han reportado que esta práctica mejora la performance del ternero (Heinrichs y col., 1995; Monticello y Rusoff, 1961), la eficiencia fagocítica y disminuye el *score* fecal (Quigley y col., 1997; Monticello y Rusoff, 1961) y la mortalidad (Berge y col., 2005). Por otro lado, la utilización de antibióticos en forma masiva, tiene consecuencias indeseables, tales como el desarrollo de poblaciones bacterianas resistentes (Langford y col., 2003) y la permanencia de residuos antibióticos en la carne de consumo y productos derivados (Seymour y col., 1988; Jones y Seymour, 1988), lo cual tiene un efecto directo sobre la salud humana. Por tales motivos, el uso de antibióticos podría ser reducido o eliminado totalmente en un futuro (Abu-Tarboush y col., 1996). Como consecuencia, la demanda de tratamientos alternativos no tradicionales que controlen las infecciones entéricas agudas, se ha visto aumentada (Ewaschuk y col., 2004).

1.2. Enfermedades infecciosas más comunes en terneros

Los patógenos bacterianos poseen procesos adaptativos que le permiten modificar las funciones de las células epiteliales para aumentar su penetración en el epitelio intestinal del hospedador y causar la enfermedad. Un paso necesario para el éxito de la colonización y la producción de la enfermedad, es la habilidad de los patógenos bacterianos para adherirse a la superficie del hospedador, lo cual es un importante factor determinante de la virulencia. Generalmente, la unión a las células intestinales, es esencial para que la bacteria resista el flujo de los fluidos del contenido luminal y las contracciones peristálticas. Una vez unida a la superficie intestinal, puede colonizar y establecer una residencia permanente. Los patógenos necesitan para su adhesión un sitio blanco apropiado. Algunos de los constituyentes de la superficie de las células de los mamíferos, incluyendo glicoproteínas y glicolípidos, pueden servir como receptores para uniones bacterianas. Por otro lado, el hospedador ha desarrollado estrategias especializadas para resistir tales infecciones. Estas interacciones definen el proceso de enfermedad o su inhibición (Lu y Walker, 2001)

Entre los patógenos bacterianos más comúnmente encontrados en terneros destacan: *Escherichia coli* (Callaway y col., 2004, Van Diemen y col., 2005, Naylor y col., 2007) y *Salmonella* (Paulin y col., 2002).

1.2.1. *Salmonella*

La mayoría de las infecciones por *Salmonella* se presentan por la ingestión de agua o alimentos contaminados (Sánchez Jiménez y Cardona Castro, 2003). Antes de invadir, la bacteria debe encontrar y adherirse a uno o más tipos de células del tejido intestinal. Algunos mecanismos de adhesión pueden involucrar varios tipos de fimbrias o pili. La presencia de por lo menos 4 sistemas fimbriales sugiere que la adhesión a superficies celulares y no celulares es un paso crítico en la supervivencia de *Salmonella* en el medio ambiente, ya que ésta responde a factores del medio como pH y osmolaridad (Darwin y Miller, 1999).

Aunque la exposición a *Salmonella* es frecuente se requiere de un inóculo de aproximadamente 10^6 - 10^8 bacterias para el desarrollo de la enfermedad sintomática; otros factores como el tipo de cepa, el tipo de alimento consumido con la bacteria y el estado fisiológico del hospedero, también favorecen o no el desarrollo de la enfermedad.

Salmonella debe pasar barreras y manipular las células del hospedador en sitios específicos a lo largo del curso de la infección. Después de la ingestión, la bacteria resiste el ambiente ácido del estómago y seguidamente coloniza el intestino delgado, penetra las células epiteliales y migra a la lámina propia de la región ileocecal, se multiplica en los folículos de la región linfoide presentándose hiperplasia e hipertrofia reticuloendotelial. Los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) son estimulados y la infección se limita, en el caso de enteritidis, a nivel del tracto gastrointestinal. Si son serotipos productores de fiebre entérica no son retenidas a este nivel sino que migran a hígado y bazo por circulación hemática (Darwin y Miller, 1999).

En ganado, *Salmonella* entérica serotipo *dublin* es la predominante (Paulin y col., 2002). Paulin y col. (2002) han estudiado la virulencia de diferentes serotipos de *Salmonella* y determinaron que tanto *dublin* como *choleraesuis* son los más virulentos, en comparación con *gallinarum* y *abortusovis*.

1.2.2. *Escherichia coli*

La infección intestinal con *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) produce diarrea sanguinolenta, que puede tener consecuencias letales como resultado de la actividad de la toxina *Shiga* en humanos. La mayoría de estas infecciones son causadas por *E. coli* O157:H7. Este serotipo ha sido aislado frecuentemente de heces de terneros y las infecciones producidas en humanos provienen directa o indirectamente de esta fuente (Grauke y col., 2002). Para minimizar la transmisión de este patógeno y otras cepas EHEC desde el ganado a los humanos a través de la cadena alimentaria, se deben tomar medidas. La estrategia de control pre-faena más efectiva es la reducción de la carga del patógeno en las heces de los animales productores de alimentos. No solamente a través de la cadena alimentaria se puede transmitir el patógeno, ya que se ha descrito una ruta que emplea el agua o por el contacto directo con las heces de animales. Por lo tanto, una de las medidas para reducir el riesgo de contagio a los humanos es el control dentro de la población bovina (Naylor y col., 2007).

1.3. Probióticos

1.3.1. Definición de probióticos

Los probióticos son “microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedador” (FAO/WHO, 2001).

La búsqueda de nuevas cepas, con propiedades probióticas específicas, es constante. Sin embargo, antes de ser incorporadas a un producto, su eficacia debe ser comprobada. La selección de estas cepas se realiza teniendo en cuenta los beneficios que éstas producen al hospedador mediante el estudio *in vitro* e *in vivo* de las propiedades probióticas.

1.3.2. Mecanismos de acción de los probióticos en el intestino

Los probióticos pueden operar a través de diversos efectos sobre la salud o la nutrición accionando diferentes mecanismos (Gill y Guarner, 2004):

- *Prevención y tratamiento de infecciones intestinales:* La presencia de lactobacilos es importante para el mantenimiento del ecosistema intestinal. Los mismos han demostrado poseer actividad inhibitoria sobre el crecimiento de patógenos tales como *Listeria monocitogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. (Duffy y col., 1999; Nielsen y col., 1990; Pascual y col., 1999). Esta inhibición puede deberse a la producción de compuestos inhibitorios tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno o bacteriocinas o por exclusión competitiva por adhesión al epitelio o por nutrientes. Hay evidencias también, de que la administración de algunas cepas de *Lactobacillus* promueven la recuperación en pacientes afectados por diarreas virales agudas causadas por rotavirus (Heyman y Ménard, 2002).

- *Prevención de infecciones sistémicas:* Tanto la exclusión competitiva como la inhibición de cepas patógenas, evitan la translocación de las mismas al medio interno (Luyer y col., 2005).

- *Aumento de la respuesta inmune innata y específica:* Las bacterias se unen a los receptores expresados en la superficie de las células epiteliales en el lumen intestinal y desatan una cascada de mecanismos de defensa, originando una respuesta inmunológica innata y/o específica (Britti y col., 2006).
- *Efectos anticancerígenos:* La terapia probiótica puede reducir el riesgo de cáncer a través de diferentes mecanismos: inhibiendo la transformación de procarcinógenos en carcinógenos activos, uniendo o inactivando compuestos mutagénicos, produciendo compuestos antimutagénicos, inhibiendo el crecimiento de bacterias procarcinógenas y aumentando la función inmune (Aso y col., 1992).
- *Disminución de colesterol en sangre:* Algunos estudios han demostrado que el consumo de algunas cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) disminuyen el colesterol en sangre a través de diversos mecanismos: asimilación del compuesto por la bacteria o actividad hidrolasa de sales biliares lo que estimula la utilización del colesterol sérico en la formación de bilis (Pereira y col., 2003; Liong y Shah, 2005).
- *Evitan la intolerancia a la lactosa:* La intolerancia congénita a lactosa es causada por una deficiencia en la enzima β -galactosidasa a nivel intestinal, resultando así en la imposibilidad de digerir este disacárido. Los individuos que la padecen desarrollan diarrea, flatulencia, dolor abdominal e incluso fiebre luego del consumo de leche, aunque los síntomas varían con el grado de intolerancia. El consumo de cepas probióticas disminuye este efecto, lo cual se debe a un aumento de la actividad β -galactosidasa, cuyo origen es microbiano y no de mucosa (Soriano y col., 1984). Esta actividad lactasa microbiana también es la que genera una mejor absorción intestinal de lactosa desde el yogurt en comparación con la leche, debido a los microorganismos presentes en dicho alimento. A pesar que la máxima actividad lactasa está situada a pH entre 6 y 8, esta actividad persiste al pH del duodeno (Heyman y Ménard, 2002).

➤ Prevención y tratamiento de infección por *Helicobacter pylori*

H. pylori es una de las pocas bacterias capaces de colonizar la mucosa gástrica y en algunos casos es capaz de producir inflamación o úlceras. Se ha encontrado en algunos estudios, que la terapia probiótica reduce la adhesión y la viabilidad de *H. pylori* (Heyman & Ménard, 2002).

1.3.3. Microorganismos utilizados como probióticos

En trabajos anteriores, se ha evaluado la administración a terneros de microorganismos pertenecientes a diferentes géneros y especies, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus* spp, *Bacillus* spp, *Enterococcus* spp, *Propionibacterium* spp, etc. Dichos inóculos han tenido gran variabilidad en su efecto entre especies y aún entre cepas de la misma especie (Abu-Tarboush y col., 1996; Jenny y col., 1991; Higginbotham y col., 1998), lo cual sugiere que la selección del microorganismo es el punto más importante (Adams y col., 2008).

Lactobacilli son parte de la microbiota gastrointestinal de los humanos y también pueden ser encontrados en otras especies de mamíferos (Silvi y col., 2003; Heilig y col., 2002; Ziemer y col., 2004; Schneider y col., 2004) y aves (Guan y col., 2003). A algunas especies de *Lactobacillus* se les han atribuido propiedades probióticas. En el caso particular de los terneros, este género bacteriano, ha sido considerado como posible responsable del control de los efectos de los gérmenes patógenos como *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* (Higgins y col., 2007; Ingrassia y col., 2005).

1.3.4. Técnicas de identificación de las diferentes especies

Para analizar e identificar las bacterias de las comunidades microbianas en forma rápida, las pruebas fisiológicas y bioquímicas clásicas no son lo suficientemente adecuadas, debido a que la población bacteriana involucrada generalmente tiene requerimientos nutricionales similares y crecen bajo las mismas condiciones ambientales. Actualmente existe una amplia diversidad de estrategias moleculares que están a disposición para determinar la diversidad de especies de *Lactobacillus* como por ejemplo PCR con primers específicos, DGGE, RAPD, PFGE, FISH, RFLP-PCR y ARDRA, entre otros (Morris y col., 2002).

La comparación de las secuencias del gen 16S ARNr es un método muy confiable para la clasificación e identificación de especies bacterianas (Tannock, 2001). Debido a que estos genes son extremadamente conservados y están presentes en gran número de copias dentro de las células bacterianas individuales, su utilización como blanco molecular ha aumentado en los últimos años (Ventura y col., 2001).

La técnica de ARDRA es un método altamente discriminatorio, simple y rápido para la identificación de bacilos Gram positivos, no esporulados. Muchos autores han demostrado que dicho método es apto para la distinción de diferentes especies del género *Lactobacillus* (Hall y col., 2001; Kim y Chun, 2005; Guan y col., 2003). Además, numerosas BAL utilizadas como *starters* o probióticos han sido identificadas a través de la metodología de ARDRA (Roy y col., 2001).

1.4. Selección de cepas probióticas

El primer paso para la selección de probióticos es el aislamiento e identificación de los componentes de la flora habitual del intestino, debido a que una de las características que deben poseer las cepas utilizadas como probióticas es que sean autóctonas del ecosistema del cual formarán parte una vez ingeridas (Rosmini y col., 2004). Esto es debido a la propiedad de especificidad de especie, la cual declara que es más factible la adherencia a las células intestinales si la cepa es administrada en la misma especie animal de donde fue aislada (Havenaar y col., 1992). Luego deben evaluarse las propiedades probióticas y tecnológicas de las cepas (Silvi y col., 2003), para seleccionar los mejores exponentes que conformarán el inóculo probiótico. Los inóculos pueden ser monocepas o multicepa, siendo esta última forma más adecuada porque su funcionalidad puede ser más efectiva y consistente que la de un monocepa (Timmerman y col., 2005).

Los estudios experimentales tienen 2 objetivos. El primero concierne la selección de las cepas probióticas y la corroboración de que ellas expresan propiedades específicas, ya que ha sido demostrado que las propiedades probióticas son cepa específicas y no pueden ser extrapoladas a otras cepas. El segundo objetivo consiste en demostrar el mecanismo de acción de los probióticos seleccionados (Servin y Coconnier, 2003).

Aunque se cree que el máximo efecto probiótico se logra si el microorganismo se adhiere a las células de la mucosa intestinal, hay poca evidencia de que los probióticos administrados exógenamente realmente lo hagan. Se sugiere que los probióticos pasan a través del intestino con las heces sin producir adherencia o multiplicación (Servin y Coconnier, 2003).

1.4.1. Capacidad de agregación

La habilidad de agregación abarca la autoagregación, caracterizada por la aglutinación de células de la misma cepa y la coagregación, en la cual están involucradas células genéticamente diferentes (Schachtsiek y col., 2004). Ambos tipos de agregación han sido descritos previamente para lactobacilli (Gusils y col., 2002; Bujnakova y Kmet, 2002). Estudios sobre el mecanismo de autoagregación en lactobacilli mostraron que las proteínas presentes en el sobrenadante del cultivo y las proteínas y lipoproteínas localizadas en la superficie de las células están involucradas en la agregación. El factor extracelular que permite la agregación se denomina factor promotor de la agregación (Fpa), y ha sido caracterizado para algunas cepas (Schachtsiek y col, 2004; Ventura et al., 2002)

La capacidad de autoagregación se relaciona con la capacidad de las cepas de adhesión al epitelio intestinal del huésped. La adhesión a la mucosa intestinal ha sido considerada una característica esencial para la eficiente colonización del intestino, por lo que ha sido usado como un importante criterio de selección de probióticos (Cesena y col., 2001).

La coagregación es el proceso mediante el cual, bacterias genéticamente distintas se unen entre ellas a través de moléculas específicas. La evidencia sugiere que tal adhesión influencia la formación de complejos biofilms multiespecies, a través de uniones altamente específicas mediadas por una proteína adhesina en un tipo de células y con un receptor sacárido complementario en la otra célula. Los biofilms son encontrados más comúnmente unidos a un sustrato sólido en un ambiente húmedo o líquido del cual se pueden obtener nutrientes. (Rickard y col., 2003).

Además se observó un tercer tipo de agregación en la cual los sobrenadantes de los lactobacilli que autoagregan, producen la agregación, no solamente de las células de

la cepa productora, sino también de otras BAL (Boris y col., 1997) y aún de células de *E. coli*. (Kolenbrander, 1988).

1.4.2. Producción de sustancias inhibitorias

Las BAL son capaces de producir sustancias que pueden inhibir el crecimiento de otras cepas. Esta inhibición puede deberse a la producción de compuestos inhibitorios tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno o bacteriocinas. Las bacteriocinas son proteínas antibacterianas que matan o inhiben el desarrollo de ciertas cepas, muchas de las cuales han sido caracterizadas bioquímica y genéticamente. Las bacteriocinas tienen gran interés por su uso potencial como conservantes de alimentos, en particular la nisina (Cleveland y col., 2001). También son utilizadas como agentes antibacterianos para combatir ciertas infecciones causadas por bacterias patógenas Gram positivas. Sin embargo, la frecuencia de las infecciones intestinales producidas por bacterias Gram positivas son relativamente bajas comparadas con las infecciones producidas por bacterias Gram negativas o rotavirus, las cuales son insensibles a bacteriocinas (Servin & Coconnier, 2003).

1.4.3. Resistencia a las condiciones gastrointestinales

Las condiciones ácidas en el estómago son una barrera intestinal que previene el pasaje de la mayoría de los microorganismos. Para sobrevivir al ambiente gástrico e intestinal, las cepas probióticas deben tolerar las condiciones ácidas y ricas en proteasas del estómago y sobrevivir y crecer en presencia de ácidos biliares (Mustapha y col., 1997; Gilliland y col., 1984) La tolerancia al ácido es importante también para la sobrevivencia de los probióticos en los alimentos ya que los vehículos predominantes son los yogures y las leches fermentadas (Heller, 2001). Por lo tanto, la tolerancia al ácido es una de las primeras propiedades que se evalúan para seleccionar cepas probióticas.

1.5. Propiedades tecnológicas del inóculo probiótico

1.5.1. Producción industrial

La definición de probióticos expresa la necesidad de que los microorganismos deben estar viables, y sumado a esto, se ha reportado que la dosis mínima para ejercer

efectos benéficos debe estar entre 10^8 y 10^{11} UFC/d, según la cepa (Sodini y col., 2002). Por lo tanto, asumiendo un consumo diario de 100g, los productos deben contener entre 10^6 y 10^9 UFC/g de bacterias vivas en el momento de ser consumidos (Sodini y col., 2002). En la producción industrial de los probióticos es importante la selección del medio de crecimiento para lo cual se deben considerar: costos, habilidad para producir un elevado número de células con alta actividad y que permita la recuperación de los microorganismos (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 1998). La proliferación bacteriana requiere de medios de cultivo apropiados que provean las sustancias nutritivas requeridas por el microorganismo para su desarrollo. Las BAL requieren un amplio rango de factores de crecimiento incluyendo aminoácidos, vitaminas, ácidos grasos, purinas y pirimidinas para su crecimiento y actividad biológica (Kwon y col., 2000).

Existen medios comerciales específicos para cada especie o grupo bacteriano, como es el caso del MRS para los lactobacilos (Gaudreau y col., 2005). Generalmente, estos medios tienen un costo elevado que limita su utilización para la producción a nivel industrial (Rodrigues y col., 2006). Por otra parte, existe una importante variedad de materias primas alternativas que están disponibles en el mercado y que pueden ser utilizadas como nutrientes para fermentaciones a gran escala, por ejemplo los subproductos agrícolas e industriales y los materiales de desecho como el suero de quesería (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 1998; Rodrigues y col., 2006). Por su parte, la leche de vaca es un medio naturalmente complejo que permite, en forma natural, el crecimiento de diferentes especies de lactobacilos (Elli y col., 1999), por lo tanto, podría ser utilizada para la industrialización de inóculos probióticos bovinos.

1.5.2. Enriquecimiento de los medios de cultivo

La leche ha sido utilizada como medio de cultivo de bacterias lácticas por muchos autores (Sodini y col., 2002; Gomes y col., 1998). La misma es un medio naturalmente complejo que soporta el crecimiento de diferentes especies de lactobacilos. Algunas especies sin embargo son incapaces de crecer en leche pura no suplementada (Østlie y col., 2003). El crecimiento bacteriano puede ser mejorado por la adición de sustancias de composición indefinida, tales como extractos de levaduras o peptonas de varios orígenes (Elli y col., 1999). Los hidrolizados proteicos son muy utilizados y el grado de hidrólisis depende de la enzima usada, lo cual afecta

directamente al crecimiento bacteriano (Gomes y col., 1998). También el tiempo durante el cual se lleva a cabo la hidrólisis, puede influir en el tamaño de los péptidos (Gomes y col., 1998). Entre los hidrolizados proteicos más utilizados, están presentes los de caseína. Se han reportado mejoras en los crecimientos bacterianos con la adición de tales hidrolizados a la leche (Gomes y col., 1998, Elli y col., 1999). Además se reportó que en la secuencia aminoacídica de las proteínas nativas de la leche han sido identificados péptidos bioactivos los cuales pueden ser liberados en un tratamiento de hidrólisis (Clare y Swaisgood, 2000). Existen otras fuentes proteicas de bajo costo, tales como el gluten, que es un subproducto de la obtención del almidón de trigo, que resulta de interés para su evaluación como suplemento nutricional del medio de desarrollo. Hidrolizados de plasma también han sido utilizados como suplementos en medios de cultivo por Hyun y Shin (1998), el cual resultó ser una fuente promisoría para la producción económica de aditivos microbiológicos alimentarios.

1.5.3. Conservación y administración de probióticos

La administración periódica de un inóculo probiótico de origen bovino favorecería el establecimiento de una flora intestinal más estable y equilibrada, la cual, mejoraría la sanidad de los terneros (Abe y col., 1995). Para producir un efecto benéfico la administración del inóculo debe ser continua debido a que las cepas inoculadas suelen abandonar el tracto intestinal.

La selección de cepas se realiza teniendo en cuenta los beneficios que éstas producen al hospedador mediante el estudio, *in vitro* e *in vivo*, de las propiedades probióticas. Además se evalúan las características tecnológicas, las cuales deben demostrar la posible producción de estos cultivos y la estabilidad y supervivencia durante su almacenamiento (Dunne y col., 2001). La viabilidad y la cantidad de microorganismos en el momento de ser inoculados es de vital importancia debido a que para producir los efectos probióticos, el nivel mínimo recomendado (NMR) de bacterias es de 10^6 UFC/ml (Vinderola y col., 2000).

Existen diferentes formulaciones farmacéuticas de los inóculos probióticos para uso veterinario: pasta, pastillas, cápsulas, polvos y gránulos. Los cultivos líquidos, aunque tienden a tener una vida media más corta, son interesantes porque actúan más rápidamente en el tracto gastrointestinal. Éstos se encuentran comercialmente

disponibles como suspensiones en agua, aceite o leche (tabla 1). Uno de los métodos más utilizados para mantener la viabilidad de las bacterias en cultivos líquidos es la conservación por frío. La refrigeración se usa generalmente para conservar las células durante un período corto de tiempo pero puede ser estresante para las bacterias y ejercer un efecto adverso para la viabilidad (Gilliland y Lara, 1988). Para la conservación durante períodos más prolongados, el método recomendado es la congelación (Fonseca y col., 2001). Esta metodología ocasiona la formación de cristales de hielo los cuales pueden dañar las células, de forma que generalmente se adiciona al cultivo bacteriano un crioprotector como glicerol, azúcares y/o leche, antes de someterlo a las bajas temperaturas (Champagne y col., 2000; Fonseca y col., 2003).

Tabla 1: Formulaciones farmacéuticas de productos probióticos para uso veterinario en el mercado.

Nombre del producto	Empresa	País	Huésped	Microorganismos	Formulación farmacéutica	Recuento microbilógico	Aplicación del producto
^a PROVITA PROTECT	PROVITA	UK	Terneros	<i>Enterococcus faecium</i> SF 101; <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA 101; <i>L. acidophilus</i> LA 107	Aceite de base líquida	IND*	2,5 a 5 ml/d
^b LACTOBAC PREMIER B SOLUBLE	PARK TONKS	UK	Terneros	<i>E. faecium</i> (NC1B11181)	Polvo	1 x 10 ⁹ UFC/g	2kg/t de sustituto lácteo
^c RUMEN AIDER [®]	BIO VET	EEUU	Vacunos adultos	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> ; <i>L. acidophilus</i> ; <i>L. casei</i> ; <i>L. lactis</i> ; <i>E. faecium</i> ; <i>Pediococcus cereviciae</i> ; <i>Saccharomyces cereviciae</i> .	Cápsulas	2 x 10 ¹⁰ UFC/capsula	1 o 2 capsulas/d
^d GENER [™] MICROBIAL PASTE	BIO VET	EEUU	Ganado	<i>Bacillus licheniformis</i> ; <i>B. subtilis</i> ; <i>L. acidophilus</i> ; <i>L. casei</i> ; <i>L. lactis</i> ; <i>E. faecium</i> ; <i>P. cereviciae</i> ; <i>S. cereviciae</i> .	Pasta	1,6 x 10 ⁹ UFC/ml	5 a 15 ml/dosis; 1 ó 2 dosis/d
^e EQUI-BAC ORAL GEL	KAECO GROUP	EEUU	Caballos y potros	<i>Bacterias</i> ; <i>levaduras</i>	Gel	1 x 10 ¹⁰ UFC/dosis	IND
^f BIOFRESH [™] BOLUS	BIOFRESH	EEUU	Ganado lechero	<i>Lactobacillus</i> spp.	Bolos	IND	IND
^g TECH-O-LYTE [®]	KAECO GROUP	EEUU	Ganado	<i>S. cereviciae</i> ; <i>L. acidophilus</i> ; <i>L. casei</i> ; <i>L. fermentum</i> ; <i>L. plantarum</i> ; <i>Streptococcus faecium</i>	Gránulos solubles	IND	IND
^h BIO-PREMIUM	PROTEXIN [®]	UK	Caballos	<i>S. cereviciae</i> 1026 (CBS 493.94)	Pellets	2 x 10 ⁸ UFC/g	10 a 20 g/d

*IND: información no disponible; ^a<http://www.provita.co.uk/>;

^bhttp://www.parktonks.co.uk/?/animal/supplements/probiotic/lactobac_b_soluble.htm; ^c<http://www.bio-vet.com/AdultCattleCapsulesRA.htm>;

^d<http://www.bio-vet.com/sheepgoatsothers.htm>; ^e<http://kaeco.com/equine.htm#EquiBac>; ^fhttp://www.selectsires.com/biofresh_bolus.html;

^g<http://kaeco.com/livestock.htm>; ^h<http://www.protexin.com/vet/product.php?id=33>

1.5.3.1. Encapsulación

Una técnica que está siendo implementada para el mantenimiento de la viabilidad de los probióticos es la microencapsulación que consiste en retener los microorganismos dentro de una matriz de gel porosa o dentro de una membrana semipermeable que contiene en su interior un núcleo líquido (Dembezynski y Jankowski, 2002). Este recubrimiento aumenta la sobrevivencia de las células ya que las mismas son protegidas de los efectos adversos del medio ambiente que las rodea (Doleyres y Lacroix, 2005). También preserva las bacterias del daño ocasionado por los procesos posteriores a los que se sometan como el secado de las microcápsulas para su conservación a temperatura ambiente (Champagne y Gardner, 2001). La microencapsulación brinda ventajas adicionales, como una mayor resistencia a las condiciones gástricas e intestinales simuladas (Lian y col., 2003), la protección de la biomasa frente a posibles contaminantes (especialmente bacteriófagos) y los menores costos de producción, al no ser necesario el empleo de técnicas de separación (centrifugación y filtración) para concentrar las bacterias en el medio de cultivo (Dembezynski y Jankowski, 2002). También ejercen protección al contacto con el oxígeno, para aquellos microorganismos que son anaerobios estrictos.

Cuando esta tecnología de inmovilización es aplicada a los cultivos adicionados a los alimentos para humanos, se debe sortear el inconveniente de producir un tamaño de perla imperceptible al paladar. La manera más común de formar las perlas es adicionando el cultivo mezclado con alginato de sodio en forma de gotas a una solución de CaCl_2 . En este caso el tamaño de la perla generada depende del tamaño del orificio del elemento dispensador logrando diámetros entre 0,3 a 3 mm (Doleyres y Lacroix, 2005). Las formulaciones farmacéuticas probióticas para terneros, tales como cápsulas, pastillas, gránulos, son de mayor tamaño, adecuadas para el animal a inocular. La encapsulación con alginato es una técnica que podría utilizarse para generar cápsulas de gran tamaño que facilite la conservación y administración de la cepa probiótica a terneros jóvenes.

1.5.3.1.1. Técnicas de encapsulación

La microencapsulación de células bacterianas en perlas hidrocoloides puede realizarse a través de 2 técnicas: extrusión y emulsión (Krasaekoopt y col., 2003).

En la técnica de emulsión, un pequeño volumen de una suspensión células-polímero es agregada a un gran volumen de aceite vegetal. Dicha mezcla es homogeneizada para formar una emulsión agua en aceite. La fase acuosa, luego es inmovilizada por la adición del agente gelificante, El tamaño de las perlas formadas, dependerá entonces del tamaño de la fase acuosa, lo cual es controlada mediante la velocidad de agitación de la emulsión. Las perlas son separadas luego por filtración (figura 1).

En la técnica de extrusión, la solución del hidrocoloide se mezcla con los microorganismos y de esta manera, es agregada por goteo una solución del agente gelificante. Así, la gota al entrar en contacto con la solución gelifica. El tamaño de las perlas depende del tamaño de la gota, la cual es regulada con el tamaño del orificio de salida del elemento dispensador y de la distancia que debe recorrer la gota hasta llegar a la solución. Esta es la técnica más utilizada para la formación de cápsulas con hidrocoloides por ser simple y requerir bajos costos (figura 2).

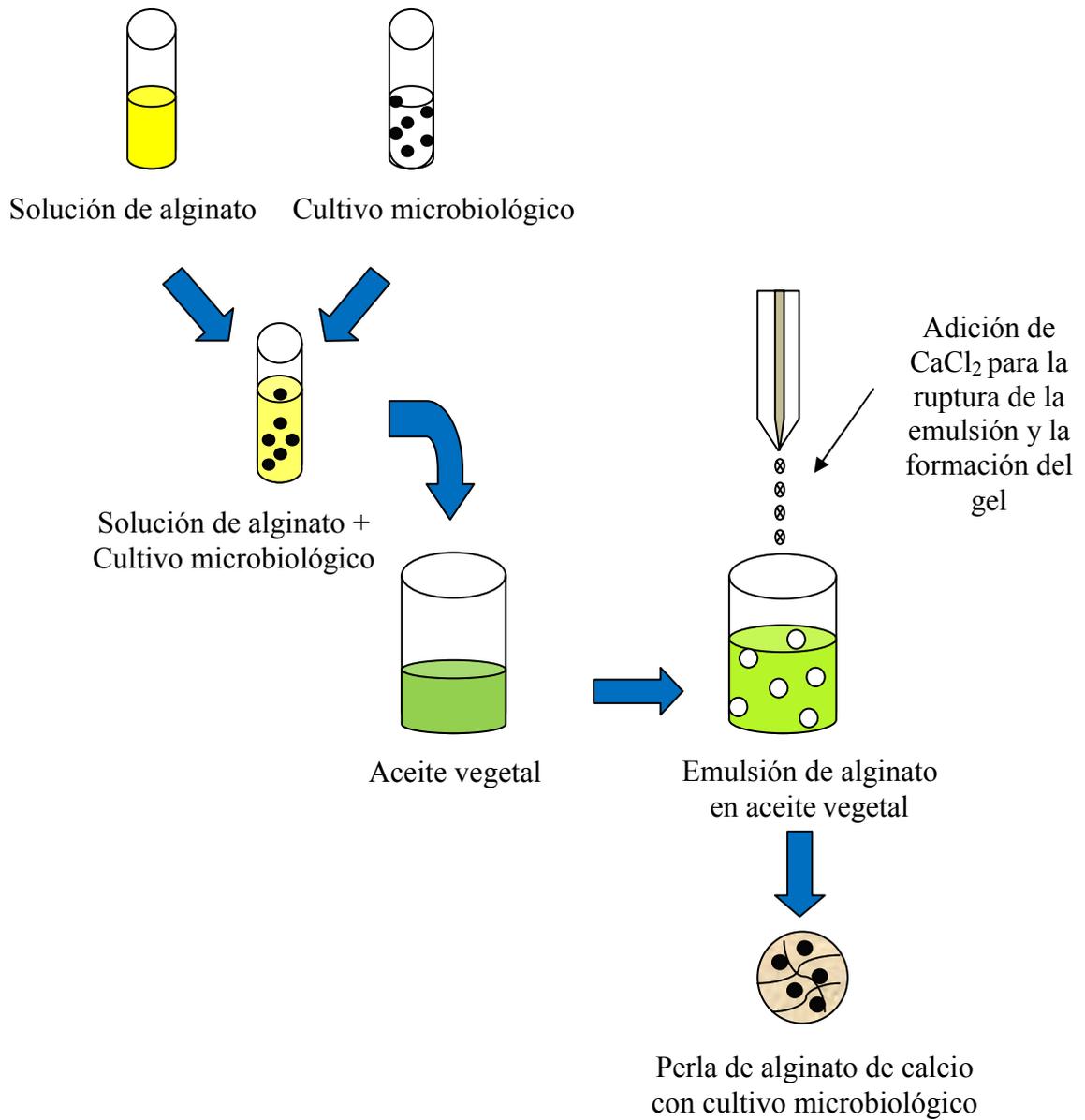
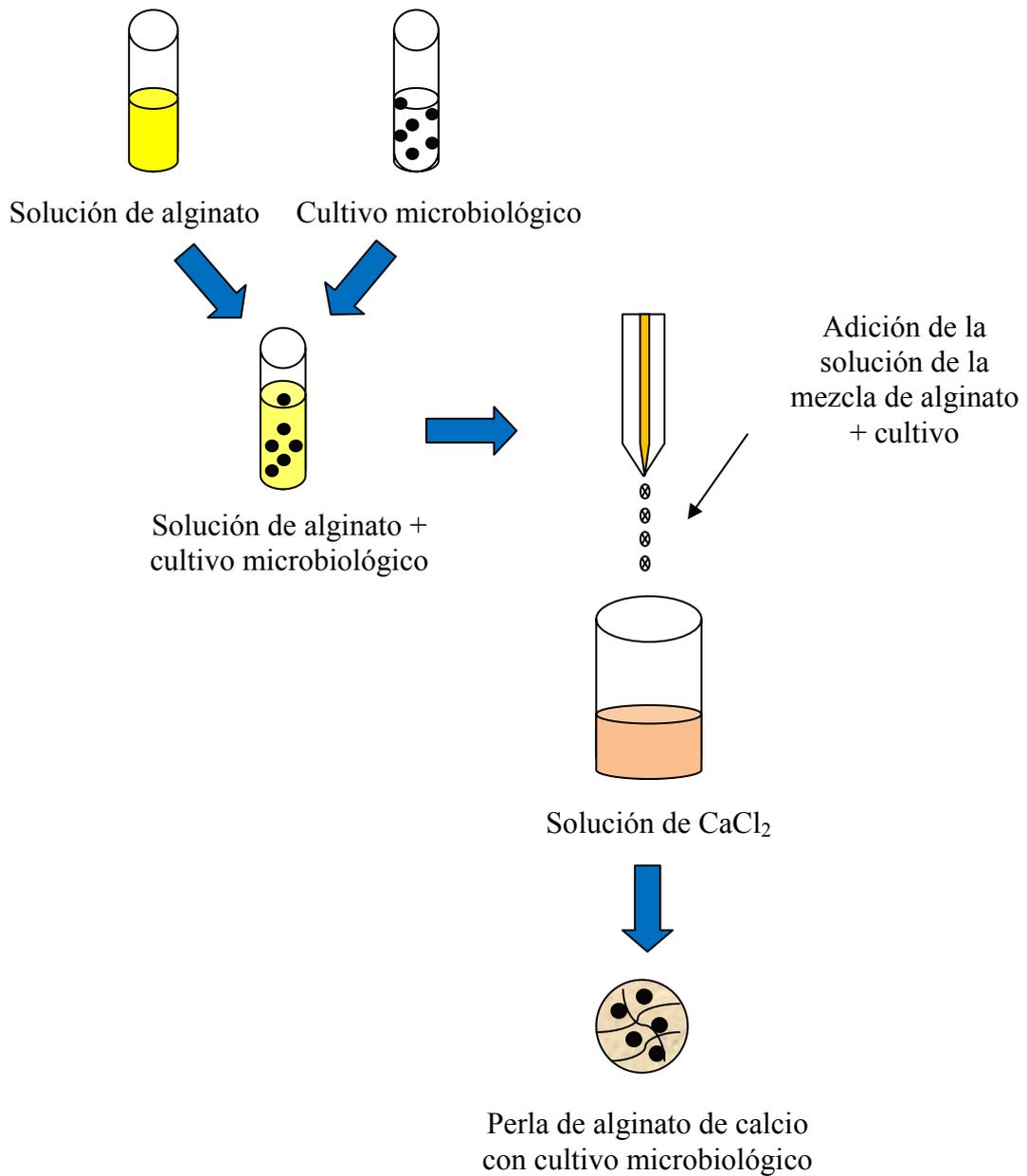
Figura 1: Técnica de emulsión para encapsulación de microorganismos

Figura 2: Técnica de extrusión para encapsulación de microorganismos.

1.5.3.1.2. Materiales utilizados para encapsulación

Las matrices de las cápsulas son producidas con diferentes componentes, tales como: κ -carragenina, gelatina, almidón, alginato, proteínas del suero, leche descremada. (Annan y col., 2008; Champagne y col., 1996; Desmond y col., 2002; Homayouni y col., 2008; Muthukumarasamy y col., 2006). El material más ampliamente utilizado es el alginato (Chandramouli y col., 2004; Truelstrup y col., 2002). Éste es un material biotecnológicamente interesante debido a su capacidad de pasar de estado líquido a gel en presencia de cationes multivalentes (ej. calcio) independientemente de la temperatura, lo que hace del alginato una matriz de inmovilización disponible para células vivas. Las propiedades gelificantes de los alginatos se basan en la habilidad natural que poseen en el control del comportamiento del agua, lo que científicamente se conoce como propiedad hidrocoloide, y en su reactividad frente al calcio; ambas consecuencia de la geometría molecular. Los alginatos incluyen una variedad de productos hechos de ácido D-manurónico y ácido gulurónico, los cuales se disponen en regiones compuestas solamente de una unidad o de la otra, y se refieren como block M o block G y regiones donde las dos unidades se alternan. Cuando dos cadenas de estos bloques se alinean lado a lado resulta un hueco en forma de diamante, el cual tiene la dimensión ideal para acomodar en su interior un ión calcio, formándose una estructura dimérica (Draget y col., 2005).

Las bacterias tienen un tamaño de 1-3 μm , las cuales son bien retenidas en la matriz de alginato que tiene un tamaño de poro de 17 nm (Krasaekoopt y col., 2004). Una técnica utilizada para el aumento de la densidad celular en las cápsulas, es la incubación de las mismas en un medio nutritivo. Champagne y col. (2000), lograron aumentos de concentración de hasta 2 Log UFC/g de cápsula.

En sistemas líquidos con calcio nativo presente, como bebidas de leche, normalmente se incluyen secuestrantes en productos comerciales con alginato para prevenir la formación de geles, debido a la interacción calcio/alginato. Estos sistemas que contienen leche aumentan la viscosidad, según la concentración del hidrocoloide, más que los sistemas acuosos (Yanes y col., 2002).

Los geles de alginato son susceptibles a la desintegración en presencia de exceso de iones monovalentes y agentes quelantes del calcio. Los polímeros tales como el quitosano, forman complejos muy fuertes que son estables en presencia de quelantes del

calcio y reducen la porosidad del gel. Por lo tanto, el recubrimiento de las perlas de alginato, puede mejorar la estabilidad química y mecánica de las cápsulas, mejorando así la efectividad de la encapsulación. El film de quitosano es una membrana semipermeable que reduce la liberación de células al medio en un 40% (Krasaekoopt y col., 2004).

2. OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

A partir de la microbiota indígena de los terneros lactantes se pueden obtener un importante número y variedad de BAL, algunas de las cuales poseen propiedades probióticas que contribuirán a disminuir la incidencia de las infecciones intestinales de los terneros criados artificialmente y aumentarán su performance. El diseño de una metodología de conservación adecuada permitirá la utilización de estas bacterias en condiciones de campo para mejorar la rentabilidad de los sistemas de crianza de terneros en condiciones artificiales.

2.2. Objetivo general

Determinar las mejores condiciones de conservación de un inóculo, conformado por bacterias ácido lácticas indígenas con capacidades probióticas, para que al ser administrado en el campo a terneros lactantes criados en condiciones artificiales les brinde protección frente a las bacterias patógenas productoras de diarrea.

2.3. Objetivos específicos

- 1- Seleccionar cepas ácido lácticas de origen bovino con características probióticas.
- 2- Identificar las cepas seleccionadas.
- 3- Evaluar distintos métodos de conservación para el inóculo potencialmente probiótico.
- 4- Verificar la eficiencia del método de conservación a través del tiempo
- 5- Verificar la eficiencia probiótica del inóculo conservado y administrado a terneros lactantes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Aislamiento e identificación de BAL

3.1.1. Aislamiento de BAL

Los aislamientos se realizaron a partir de la mucosa de ciego y yeyuno de 6 terneros jóvenes criados en condiciones intensivas, para lo cual se utilizó el medio selectivo LAMVAB para lactobacilos (Hartemink y col., 1997). Se tomaron 42 colonias las cuales fueron multiplicadas en caldo MRS (De Man y col., 1960) durante 24 h a 37° C. Para su conservación, los cultivos fueron congelados a -80 °C con el agregado de glicerol al 25% v/v.

3.1.2. Aislamiento de ADN

Dos ml de cada cultivo de 24 h fueron centrifugados a 14000 X g (5 min). El sedimento fue congelado a -20 °C durante 24 h para facilitar la rotura de las células. El ADN fue extraído según Marmur (1961) modificado por Kursak y col., (1998), resuspendido en 50 µl de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) y 5 µl de ese DNA molde fueron agregados directamente al tubo de PCR. La cantidad de ADN obtenida se cuantificó por medición en espectro UV a 260 nm y su integridad fue visualizada por electroforesis en gel de agarosa al 0.7% p/v, teñido con GelRed™ y visualizado bajo luz UV.

3.1.3. Amplificación del gen 16S ARNr

El gen 16S ARNr fue amplificado por PCR con un termociclador (MJ Research®). Los fragmentos de DNA de aproximadamente 1,5 Kpb (lo cual corresponde al tamaño del gen 16S ARNr) fueron amplificados usando los primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3'). Cada tubo de PCR (50 µl) contenía una mezcla de reacción de 10 µl de buffer 5X PCR para *Taq* polimerasa (Promega®), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada desoxinucleótido trifosfato (Promega®), 0,4 µM de cada primer y 2U de *Taq* Polimerasa (Promega®). La programación del termociclador fue la siguiente: 94 °C durante 5 min; 30 ciclos de 94 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min y 72 °C durante 1 min; y una extensión final de 72 °C durante 7 min. Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v, con tinción de GelRed® bajo luz UV.

3.1.4. ARDRA

Con el objetivo de lograr una completa digestión, las mezclas de reacción de 20 µl fueron mantenidas a 37 °C durante 4 h. Cada tubo de reacción contenía 2 µl de buffer de incubación 10X, 0,2 µl of albúmina sérica bovina, 6U de la respectiva enzima de restricción, 2,5 µl de agua bidestilada y 15 µl de cada producto de PCR. Las 3 endonucleasas de restricción utilizadas fueron *Hae* III, *Msp* I y *Hinf* I (Promega®). Los productos resultantes de la digestión fueron visualizados bajo luz UV luego de una electroforesis en gel de agarosa al 3% p/v. Los patrones de restricción idénticos fueron agrupados y se secuenciaron algunas cepas de cada grupo, pudiendo de esta manera asociar a cada patrón de restricción la especie correspondiente determinada por secuenciación (Kim y Chun, 2005).

3.1.5. Estudio *in silico*

Para este estudio se utilizaron los protocolos de análisis del Software Nebcutter (Vincze y col., 2003). Los perfiles de restricción teóricos de la secuencia del 16S ADN_r de cada una de las especies que coincidieron en alto porcentaje mediante el alineamiento del algoritmo de BLAST, fueron comparados con los perfiles de los aislamientos obtenidos. Además se obtuvieron perfiles de restricción teóricos de las secuencias del gen 16S ARN_r de otras especies de *Lactobacillus* y *Enterococcus* para determinar el poder discriminativo que tiene ARDRA frente a otras especies microbianas.

3.1.6. Secuenciación

Los productos de PCR de 19 cepas representantes de cada uno de los grupos de restricción obtenidos fueron purificados con el kit Wizard PCR SV Gel & PCR Clean-Up System (Promega®) y luego secuenciados. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias depositadas en la base de datos GenBank usando el algoritmo de BLAST (Benson y col., 2000).

3.1.7. Números de acceso a las secuencias nucleotídicas

Las secuencias obtenidas del procedimiento de secuenciación fueron depositadas en la base de datos GenBank mediante la herramienta de remisión disponible en la web: BankIt (Benson y col., 2000).

3.2. Evaluación de las propiedades probióticas de las cepas aisladas

3.2.1. Identificación de cepas patógenas utilizadas como indicadoras

Se utilizaron 3 cepas patógenas aisladas de necropsias de terneros llevadas a cabo en el Hospital de Salud Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV) de la Universidad Nacional del Litoral (UNL): *Salmonella dublin* DSPV 595T, *Escherichia coli* DSPV 247T y DSPV 284T, las cuales se conservaron en medio BHI con el agregado de glicerol al 25% y dispuestas a -80 °C. El perfil bioquímico de *S. dublin* DSPV 595T fue determinado mediante un ensayo con el sistema API 20 E (BioMerieux, Hazelwood, Mo.). La identificación fue realizada por el Servicio de Enterobacterias del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, dependiente de la Administración Nacional de Laboratorios e Instituto de Salud (A.N.L.I.S.), “Dr. Carlos G. Malbrán” (Argentina). Las 3 cepas fueron identificadas también por secuenciación del gen 16S ARNr. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias depositadas en la base de datos GenBank usando el algoritmo de BLAST para la determinación de la especie. Luego, las secuencias fueron remitidas a la base de datos del Genbank utilizando la herramienta disponible en la web: BankIt (Benson y col., 2000).

3.2.2. Autoagregación

La prueba de autoagregación se realizó utilizando la técnica descrita por Reniero y col. (1992) con algunas modificaciones. Las BAL fueron reactivadas por repiques sucesivos en caldo MRS (Britania®). Las condiciones de incubación fueron de aerobiosis a 37°C durante 24 h. De cada cultivo en crecimiento fueron tomadas alícuotas de 2 ml, las cuales se centrifugaron, obteniendo el sedimento bacteriano por un lado y el sobrenadante (ELC) por el otro. Los pellets fueron lavados dos veces y resuspendidos en solución Ringer ¼ estéril, en un volumen igual al original (2 ml). Posteriormente, se colocaron en tubos 900 µl de la suspensión bacteriana de cada aislamiento y 100 µl de su correspondiente extracto libre de células. Como control negativo, se utilizó un tubo

que contenía 1 ml de la suspensión bacteriana, sin el agregado del sobrenadante. La incubación se realizó a temperatura ambiente, efectuando lecturas a tiempos predeterminados (30, 60, 90 y 120 min). El resultado de la prueba fue considerado positivo cuando se visualizó la formación de partículas similares a arena. Estas partículas son producidas por la coalescencia de las células bacterianas (autoagregación), descendiendo al fondo del tubo y clarificando la parte superior (Bujnakova y Kmet, 2002).

3.2.3. Coagregación con patógenos

El ensayo de coagregación se realizó según Reniero y col. (1992) a aquellos aislamientos positivos a la autoagregación. Para esta prueba los aislados se prepararon de la misma manera que para el ensayo de agregación. Los patógenos se sembraron en caldo Infusión Cerebro-Corazón (Britania[®]) a 37 °C y se repicaron a las 24 h. Los cultivos fueron centrifugados para la obtención del pellet. Una vez obtenido el pellet, se lo lavó dos veces y se resuspendió en solución Ringer ¼. Cada uno de los aislamientos fue mezclado con el mismo volumen de una suspensión del patógeno a evaluar y con el ELC del aislamiento en estudio en una concentración final del 10% v/v. Se utilizó como control negativo una mezcla de la cepa patógena y del aislamiento pero sin el agregado del ELC. Se determinó la existencia de coagregación a los 15, 30, 60, y 120 min. El resultado de la prueba fue considerado positivo cuando se visualizó la formación de partículas similares a arena que se depositan en el fondo del tubo, clarificando la parte superior.

3.2.4. Producción de sustancias inhibitoras

Se determinó la actividad antimicrobiana de los extractos libres de células (ELC) de los aislamientos según lo establecido por Klaenhammer, (1988) frente a *Salmonella dublín* DSPV 595T y *Escherichia coli* DSPV 247T y DSPV 284T. Para esto, a partir de un cultivo *overnight* en caldo MRS se extrajeron los sobrenadantes obtenidos por centrifugación, los cuales fueron filtrados posteriormente. Dichos ELC se evaluaron tanto, sin modificarlos (ELC pH 5,5), como así también, neutralizados con NaOH (ELC pH 6,5). Los microorganismos indicadores se sembraron en placas de agar CASO, y para la determinación de la inhibición del crecimiento de las mismas, se realizaron

hoyos en el agar de aproximadamente 5 mm en donde se depositaron 60 µl de cada ELC. Las placas se dejaron en reposo durante 30 min y luego se incubaron a 37 °C durante 24 h. Se determinó la capacidad inhibitoria de los ELC por presencia/ausencia de zonas de inhibición alrededor de los hoyos, así como también el tamaño de los mismos.

3.2.5. Influencia del pH sobre el crecimiento bacteriano

Los aislamientos fueron expuestos a diferentes valores de pH de acuerdo a lo descrito por Du toit y col. (1998). Se evaluó el crecimiento de las cepas en medio MRS a distintos valores de pH: 6,5 (control), 5, 4, 3 y 2. Para ello se dispusieron 240 µl de cada uno de los medios en los pocillos de microplacas de ELISA y se inocularon con 3 µl de los cultivos *overnight* de las bacterias en estudio. Las microplacas fueron incubadas a 37 °C y se midió la absorbancia de los cultivos, a una longitud de onda de 540 nm, 1 vez por hora durante 10 h. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado. Las curvas de crecimiento se realizaron restando la densidad óptica (DO) de la hora 0 a las DO tomadas a cada una de las horas predeterminadas. El análisis estadístico se efectuó por comparación de las curvas de crecimiento de cada microorganismo con medidas repetidas, y test de Tukey para aquellos casos en los que se presentaban diferencias ($P < 0,05$).

3.2.6. Efecto de diferentes concentraciones de bilis sobre el crecimiento bacteriano

Se utilizó la metodología descrita por Gotcheva y col. (2002) con algunas modificaciones. Se evaluó el crecimiento de las cepas en medio MRS con distintas concentraciones de bilis: 0% (control), 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6% y 7%. Para ello se dispusieron 240 µl de cada uno de los medios en los pocillos de microplacas de ELISA y se inocularon con 3 µl de los cultivos activos de las bacterias en estudio. Las microplacas fueron incubadas a 37 °C y se midió la absorbancia de los cultivos a una longitud de onda de 540 nm 1 vez por hora durante 12 h. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado. Las curvas de crecimiento se realizaron restando la densidad óptica (DO) de la hora 0 a las DO tomadas a cada una de las horas predeterminadas. El análisis estadístico se realizó por comparación de las curvas de crecimiento de cada

microorganismo con medidas repetidas, y test de Tukey para aquellos casos en los que se presentaban diferencias ($P < 0,05$).

3.3. Suplementación de leche con hidrolizados proteicos

3.3.1. Microorganismos

Se estudiaron 3 cepas integrantes de un inóculo potencialmente probiótico de origen bovino pertenecientes al Departamento de Salud Pública Veterinaria (DSPV), FCV-UNL: *Lactobacillus casei* DSPV 318T, *Lactobacillus salivarius* DSPV 315T y *Pediococcus acidilactici* DSPV 006T. Las mismas fueron aisladas de terneros sanos y conservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en medio MRS con glicerol (35% v/v). Las cepas fueron identificadas por secuenciación del gen 16S ARNr (Schneider y col., 2004) y evaluadas en cuanto a sus propiedades probióticas *in vitro* (Frizzo y col., 2006) e *in vivo* en ratones (Frizzo y col., 2005; 2007).

3.3.2. Medios de cultivo

Las cepas fueron propagadas 2 veces en medio MRS, para la posterior inoculación en los siguientes medios: caldo MRS como control positivo para el desarrollo de las BAL (Gaudreau y col., 2005) y leche descremada en polvo al 10% p/v (Østlie y col., 2004) estéril sin suplementar o con 5% v/v de los hidrolizados proteicos que se detallan a continuación.

3.3.3. Hidrolizados

Se evaluó el grado de hidrólisis de 3 fuentes proteicas: caseína de leche, gluten de trigo y plasma. Para esto se utilizaron diferentes enzimas (neutrasas, alcalasas y acidasas), las cuales se dejaron actuar durante diferentes tiempos (entre 2 y 6,5 h). El grado de hidrólisis alcanzado se midió a través del índice de tricloroacético (ITCA).

3.3.4. Condiciones de crecimiento

Cada cepa fue sembrada por triplicado en 10 ml de cada uno de los medios de cultivo antes mencionados y se incubaron durante 24 hs a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego de la incubación se realizaron diluciones decimales en Ringer $\frac{1}{4}$ para la determinación del número de

células viables. La siembra se realizó por triplicado en placas con agar MRS las cuales fueron incubadas a 37 °C durante 48 hs.

3.3.5. Análisis estadístico

Los datos de crecimiento bacteriano fueron analizados mediante un ANOVA y el test de Duncan, ambos realizados con el Programa Statgraphics Plus para Windows ver. 3.0. (Statgraphics Plus Software®, 1997) y tomando $P < 0,05$ como diferencia significativa entre las medias.

3.4. Conservación en condiciones de refrigeración y congelación

3.4.1. Microorganismos

Se estudiaron 3 cepas integrantes de un inóculo potencialmente probiótico de origen bovino pertenecientes al DSPV (FCV, UNL): *Lactobacillus casei* DSPV 318T, *Lactobacillus salivarius* DSPV 315T y *Pediococcus acidilactici* DSPV 006T, cuyos números de acceso en el GenBank son: FJ787305, FJ787306 and FJ787307, respectivamente. Las mismas fueron aisladas de terneros sanos y conservadas a -80 °C en medio MRS (Britania®) con glicerol (35% v/v). Las cepas fueron identificadas por secuenciación del gen 16S ARNr (Schneider y col., 2004) y evaluadas en cuanto a sus propiedades probióticas *in vitro* (Frizzo y col., 2006) e *in vivo* en ratones (Frizzo y col., 2005; 2007).

3.4.2. Medios de propagación y conservación

Las cepas fueron propagadas 2 veces en medio MRS, para la posterior inoculación en los siguientes medios: caldo MRS como control positivo para el desarrollo de las BAL (Gaudreau y col., 2005) y leche descremada en polvo al 10% p/v estéril (Milkaut®). Las cepas fueron almacenadas a través del tiempo en el mismo medio en el que se propagaron.

3.4.3. Condiciones de crecimiento

Cada cepa fue sembrada en 30 ml de los medios de cultivo antes mencionados y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Posteriormente se realizaron diluciones decimales en Ringer $\frac{1}{4}$ para el recuento de células viables. La siembra se realizó en placas con MRS

agar, las cuales fueron incubadas a 37 °C durante 48 h. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

3.4.4. Condiciones de almacenamiento

Se realizaron alícuotas de 1,2 ml de cada uno de los cultivos homogeneizados en viales estériles. Los mismos fueron dispuestos a 4 y -20 °C para la evaluación de la capacidad de conservación en refrigeración y congelación respectivamente. Se realizó el recuento de células viables cada 21 d durante un período de 3 meses y a los 6, 9 y 12 meses (180, 270 y 360 d). Para ello se sembraron diluciones decimales en Ringer ¼ en placas con agar MRS. Las mismas fueron incubadas a 37 °C durante 48 h. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

El porcentaje de viabilidad se calculó relacionando el número de microorganismos vivos en los diferentes tiempos estudiados respecto del recuento inicial.

3.4.5. Análisis estadístico

Los datos de viabilidad fueron analizados mediante un ANOVA y el test de Tukey, utilizando el Programa Statgraphics Plus para Windows ver. 3.0. (Statgraphics Plus Software®, 1997) y tomando $P < 0,05$ como diferencia significativa entre las medias.

3.5. Conservación de *L. casei* DSPV 318T por encapsulación en perlas de alginato de calcio y almidón

3.5.1. Ensayo de formación de cápsulas de alginato de calcio a partir de cultivos en diferentes medios

La técnica de encapsulación se llevó a cabo utilizando la cepa *L. casei* DSPV 318T. El biopolímero de elección utilizado para tal fin fue el alginato de sodio (Krasaekoopt y col., 2003). La bacteria se propagó en distintos medios: caldo MRS y leche descremada al 10% p/v + hidrolizado proteico Cas3 al 5% v/v de concentración final (Soto y col., 2006) para determinar si dicho factor afecta la formación de las perlas. Para el medio en base leche se evaluó la adición de EDTA como clarificante por su capacidad de secuestrar los iones calcio presentes en la leche (Draget y col., 2005),

los cuales dificultan la formación de la perla. Se estudió el agregado de EDTA antes y después del desarrollo de los microorganismos en diferentes concentraciones, manteniendo las siguientes relaciones: 1/1, 1/2 y 1/4 (moles de EDTA/ moles de calcio presentes en la leche, respectivamente). Luego de 24 h de incubación de los cultivos a 37 °C se determinó el crecimiento bacteriano por recuento en placa con agar MRS. Posteriormente estos cultivos fueron mezclados con soluciones de alginato de sodio en una proporción 1:1, para obtener suspensiones células-polímero con concentraciones finales de 1 y 4% p/v de alginato (Poncelet y col., 1999). Dichas mezclas se dispersaron en moldes (Doleyres y Lacroix, 2005) de 1 ml, se dispusieron a -20 °C y una vez congeladas fueron sumergidas en una solución de CaCl₂ (0,1M) para la polimerización del alginato manteniendo su forma y tamaño (Bajpai y Sharma., 2004; Muthukumarasamy y col., 2006). Las perlas ya formadas fueron separadas por filtración, lavadas con solución Ringer ¼ y luego se colocaron en una solución de citrato de sodio al 1% (Champagne y Gardner, 2001) hasta su completa desintegración. A partir de esta solución se tomó una alícuota para realizar el recuento bacteriano (UFC/g de perla) en placas de agar MRS. Por otro lado, se evaluó la incubación de las perlas en medio leche descremada al 10% p/v + hidrolizado proteico Cas3 al 5% v/v de concentración final durante 24 h a 37 °C para evaluar un posible incremento de biomasa dentro de la misma (Champagne y col., 2000), realizándose dichas determinaciones por recuento en placa.

3.5.2. Evaluación del efecto de la suplementación de leche sobre el crecimiento de *L. casei* DSPV 318T

En un primer paso se evaluó el crecimiento de *L. casei* DSPV 318T (Frizzo y col., 2006, 2007, 2008; Soto y col., 2006) en 3 medios de cultivo (tabla 2). Los mismos fueron esterilizados durante 20 min a vapor fluente y sembrados al 1% v/v con un cultivo *overnight* de *L. casei* DSPV 318T e incubados a 37°C durante 24 h. Cada seis h, se determinó el tiempo de coagulación de la leche, el pH del medio y se realizaron recuentos celulares para lo cual se efectuaron diluciones decimales, que se sembraron en placas con agar MRS y se incubaron a 37°C durante 48 h. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Tabla 2: Medios utilizados para la evaluación del crecimiento de *L. casei* DSPV 318T.

Medios	Contenido	Concentración
Medio 1	Leche descremada en polvo	100 g/l
Medio 2	Leche descremada en polvo	100 g/l
	Glucosa	20 g/l
	Mg	0,2 g/l
	Mn	0,05 g/l
Medio 3	Leche descremada en polvo	100 g/l
	Glucosa	20 g/l
	Mg	0,2 g/l
	Mn	0,05 g/l
	hidrolizado de caseína (Cas3)	50 ml/l

3.5.3. Producción de perlas de alginato de calcio con la adición de almidón

Finalmente, una vez determinado el medio óptimo de crecimiento de la cepa en estudio, así como el tiempo de incubación de la misma, se procedió a la producción de las macrocápsulas. Se preparó un cultivo con el medio elegido (Medio 3), se incubó durante 10 h, y se le adicionó EDTA (0,5M) (Yanes y col., 2002) para la obtención de un cultivo clarificado. Se prepararon dos soluciones estériles: una de alginato 2%, y otra de alginato 1% + almidón 1% (Bajpai y Sharma, 2004; Muthukumarasamy y col., 2006; Homayouni y col., 2008). Cada una de ellas se mezcló con una alícuota del cultivo clarificado en proporción 1:1 (Champagne y Gardner, 2001), obteniéndose cultivos con concentraciones finales de 1% de alginato y de 0,5% de alginato + 0,5% de almidón. Dichas mezclas se dispersaron en moldes (Doleyres y Lacroix, 2005) de 1 y 2 ml, se dispusieron a -20 °C, y una vez congeladas fueron sumergidas en una solución de CaCl₂ (0,1M) para la polimerización del alginato manteniendo su forma y tamaño (Bajpai y Sharma., 2004; Muthukumarasamy y col., 2006). Las cápsulas se dejaron reposar una hora en dicha solución para su correcta formación, y luego fueron separadas por filtración. Para determinar las concentraciones celulares en los distintos tipos de cápsulas realizados, las mismas se colocaron en una solución de citrato de sodio para su disolución (1%) (Champagne y Gardner, 2001). Luego se realizaron diluciones

decimales y se sembraron en placa con agar MRS y se incubaron a 37 °C durante 48 h. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Además, las diferentes cápsulas fueron incubadas en el medio de cultivo y se determinó la viabilidad celular a las 9 y 18 h. El análisis estadístico fue realizado mediante un ANOVA y test de Duncan, ambos realizados con el Programa Statgraphics Plus para Windows ver. 3.0. (Statgraphics Plus Software®, 1997) y tomando $P < 0,05$ como diferencia significativa entre las medias.

3.5.4. Determinación del tiempo de secado de las cápsulas

Las cápsulas frescas fueron expuestas al aire del flujo laminar para el secado de las mismas. Las perlas fueron pesadas cada 1 h determinándose que el tiempo óptimo de secado es aquel en el que el peso comienza a ser constante (Turker y Hamamci, 1998).

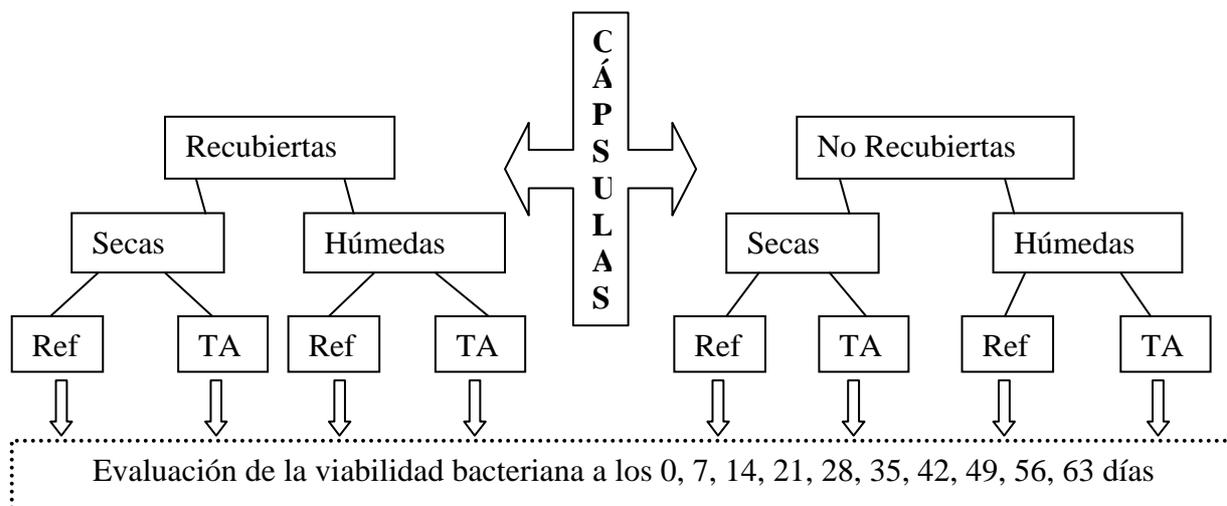
3.5.5. Producción y almacenamiento de perlas recubiertas con quitosano en diferentes condiciones de conservación

Teniendo en cuenta los trabajos previos se determinaron las siguientes condiciones para la producción de las cápsulas:

- ✓ Para la producción de biomasa se utilizó el Medio 3.
- ✓ Las cápsulas se realizaron con alginato (0,5%) + almidón (0,5 %) con un tamaño 2 ml
- ✓ Se incubaron las cápsulas en Medio 3 para el crecimiento microbiológico durante 9 h.

Se adicionó una variable que es el recubrimiento de perlas con un polímero policatiónico (quitosano). La solución de quitosano fue preparada en una concentración de 0,4% p/v acidificada con ácido glacial acético, ajustando su pH a 5,7- 6 con NaOH y esterilizada en autoclave durante 15 min (Krasaekoopt y col., 2006). Las cápsulas permanecieron en dicha solución durante 15 min. El diseño del experimento está detallado en la figura 3. Las cápsulas recubiertas con quitosano fueron disgregadas mediante la utilización de un Stomacher Seward Biomaster®. El análisis estadístico fue realizado mediante un ANOVA y test de Duncan, ambos realizados con el Programa Statgraphics Plus para Windows ver. 3.0. (Statgraphics Plus Software®, 1997) y tomando $P < 0,05$ como diferencia significativa entre las medias.

Figura 3: Diseño experimental de la conservación de las cápsulas en diferentes condiciones de temperaturas.



Ref: cápsulas conservadas a temperatura de refrigeración; TA: cápsulas conservadas a temperatura ambiente

3.6. Desafío experimental frente a *Salmonella dublin* DSPV 595T en terneros lactantes inoculados con lactosa y BAL conservadas por congelación

3.6.1. Animales

Se utilizaron 28 terneros Holstein (*Bos taurus*) con una edad promedio de 5 días de vida. La crianza artificial se realizó en estacas y sobre piso cubierto por pasto natural. Cada semana los animales fueron trasladados a una nueva superficie, de iguales características, libre de deyecciones. Todos los animales fueron alimentados con alimento concentrado sin medicamentos suministrado *ad libitum* a lo largo del experimento y con sustituto lácteo (4 l/d) y agua, racionados directamente en el comedero 2 veces/d. El sustituto lácteo fue reconstituido al 11% de materia seca (MS) y entregado a los terneros, a las 6:00 y a las 18:00 h, a una temperatura de aproximadamente 38 °C. Además, al grupo probiótico (GP) se le suministró lactosa desecada junto al sustituto lácteo en cantidades de 50 g en cada administración y 150 ml del inóculo probiótico en la entrega de sustituto de la tarde. Los terneros permanecieron en experimentación durante un período de 27 d. El cuidado de los animales se realizó teniendo en cuenta la Guía para el cuidado y uso de animales en investigación y enseñanza (FASS, 1998).

3.6.2. Diseño del experimento

Los animales se dividieron en 2 grupos experimentales de 15 animales en el grupo control (GC) y 13 animales en el grupo inoculado (GP). Los datos de peso vivo se registraron al inicio del ensayo, previo a la inoculación del patógeno y previo a las necropsias programadas.

3.6.3. Microorganismos

El inóculo probiótico utilizado estaba compuesto por: *Lactobacillus casei* DSPV 318T, *Lactobacillus salivarius* DSPV 315T y *Pediococcus acidilactici* DSPV 006T. El microorganismo patógeno utilizado fue *Salmonella dublin* DSPV 595T.

3.6.4. Selección de mutantes resistentes a antibióticos

La resistencia al antibiótico de las cepas del inóculo de BAL fue obtenido por cultivos sucesivos en medio LAMVAB, desde niveles bajos hasta llegar a la concentración de 10 µg/ml de rifampicina (Kurzak, 2000; Demecková y col., 2002). Rifampicina fue preparada en una solución stock (10 mg/ml) y fue usada a una concentración final de 10 µg/ml. Para esto, un cultivo *overnight* fue esparcido en las placas de LAMVAB agar suplementada con rifampicina (LAMVAB_{rif}), y luego incubadas durante 48 h a 37 °C. Finalmente, se obtuvo una colonia utilizando el método de aislamiento. Las cepas aisladas eran resistentes a rifampicina y fueron cultivadas en MRS caldo (24 h a 37° C).

Se compararon los parámetros bioquímicos y fisiológicos de las cepas originales y resistentes para garantizar que la única diferencia entre ambas era la resistencia al antibiótico. Las cepas del inóculo resistentes a rifampicina fueron conservadas a -80° C en caldo MRS con 35% de glicerol.

Un procedimiento similar se utilizó con la cepa de *Salmonella dublin* DSPV 595T utilizando el medio XLD y los antibióticos novobiocina (50 µg/ml) y ácido nalidíxico (10 µg/ml) (XLD_{nov nal}).

3.6.5. Preparación y administración del inóculo de BAL

Las bacterias se multiplicaron en leche descremada al 10% p/v suplementada con un hidrolizado de caseína (Cas3) al 5% v/v durante 18-20 h a 37 °C. La

concentración bacteriana se calculó mediante recuento en placa. El cultivo fue dispersado en contenedores y congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización en el campo. Las cepas resistentes a rifampicina integraron el inóculo probiótico, el cual estaba formado por una dosis de 150 ml totales. Se dosificó aproximadamente 10^9 UFC/Kg peso vivo (1 dosis diaria). Este inóculo fue administrado a los terneros del GP incorporado junto al sustituto lácteo durante los 27 días de experimento. El GC fue inoculado de la misma manera pero con 150 ml de leche descremada al 10% p/v, que sirvió de placebo.

3.6.6. Inoculación del patógeno

La cepa de *Salmonella dublin* DSPV 595T, desarrollada en caldo BHI durante 18 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, fue administrada junto al sustituto lácteo, en el día 11 del experimento, a todos los terneros de los 2 grupos experimentales (GC y GP). El inóculo se suministró en una dosis de 1.10^9 UFC/animal, que corresponde a la DL_{50} para dicha cepa.

3.6.7. Recuperación del inóculo de BAL, *Lactobacillus* totales y otras poblaciones de la microbiota intestinal

Las muestras fecales de 3 terneros de cada grupo (aproximadamente 5 g) obtenidas por masaje rectal los días 1, 5, 10 y 27 del ensayo fueron pesadas, diluídas 1/100 en solución Ringer $\frac{1}{4}$ y homogeneizadas en un agitador magnético. A partir de las diluciones seriadas de cada muestra se sembraron placas con diferentes medios para el recuento de las poblaciones detalladas en la tabla 3.

Tabla 3: Poblaciones estudiadas, medios y condiciones de cultivo utilizados

Microorganismo	Medios	Condiciones de cultivo
<i>Lactobacillus</i>	LAMVAB	Anaerobiosis, 48 h, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$
Inóculo	LAMVAB _{rif}	Anaerobiosis, 48 h, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$
Coliformes	Violeta Rojo y Bilis Lactosa (VRBL)	Aerobiosis, 24 h, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$
Levaduras	Hongos y Levaduras (HyL) modificado*	Aerobiosis, 48 h, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$
Enterococos	Slanetz y Bartley (SyB)	Aerobiosis, 24 h, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$

*Con el agregado de 2% de dextrosa y 0,5% de pluripectona.

3.6.8. Perfil bioquímico sanguíneo y hemograma

Las muestras de sangre (10 ml) fueron tomadas al inicio del ensayo y los días 10 y 20 de la experiencia desde la vena yugular utilizando jeringas con agujas hipodérmicas. Una parte de la muestra (2 ml) fue procesada con EDTA como anticoagulante. Esta porción de sangre anticoagulada fue utilizada para realizar el leucograma en cámara de Newbauer. El recuento diferencial (fórmula leucocitaria) se efectuó en un microscopio a partir de frotis coloreados con Giemsa. La parte restante de la muestra de sangre (5 ml) fue procesada sin anticoagulante, con la misma frecuencia, para la determinación de uremia, aspartatoaminotransferasa (AST) y gamaglutamiltranspeptidasa (GGT). La urea se midió con un espectrofotómetro y reactivos Wiener Lab. mediante la técnica de ureasa (570 nm). Las determinaciones de las enzimas hepáticas AST y GGT se realizaron por métodos enzimáticos empleando reactivos Wiener Lab.

3.6.9. Toma de signos clínicos

Se determinó diariamente el estado de salud de los animales: temperatura corporal, nivel de deshidratación y frecuencia de diarreas realizando un análisis macroscópico de las heces, presencia o ausencia de secreción ocular, estado de las mucosas, temperatura del morro, debilidad del tren posterior y dificultad en la incorporación. La evaluación de dichas características se realizó en base a los siguientes parámetros de consistencia fecal y de acuerdo con los scores propuestos por Meyer y col. (2001): 1-Normal: heces firmes, pero no duras; su forma original se distorsiona levemente cuando cae y se asienta en el suelo; 2-Blanda, no presenta forma, al caer se deposita en montículos y se dispersa levemente; 3-Fluida: se dispersa rápidamente en láminas de 6 mm de profundidad; 4-Acuosa: consistencia líquida. Se consideró “animal con diarrea”, aquel que tenía score 4. La severidad de la diarrea fue registrada según el tipo utilizando los siguientes indicadores: mucosa, con sangre, yema de huevo y fibrinosa, a los cuales se les asignó los niveles 1, 2, 3 y 4, respectivamente. El nivel de deshidratación se determinó según Blood y col., 1986 (tabla 4).

Tabla 4: Niveles de deshidratación según Blood y col., 1986.

Pérdida de peso corporal (%)	Ojos hundidos, cara arrugada	La prueba del pliegue cutáneo persiste por (s)	Hematocrito (%)	Sólidos totales del suero (g/dl)	Líquido necesario para restituir el volumen perdido (ml/kg PV)
4 a 6	Difícilmente detectable		40 a 45	7 a 8	20 a 25
6 a 8	++	2 a 4	50	8 a 9	40 a 50
8 a 10	+++	6 a 10	55	9 a 10	50 a 80
10 a 12	++++	20 a 45	60	12	99 a 120

La secreción ocular se determinó asignando los siguientes valores: 1: serosa, 2: purulenta, 3: fibrinosa. El estado de las mucosas se determinó como: normal, pálidas-hiperémicas, con petequias, ictéricas, y se les asoció los valores del 1 al 4, respectivamente. También la incorporación fue determinada como normal, lenta, con ayuda o postrado, asignando valores del 1 al 4 respectivamente. La temperatura se determinó como normal hasta 40,5 °C. Teniendo en cuenta estos parámetros se calculó la morbilidad en base a la proporción relativa de animales con apariencia anormal en cada grupo.

3.6.10. Detección de *Salmonella dublin* en sangre

Las muestras de sangre (1 ml) fueron tomadas el día 15 y 27 del experimento desde la vena yugular de todos los terneros utilizando jeringas con agujas hipodérmicas y procesadas con citrato como anticoagulante. La mitad de la muestra fue sembrada en caldo rappaport y la otra mitad en caldo selenito cistina. Después de un período de incubación de 18 h a 42 °C, se sembraron placas con agar XLD con 50 µg/ml de novobiocina y 10 µg/ml de ácido nalidíxico las cuales se incubaron 24 h a 37 °C. El hallazgo de colonias típicas junto a la prueba de aglutinación positiva con un anticuerpo policlonal arrojó un resultado positivo a *Salmonella dublin*.

3.6.11. Detección de *Salmonella dublin* en materia fecal

Las muestras de materia fecal fueron tomadas al inicio del experimento y los días 15 y 27 mediante masaje rectal. 0,1 g fue sembrado en caldo rappaport y 1 g en caldo selenito cistina. Después de un período de incubación de 18 h a 42 °C, se

sembraron placas con agar XLD con 50 µg/ml de novobiocina y 10 µg/ml de ácido nalidíxico las cuales se incubaron 24 h a 37 °C. El hallazgo de colonias típicas junto a la prueba de aglutinación positiva con un anticuerpo policlonal arrojó un resultado positivo a *Salmonella dublin*.

3.6.12. Necropsias

Se realizaron necropsias a todos los animales que murieron espontáneamente. Al final del experimento se realizó la necropsia de todos los animales que estaban vivos. Para lo cual los animales fueron insensibilizados mediante una droga eutanásica (Euthanyle®, Brouwer S.A.) administrada en condiciones de asepsia.

Se recogieron los siguientes órganos para las determinaciones microbiológicas: bazo, hígado, NL mesentérico, ileocecal y poplíteo utilizando instrumental estéril en cada tejido para minimizar la posibilidad de contaminación bacteriana entre muestras (Lee y col., 2000).

Además de las anteriores muestras de tejidos se agregaron las siguientes para el análisis histopatológico: válvula ileocecal y yeyuno.

El peso del bazo fue determinado y junto con el peso vivo se calculó el índice de peso esplénico (IPE) de la siguiente manera:

$$\text{IPE} = \frac{\text{Peso del bazo (g)}}{\text{Peso vivo (Kg)}}$$

3.6.13. Detección de *Salmonella dublin* en órganos del medio interno

Las muestras de hígado, bazo y NL mesentérico, ileocecal y poplíteo, obtenidas en condiciones asépticas fueron homogeneizadas con un Stomacher Seward Biomaster® en agua peptonada bufferada. Después de una incubación de 18 h a 37 °C, 0,1 ml fue sembrado en caldo rappaport y 1 ml en caldo selenito cistina. Luego de un período de incubación de 12 h a 42 °C en caldo selenito cistina y de 18 h a 42 °C en caldo rappaport, se sembraron placas con agar XLD_{nov nal} las cuales se incubaron 24 h a 37 °C. El hallazgo de colonias típicas junto a la prueba de aglutinación positiva con un anticuerpo policlonal (OS-A, A.N.L.I.S Dr. Carlos G. Malbrán) fue considerado como resultado positivo a *Salmonella dublin*.

3.6.14. Procesamiento de las muestras para las técnicas histológicas

Las muestras de yeyuno, ileon, válvula ileocecal, bazo, hígado, NL linfáticos mesentéricos e ileocecal fueron fijadas en formol bufferado al 10% durante 12 h y luego fueron lavadas en buffer fosfato salino (PBS) y procesadas siguiendo protocolos histológicos de rutina para efectuar la inclusión en parafina (Woods y Ellis, 1994). Por último, se efectuaron cortes seriados de 5 μm de espesor con un micrótopo rotativo, los que se montaron en portaobjetos previamente tratados con 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y fueron secados en estufa a 37 °C por 24 h. Para hacer una caracterización inicial y evidenciar la morfología general se utilizó la coloración de hematoxilina-eosina.

3.6.15. Técnica de inmunohistoquímica

Las inmunomarcaciones se realizaron sobre cortes de 5 μm de espesor del yeyuno, siguiendo el protocolo descrito previamente por Salvetti y col. (2007), según se detalla a continuación:

- 1- Desparafinización en xilol mediante dos pasajes consecutivos de 15 min cada uno.
- 2- Hidratación en una serie de alcoholes de graduación decreciente, a partir de etanol absoluto (dos pasajes de 3 min), etanol 96° (dos pasajes de 3 min) y finalmente etanol 70° (un pasaje de 3 min).
- 3- Hidratación en PBS pH 7,2 durante 5 min.
- 4- Tratamiento de recuperación antigénica. Se realizó en un horno de microondas de uso doméstico (potencia máxima 1000 W). Como solución de recuperación se usó Buffer Citrato 0,01 M pH 6,0. Los cortes fueron colocados en un Coplin sumergido en un recipiente con agua, y fueron sometidos a la siguiente secuencia de recuperación: 3 min a 100% de potencia, 12 min al 40% y 20 min dentro del microondas apagado.
- 5- Bloqueo de la actividad endógena de la enzima peroxidasa, sumergiendo las muestras durante 10 min en una solución al 3% de peróxido de hidrógeno 30 volúmenes en metanol absoluto, agregando nuevamente el mismo volumen de peróxido de hidrógeno a los 10 min.
- 6- Dos lavados en PBS durante 5 min.
- 7- Bloqueo de los sitios de unión no-específicos incubando 20 min a temperatura ambiente en cámara húmeda con una solución de suero normal de cabra (SNC) al 5%.

- 8- Incubación con el anticuerpo primario Anti bovine/ovine IgA Clon 842F9 Serotec en una dilución 1:150, para la proteína diana Inmunoglobulina A durante 16 h a 4°C (toda la noche en heladera). Para los controles de especificidad se sustituyó el anticuerpo primario por SNC.
- 9- Después de la incubación con el anticuerpo primario la cámara se retiró de la heladera y se dejó a temperatura ambiente durante 10 min.
- 10- Dos lavados consecutivos con PBS, 5 min cada uno.
- 11- Incubación con el anticuerpo secundario biotinilado preabsorbido (cabra anti-ratón) diluido 1:50, durante 30 min a temperatura ambiente.
- 12- Dos lavados consecutivos con PBS, 5 min cada uno.
- 13- Incubación con complejo streptavidina-peroxidasa lista para usar, durante 30 min a temperatura ambiente.
- 14- Dos lavados consecutivos con PBS, 5 min cada uno.
- 15- Revelado de la reacción con diaminobencidina (DAB), utilizando la solución comercial de Dako. Los cortes se observaron al microscopio para controlar el tiempo óptimo en cada prueba y de ese modo estandarizarlo.
- 16- Lavados con agua destilada, 2 de 5 min cada uno. Luego se realizó la coloración de contraste con hematoxilina activada (Biopur), deshidratación y montaje con Bálamo natural de Canadá (Canadax, Biopur) y cubreobjetos apropiados.

3.6.16. Análisis de los resultados obtenidos con inmunohistoquímica

Las imágenes generadas con un microscopio Olympus CH2, fueron digitalizadas mediante una cámara SONY CCD-IRIS conectada a una PC de escritorio. La evaluación de los preparados se realizó con el analizador digital de imágenes Image Pro-Plus 3.0. La evaluación de la técnica de inmunohistoquímica se efectuó mediante un análisis de segmentación de colores en los tonos e intensidades correspondientes a las áreas de reactividad del cromógeno utilizado, concordante con lo observado en los controles positivos. El área inmunohistoquímicamente marcada (AIHQM) se evaluó como un porcentaje del área total evaluada a través de la segmentación de colores, extrayendo los objetos de determinado color (marrón). La coloración marrón fue seleccionada con una sensibilidad de 4 (máximo 5) y luego se aplicó una máscara para

la separación permanente de los colores. Se realizó un histograma para determinar el porcentaje del área marcada (Salveti y col., 2004).

3.6.17. Análisis de lesiones macro y microscópicas

Para la evaluación de los cambios anatomopatológicos e histológicos se definieron indicadores específicos de lesiones para cada órgano. Los órganos no diana evaluados fueron articulaciones, paladar duro y blando, faringe y esófago, abomaso, duodeno pulmones y NL poplíteo. Como indicador de la intensidad se utilizó el índice de lesiones macroscópicas (ILMacro) e índice de lesiones microscópicas (ILMicro) asignando valores de 1, 2, 3 y 4 según el grado de severidad (1: Sin lesión aparente (SLA), 2: lesión leve, 3: lesión moderada, 4: lesión severa). Dichos indicadores permitieron estandarizar la rutina de observación y evaluar el grado de modificación de las estructuras. En la tabla 5 se detallan los indicadores de la intensidad de la lesión macroscópica para cada uno de los órganos diana (yeyuno, íleon, válvula ileocecal, hígado, NL ileocecal y mesentérico). La intensidad de las lesiones microscópicas se determinó según el índice de lesiones microscópicas detallado en la tabla 6 para yeyuno, válvula ileocecal, bazo, hígado, NL mesentérico, ileocecal y poplíteo.

Tabla 5: Indicadores de la intensidad de las lesiones macroscópicas utilizados para la elaboración del índice de lesiones macroscópicas en los órganos dianas estudiados.

Órgano diana	Escore según el grado de severidad de la lesión			
	1	2	3	4
Yeyuno, íleon y válvula ileocecal	SLA. Mucosa libre de edema, hemorragias, erosiones, úlcera y fibrina. Contenido: alimento en digestión.	Mucosa hiperémica con capa de moco. Contenido: alimento en digestión.	Mucosa con hemorragias y/o sufusiones, moco abundante, espeso, a veces mezclado con sangre. Erosiones. Contenido mucoso hemorrágico.	Mucosa cubierta por moco fibrinoso, ulceraciones. Contenido alimento generalmente ausente, moco fibrinoso.
NL mesentérico y NL ileocecal	SLA. Consistencia blanda. Al corte color grisáceo brillante, jugoso al corte.	Consistencia blanda, hernia al corte. Color grisáceo brillante, exuda mucha linfa.	Consistencia blanda, hernia al corte. Color rosado o rojo, exuda linfa y sangre.	Consistencia muy blanda. Al corte color gris brillante, exuda sangre y pus.
Hígado	SLA. Bordes filosos, color típico. Al corte y compresión ausencia de exceso de sangre y bilis.	Bordes levemente redondeados, color oscuro (cianótico). Al corte y compresión excesiva cantidad de sangre oscura.	Bordes redondeados, color icterico (amarillento). Al corte y compresión excesiva cantidad de sangre y bilis.	Bordes muy redondeados, color icterico o amarronado. Al corte presencia de puntos blancos (cabeza de alfiler). A la compresión abundante salida de bilis.
Bazo	SLA. Bordes filosos, consistencia firme. Al corte rojo oscuro aspecto seco.	Bordes redondeados, consistencia más blanda. Al corte rojo oscuro, resuma sangre.	Bordes muy redondeados, consistencia muy blanda, se desarma a la compresión. Salida de gran cantidad de sangre oscura.	Bordes muy redondeados, consistencia muy blanda, se desarma a la compresión. Al corte presencia de puntos blancos (cabeza de alfiler).

Tabla 6: Indicadores de la intensidad de las lesiones microscópicas utilizados para la elaboración del índice de lesiones microscópicas.

Órgano diana	Escore según el grado de severidad de la lesión			
	1	2	3	4
Yeyuno y válvula ileocecal	SLA.	Enteritis superficial: necrosis de los enterocitos del extremo de las vellosidades, leve edema de la lámina propia, eventuales microhemorragias. Cuerpo y fondos glandulares conservados con actividad mitótica regenerativa. Con o sin hiperplasia de los nódulos linfoides regionales.	Enteritis superficial: necrosis de los enterocitos del extremo de las vellosidades, infiltrados mononucleares o mixtos de la lámina propia. Cuerpo y fondos glandulares conservados con actividad mitótica regenerativa. Con hiperplasia de los nódulos linfoides regionales.	Enteritis necrotizante: necrosis coagulativa de todo o la mayor parte del cuerpo glandular con infiltrados mononucleares o mixtos. Eventual presencia de “nódulos paratifoideos” en la mucosa o en los nódulos linfoides regionales.
NL mesentérico, NL ileocecal y NL popliteo	SLA (aunque es difícil establecer esta categoría pues siempre hay algún tipo de reacción del órgano por su relacionamiento con el medio extracelular y con la circulación de linfa con diversa cantidad y calidad antigénica (por ejemplo activación del NL mesentérico en el momento de la digestión), se ha tomado como parámetro el hecho de que haya una neta separación entre la	Linfoadenitis aguda hiperplásica reaccional: hiperplasia de los folículos corticales, aumento de la parte centro folicular respecto a la parafofolicular con aumento de la población de los linfocitos en los senos y de los macrófagos fijos (“catarro” de los senos).	Linfoadenitis aguda hiperplásica inflamatoria: idem al escore 2 pero con hiperemia y edema.	Linfoadenitis aguda con presencia de “nódulos paralinfoideos” o linfoadenitis salmonelósica (subcapsulares, foliculares o en los senos).

	parte folicular con folículos de forma y tamaño regular; y una central con senos amplios, poco poblados de linfocitos y macrófagos fijos).			
Hígado	SLA (ausencia de lesiones degenerativas, necróticas e inflamatorias sinusoidales, periportales o intersticiales.	Degeneración parenquimatosa desde la tumefacción celular aguda, la microvacuolar y la grasa, sin signos inflamatorios.	Hepatitis y colangiohepatitis mononuclear o mixta con cambios degenerativos en el parénquima. Eventual estasis colangiolar o canalicular por proliferación de los canalículos biliares.	Hepatitis y colangiohepatitis salmonelósica con infiltrado mononuclear o mixto en espacios porta y sinusoides. Presencia de “nódulos paratifoideos”. Eventualmente colangiohepatitis con tromboembolia centrolobulillar sin NPT (modelo hiperagudo). Concomitante degeneración parenquimatosa.
Bazo	SLA.	Esplenitis aguda (hiperemia e infiltración de los senos).	Esplenitis aguda hemorrágica (tipo infarto rojo).	Esplenitis salmonelósica: con presencia de NPT.

3.6.18. Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA para determinar si existían diferencias significativas entre las variables paramétricas del GC y del GP estudiadas (peso, temperatura, supervivencia, recuentos microbianos, índice de peso esplénico, perfil bioquímico sanguíneo y leucograma). Los resultados se expresaron como la media aritmética y sus desvíos estándares. El análisis estadístico de las variables ordinales (translocación, lesiones, morbilidad y mortalidad) se realizaron mediante la prueba no paramétrica

Kruskal-Wallis. Las pruebas estadísticas se realizaron con el programa Statgraphics Plus para Windows ver. 3.0. (Statgraphics Plus Software®, 1997).

3.7. Evaluación de la performance de crecimiento de terneras suplementadas con 2 inóculos probióticos conservados por congelación

3.7.1. Animales

Se utilizaron 30 terneras Holstein (*Bos taurus*) con una edad promedio de 20 días de vida. Cada grupo se dispuso en 1 corral de 480 m². Fueron alimentados con la amamantadora de terneros DeLaval CF150, con un máximo de 6 litros diarios máximos de leche pasteurizada y alimento concentrado y agua *ad libitum*. La limpieza del equipo se realizó cada 12 h. Para ello la leche fue retirada del equipo en el momento de la realización de la operación. Una vez finalizada la limpieza, la leche de los grupos probióticos se devolvía al equipo y la del grupo control era descartada. La ración de leche y balanceado para cada animal estaba controlado por un sistema computarizado que regula y registra la dosis individual de alimento consumido.

3.7.2. Diseño experimental

Los animales fueron separados en 3 grupos de 10 animales: grupo inóculo A (A), grupo inóculo B (B), grupo control (C). Se hizo un diseño de bloques completos al azar. Las terneras permanecieron en experimentación durante un período de 21 días. Se determinó el consumo de leche y balanceado diariamente y el peso de los animales se tomó semanalmente. El cuidado de los animales se realizó teniendo en cuenta la Guía para el cuidado y uso de animales en investigación y enseñanza (FASS, 1998).

3.7.3. Microorganismos

El inóculo probiótico denominado A estaba compuesto por: *Lactobacillus casei* DSPV 318T, *Lactobacillus salivarius* DSPV 315T y *Pediococcus acidilactici* DSPV 006T. El inóculo probiótico denominado B estaba compuesto por la cepa *Lactobacillus plantarum* DSPV 354T.

3.7.4. Selección de mutantes resistentes a antibióticos

La resistencia al antibiótico de las cepas de los inóculos de BAL fue obtenido por cultivos sucesivos en medio LAMVAB, desde niveles bajos hasta llegar a la concentración de 10 µg/ml de rifampicina (Kurzak, 2000; Demecková y col., 2002). Para esto, un cultivo *overnight* fue esparcido en las placas de LAMVAB agar suplementada con rifampicina (LAMVAB_{rif}), y luego incubadas durante 48 h a 37 °C. Finalmente, se obtuvo una colonia utilizando el método de aislamiento. Las cepas aisladas eran resistentes a rifampicina y fueron cultivadas en MRS caldo (24 h a 37° C).

3.7.5. Preparación y administración del inóculo de BAL

Las bacterias se multiplicaron en leche descremada al 10% p/v durante 24 h a 37 °C. La concentración bacteriana se calculó mediante recuento en placa. El cultivo fue dispersado en contenedores y congelado a -20 °C hasta su utilización en el campo. Se adicionaron 30 ml de inóculo/l de leche. La dosis diaria para cada ternero fue de aproximadamente 10 Log (UFC/ml).

Se tomó una muestra de leche semanalmente para determinar el pH y la población de *Lactobacillus* totales y cepas del inóculo en LAMBAV y LAMBAV_{rif}, respectivamente.

3.7.6. Recuento de la microbiota fecal

Las muestras fecales de 3 terneros de cada grupo (aproximadamente 5 g) obtenidas por masaje rectal al inicio del tratamiento y a la semana 1, 2 y 3 del ensayo fueron pesadas, diluidas 1/100 en solución Ringer ¼ y homogeneizadas en un agitador magnético. A partir de las diluciones seriadas de cada muestra se sembraron placas con diferentes medios para el recuento de las poblaciones detalladas en la tabla 3.

3.7.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado mediante un ANOVA y test de Duncan, ambos realizados con el Programa Statgraphics Plus para Windows ver. 3.0. (Statgraphics Plus Software®, 1997) y tomando P<0,05 como diferencia significativa entre las medias.

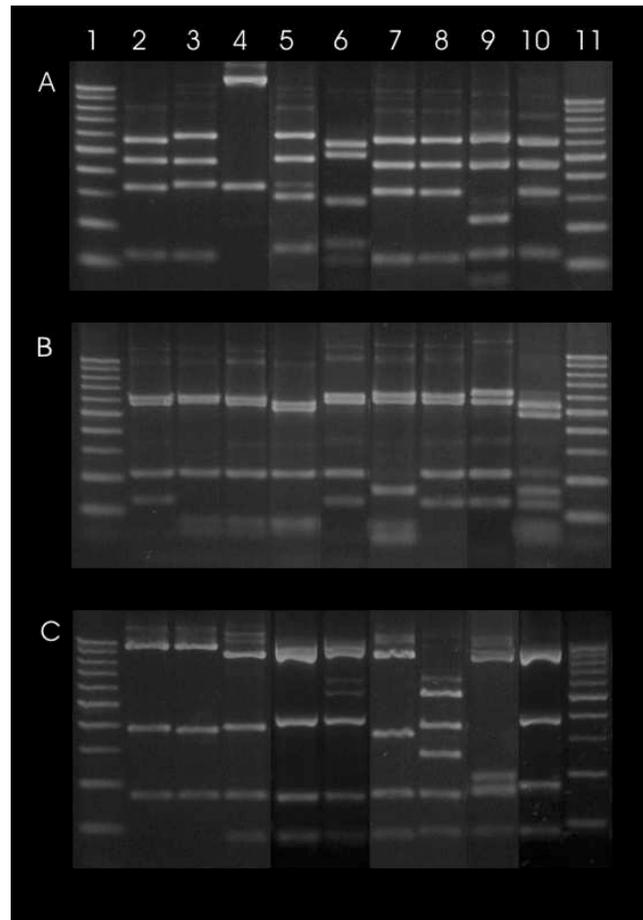
4. RESULTADOS

4.1. Aislamiento e identificación de BAL

4.1.1. Identificación de BAL aisladas por la metodología de ARDRA

Las bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto intestinal de terneros generaron 9 perfiles únicos de ARDRA entre los 42 aislamientos probados (figura 4).

Figura 4: Gel de agarosa con los diferentes grupos de restricción.



Línea 1y11, Marcador de peso molecular (100 pb); línea 2, grupo ARDRA 1 (*L. plantarum*); línea 3, grupo ARDRA 2 (*P. acidilactici*); línea 4, grupo ARDRA 3 (*W. paramesenteroides*); línea 5, grupo ARDRA 4 (*L. salivarius*); línea 6, grupo ARDRA 5 (*L. ruminis*); línea 7, grupo ARDRA 6 (*L. curvatus*); línea 8, grupo ARDRA 7 (*L. farciminis*); línea 9, grupo ARDRA 8 (*L. mucosae*); línea 10, grupo ARDRA 9 (*E. hirae*). Fragmentos de restricción obtenidos con cada enzima: A = *Hae* III, B = *Msp* I y C = *Hinf* I.

Un patrón de ARDRA fue claramente dominante entre las muestras, presentándolo 29 aislamientos de los 42 probados. El resto de los patrones de ARDRA obtenidos, estuvieron presentes en baja frecuencia (tabla 7).

Tabla 7: Número de aislamiento para cada grupo de ARDRA; frecuencia de aparición de cada especie y porción del intestino en la cual se obtuvieron los aislamientos.

Grupo ARDRA ^a	Especie relacionada	Aislamientos ^b	Frecuencia ^c	Porción del intestino
4	<i>L. salivarius</i>	29/42	6/6	Ciego
2	<i>P. acidilactici</i>	3/42	2/6	Ciego/Yeyuno
6	<i>L. curvatus</i>	1/42	1/6	Ciego
1	<i>L. plantarum</i>	2/42	1/6	Yeyuno
7	<i>L. farciminis</i>	1/42	1/6	Yeyuno
9	<i>E. hirae</i>	2/42	2/6	Ciego
3	<i>W. paramesenteroides</i>	2/42	1/6	Yeyuno
5	<i>L. ruminis</i>	1/42	1/6	Ciego
8	<i>L. mucosae</i>	1/42	1/6	Ciego

^a Los números corresponden al grupo de ARDRA obtenido por electroforesis en gel de agarosa (figura 4).

^b Aislamientos: número de aislamientos de cada grupo/total de aislamientos.

^c Frecuencia: número de terneros en los cuales cada especie fue aislada/número total de terneros estudiados.

La mayoría de los patrones de ARDRA pertenecían a especies del género *Lactobacillus*. Aunque el medio de aislamiento era específico para *Lactobacillus*, 2 de los patrones encontrados pertenecían a *Enterococcus* spp.

La restricción del fragmento amplificado del gen 16S ARNr con *Hae* III generó 6 perfiles diferentes. *Lactobacillus plantarum*, *Weissella paramesenteroides*, *L. salivarius*, *L. ruminis* y *L. mucosae* presentaron perfiles específicos para cada una de estas especies. En cambio las especies *Pediococcus acidilactici*, *L. farciminis*, *L. curvatus* y *E. hirae* mostraron fragmentos de restricción diferentes a las especies nombradas anteriormente pero no diferenciables entre sí (figura 4A).

La enzima *Msp* I también mostró 6 perfiles de restricción diferentes. Las especies que mostraron perfiles característicos fueron: *L. salivarius*, *L. curvatus*, *L. mucosae* y *E. hirae*. No fue posible diferenciar entre las especies *P. acidilactici* y *W. paramesenteroides* y entre *L. plantarum*, *L. ruminis* y *L. farciminis* (figura 4B).

La enzima *Hinf* I produjo 7 perfiles de restricción, 5 de los cuales fueron característicos de las especies *L. ruminis*, *L. curvatus*, *L. farciminis*, *L. mucosae* y *E. hirae*. Las especies *L. plantarum* y *P. acidilactici*, así como *W. paramesenteroides* y *L. salivarius* produjeron perfiles de restricción no diferenciables entre sí (figura 4C).

El perfil de restricción de cada uno de los aislamientos y su asociación con la especie correspondiente está detallado en la tabla 8.

Tabla 8: Lista de bacterias aisladas en este estudio y su filiación más cercana de acuerdo con la secuenciación del gen 16S ARNr o por la pertenencia al mismo grupo de ARDRA.

Aislamientos	Grupo ARDRA	Ternero	Especie	Porcentaje de identidad	Número de acceso al GenBank
DSPV 320T	9	1	<i>Enterococcus hirae</i>	98%	FJ751777
DSPV 321T	8	1	<i>Lactobacillus mucosae</i>	99%	FJ751778
DSPV 322T	4	1	<i>Lactobacillus salivarius</i>	99%	FJ751779
DSPV 323T	4	1	<i>Lactobacillus salivarius</i>		
DSPV 324T	4	1	<i>Lactobacillus salivarius</i>	99%	FJ751780
DSPV 325T	4	1	<i>Lactobacillus salivarius</i>	95%	FJ751781
DSPV 326T	4	2	<i>Lactobacillus salivarius</i>		
DSPV 327T	4	2	<i>Lactobacillus salivarius</i>	99%	FJ751782
DSPV 328T	4	2	<i>Lactobacillus salivarius</i>		
DSPV 329T	4	2	<i>Lactobacillus salivarius</i>	99%	FJ751783
DSPV 330T	4	2	<i>Lactobacillus salivarius</i>		
DSPV 331T	4	2	<i>Lactobacillus salivarius</i>		
DSPV 332T	4	2	<i>Lactobacillus salivarius</i>		
DSPV 333T	4	3	<i>Lactobacillus salivarius</i>	99%	FJ751784
DSPV 334T	4	3	<i>Lactobacillus salivarius</i>		
DSPV 335T	4	3	<i>Lactobacillus salivarius</i>		
DSPV 336T	4	3	<i>Lactobacillus salivarius</i>		
DSPV 337T	4	3	<i>Lactobacillus salivarius</i>		
DSPV 338T	4	3	<i>Lactobacillus salivarius</i>		
DSPV 339T	4	3	<i>Lactobacillus salivarius</i>		
DSPV 340T	4	4	<i>Lactobacillus salivarius</i>	99%	FJ751785
DSPV 341T	4	4	<i>Lactobacillus salivarius</i>		
DSPV 342T	4	4	<i>Lactobacillus salivarius</i>		
DSPV 343T	5	4	<i>Lactobacillus ruminis</i>	99%	FJ751786
DSPV 344T	4	5	<i>Lactobacillus salivarius</i>	99%	FJ751787
DSPV 345T	4	5	<i>Lactobacillus salivarius</i>		
DSPV 346T	9	5	<i>Enterococcus hirae</i>	98%	FJ751788
DSPV 347T	1	5	<i>Lactobacillus plantarum</i>		
DSPV 348T	2	5	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99%	FJ751789
DSPV 349T	3	5	<i>Weissella paramesenteroides</i>	90%	FJ751790
DSPV 350T	2	5	<i>Pediococcus acidilactici</i>		
DSPV 351T	3	5	<i>Weissella paramesenteroides</i>		
DSPV 352T	6	5	<i>Lactobacillus curvatus</i>	99%	FJ751791
DSPV 353T	7	5	<i>Lactobacillus farciminis</i>	94%	FJ751792
DSPV 354T	1	5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99%	FJ751793
DSPV 355T	4	6	<i>Lactobacillus salivarius</i>	99%	FJ751794
DSPV 356T	4	6	<i>Lactobacillus salivarius</i>		
DSPV 357T	4	6	<i>Lactobacillus salivarius</i>		
DSPV 358T	2	6	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99%	FJ751795
DSPV 359T	4	6	<i>Lactobacillus salivarius</i>		
DSPV 360T	4	6	<i>Lactobacillus salivarius</i>		
DSPV 361T	4	6	<i>Lactobacillus salivarius</i>		

4.1.2. Estudio *in silico* de los perfiles de restricción

El tamaño de los fragmentos obtenidos mediante la restricción teórica de las secuencias del GenBank que presentaron mayor porcentaje de identidad con los aislamientos coincidieron con los fragmentos de restricción obtenidos en el estudio *in vitro*.

Por otro lado, especies no aisladas que pertenecen al mismo género o grupo filogenético de los aislamientos resultaron diferenciables según el estudio *in silico* en la mayoría de los casos por restricción con la enzima *Hinf* I (tabla 9).

Tabla 9: Estudio *in silico* de los perfiles de restricción.

Grupo filogenético	Especies aisladas	Especies relacionadas ^a	Enzimas ^b
Grupo <i>Enterococcus</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Hinf</i> I
		<i>E. faecalis</i>	<i>Hinf</i> I
		<i>E. lactis</i>	<i>Hinf</i> I
		<i>E. sanguinicola</i>	<i>Hinf</i> I
		<i>E. thailandicus</i>	<i>Hinf</i> I
Grupo <i>Leuconostoc</i>	<i>W. paramesenteroides</i>	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	<i>Hae</i> III
		<i>W. confuse</i>	<i>Hinf</i> I
		<i>W. minor</i>	<i>Hinf</i> I
		<i>W. viridenses</i>	<i>Hinf</i> I
Grupo <i>L. casei-Pediococcus</i>	<i>L. mucosae</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>Hinf</i> I and <i>Msp</i> I
		<i>L. reuteri</i>	<i>Hinf</i> I and <i>Msp</i> I
	<i>L. salivarius</i>	<i>L. mali</i>	<i>Msp</i> I
	<i>P. acidilactici</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>Hinf</i> I
	<i>L. curvatus</i>	<i>L. casei</i>	<i>Hinf</i> I
<i>L. sakei</i>		<i>Hinf</i> I	
<i>P. parvolus</i>		<i>Hinf</i> I	

^a Especies relacionadas con los aislamientos utilizando el algoritmo de BLAST, y que difieren en los perfiles de restricción del gen 16S ARNr.

^b Enzimas de restricción que diferencian las especies aisladas de las especies relacionadas.

4.1.3. Identificación por secuenciación del gen 16S ARNr

Diecinueve clones representantes de los diferentes patrones de ARDRA observados, fueron seleccionados para la secuenciación.

Las secuencias obtenidas del fragmento del gen 16S rDNA fueron alineadas con aquellas presentes en el GenBank utilizando el algoritmo BLAST. La tabla 8 muestra el porcentaje de identidad de las cepas aisladas en relación a las encontradas en la base de datos y el número de acceso al GenBank de cada una de las secuencias obtenidas.

Los aislamientos DSPV 322T, 324T, 325T, 327T, 329T, 333T, 340T y 355T representan a los patrones de ARDRA que fueron encontrados más frecuentemente (29 veces) entre los 42 aislamientos evaluados, y sus secuencias del gen 16S estaban estrechamente relacionadas a la especie *Lactobacillus salivarius*. Dicha especie fue encontrada en todos los individuos estudiados. Las otras especies estuvieron representadas por 1, 2 ó 3 aislamientos y fueron encontradas en 1 o 2 individuos según el caso. Por otro lado, a excepción de *P. acidilactici* que fue encontrada tanto en yeyuno como en ciego, las especies aisladas en el intestino grueso fueron distintas a las del intestino delgado (tabla 7).

4.2. Evaluación de las propiedades probióticas de las cepas aisladas

4.2.1. Identificación de cepas patógenas utilizadas como indicadoras

Las secuencias del gen 16S ARNr que fueron remitidas al GenBank poseen un número de acceso detallado en la tabla 10.

Tabla 10: Números de acceso a las secuencias de las cepas indicadoras en el GenBank.

Cepa indicadora	Número de acceso
<i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T	FJ997268
<i>Escherichia coli</i> DSPV 247T	FJ997269
<i>Escherichia coli</i> DSPV 284T	FJ997270

4.2.2. Autoagregación

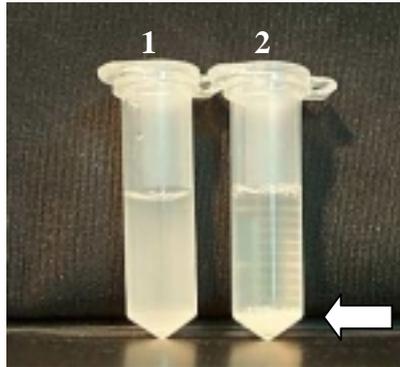
Se evaluaron 26 cepas, de las cuales, 14 fueron positivas a la autoagregación en diferentes tiempos (figura 5). Diez cepas de *L. salivarius*, 2 de *L. plantarum*, 1 de *L. curvatus* y 1 de *E. hirae* mostraron capacidad de autoagregación. Todas las cepas de *L. salivarius*, con excepción de *L. salivarius* DSPV 355T, agregaron en menos de 30 min, en cambio, las cepas de las otras especies lo hicieron más lentamente (tabla 11).

Tabla 11: Tiempo de autoagregación de las cepas estudiadas.

Cepa	Especie asociada	Autoagregación Tiempo (min)			
		15	30	60	120
DSPV 320T	<i>E. hirae</i>	-	-	-	+
DSPV 322T	<i>L. salivarius</i>	-	-	-	-
DSPV 323T	<i>L. salivarius</i>	-	-	-	-
DSPV 324T	<i>L. salivarius</i>	+			
DSPV 325T	<i>L. salivarius</i>	-	-	-	-
DSPV 326T	<i>L. salivarius</i>	-	+		
DSPV 327T	<i>L. salivarius</i>	+			
DSPV 329T	<i>L. salivarius</i>	-	-	-	-
DSPV 333T	<i>L. salivarius</i>	+			
DSPV 337T	<i>L. salivarius</i>	-	+		
DSPV 340T	<i>L. salivarius</i>	-	+		
DSPV 341T	<i>L. salivarius</i>	+			
DSPV 343T	<i>L. ruminis</i>	-	-	-	-
DSPV 344T	<i>L. salivarius</i>	+			
DSPV 346T	<i>E. hirae</i>	-	-	-	-
DSPV 347T	<i>L. plantarum</i>	-	-	-	+
DSPV 348T	<i>P. acidilactici</i>	-	-	-	-
DSPV 349T	<i>W. paramesenteroides</i>	-	-	-	-
DSPV 350T	<i>P. acidilactici</i>	-	-	-	-
DSPV 351T	<i>W. paramesenteroides</i>	-	-	-	-
DSPV 352T	<i>L. curvatus</i>	-	-	+	
DSPV 353T	<i>L. farciminis</i>	-	-	-	-
DSPV 354T	<i>L. plantarum</i>	-	-	-	+
DSPV 355T	<i>L. salivarius</i>	-	-	+	
DSPV 356T	<i>L. salivarius</i>	-	+		
DSPV 358T	<i>P. acidilactici</i>	-	-	-	-

+ significa positivo a la autoagregación, - significa negativo a la autoagregación. Las filas sombreadas pertenecen a las cepas capaces de autoagregar.

Figura 5: Ensayo de autoagregación de *L. salivarius* DSPV 324T.



1- Tubo control con suspensión de células, 2- Tubo con suspensión de células + ELC. La flecha indica el sedimento formado cuando la agregación es positiva.

4.2.3. Coagregación

Las 14 cepas capaces de autoagregar fueron evaluadas en cuanto a su capacidad de coagregación con cepas de bacterias patógenas. Solamente 2 cepas resultaron negativas a la coagregación con las 3 cepas indicadoras utilizadas en este estudio (*E. hirae* DSPV 320T y *L. curvatus* DSPV 352T). *S. dublin* 595T coagregó con doce BAL y ambas *E. coli* con 9 BAL, 7 de las cuales coagregaron con los 2 patógenos y 4 solamente con 1 de ellos. Los mejores exponentes a la característica en estudio fueron 7 cepas de *L. salivarius*, las cuales coagregaron con todas las cepas patógenas (tabla 12).

Tabla 12: Tiempo de coagregación de las BAL estudiadas frente a bacterias patógenas.

Cepa	Especie asociada	Coagregación											
		<i>S. dublin</i> 595T				<i>E. coli</i> 247T				<i>E. coli</i> 284T			
		15	30	60	120	15	30	60	120	15	30	60	120
DSPV 320T	<i>E. hirae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DSPV 324T	<i>L. salivarius</i>	+				-	+			-	-	+	
DSPV 326T	<i>L. salivarius</i>	-	-	+		-	-	+		-	-	-	-
DSPV 327T	<i>L. salivarius</i>	+				-	-	-	+	-	-	-	-
DSPV 333T	<i>L. salivarius</i>	+				-	+			-	-	+	
DSPV 337T	<i>L. salivarius</i>	+				-	+			-	-	+	
DSPV 340T	<i>L. salivarius</i>	+				-	-	+		-	-	-	+
DSPV 341T	<i>L. salivarius</i>	+				-	-	-	+	-	-	-	+
DSPV 344T	<i>L. salivarius</i>	+				-	+			-	-	+	
DSPV 347T	<i>L. plantarum</i>	+				-	-	-	-	-	-	-	+
DSPV 352T	<i>L. curvatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DSPV 354T	<i>L. plantarum</i>	-	+			-	-	-	-	-	-	-	+
DSPV 355T	<i>L. salivarius</i>	-	-	+		-	-	-	-	-	-	-	-
DSPV 356T	<i>L. salivarius</i>	+				-	-	+		-	-	+	

+ significa positivo a la coagregación, - significa negativo a la coagregación. Las filas sombreadas pertenecen a las cepas que presentan coagregación con todos los indicadores.

4.2.4. Producción de sustancias inhibidoras

Los resultados observados indicaron que algunos ELC pH 5,5 inhibieron el crecimiento de los patógenos, pero no se observaron inhibiciones con ELC a pH 6,5. De las 26 cepas evaluadas, 12 mostraron halos de inhibición con los 3 indicadores y 24 cepas inhibieron a por lo menos 1 de los patógenos. Solamente *W. paramesenteroides* DSPV 349T y *L. ruminis* DSPV 343T no produjeron inhibición del crecimiento en ninguno de los casos. Los resultados presentaron claramente una diferencia marcada en la respuesta de los 3 patógenos utilizados y entre ambas *E. coli* DSPV 284T resultó más inhibida por una mayor cantidad de BAL, presentando halos más grandes (tabla 13).

Tabla 13: Ensayo de inhibición frente a patógenos.

Cepa	Especie asociada	Inhibición a pH 5,5		
		<i>S. dublin</i> 595T	<i>E. coli</i> 247T	<i>E. coli</i> 284T
DSPV 320T	<i>E. hirae</i>	-	-	+++
DSPV 322T	<i>L. salivarius</i>	+	-	-
DSPV 323T	<i>L. salivarius</i>	+	-	+
DSPV 324T	<i>L. salivarius</i>	++	++	+++
DSPV 325T	<i>L. salivarius</i>	+	-	-
DSPV 326T	<i>L. salivarius</i>	+	++	+++
DSPV 327T	<i>L. salivarius</i>	+	+	+++
DSPV 329T	<i>L. salivarius</i>	+	+	+
DSPV 333T	<i>L. salivarius</i>	+	+	+++
DSPV 337T	<i>L. salivarius</i>	+	+	++
DSPV 340T	<i>L. salivarius</i>	+	-	-
DSPV 341T	<i>L. salivarius</i>	+	-	-
DSPV 343T	<i>L. ruminis</i>	-	-	-
DSPV 344T	<i>L. salivarius</i>	+	-	+++
DSPV 346T	<i>E. hirae</i>	+	-	-
DSPV 347T	<i>L. plantarum</i>	+	-	+++
DSPV 348T	<i>P. acidilactici</i>	+	-	++
DSPV 349T	<i>W. paramesenteroides</i>	-	-	-
DSPV 350T	<i>P. acidilactici</i>	+	+	+
DSPV 351T	<i>W. paramesenteroides</i>	-	-	+++
DSPV 352T	<i>L. curvatus</i>	+	+	+++
DSPV 353T	<i>L. farciminis</i>	+	++	+++
DSPV 354T	<i>L. plantarum</i>	+	+++	+++
DSPV 355T	<i>L. salivarius</i>	+	+	+
DSPV 356T	<i>L. salivarius</i>	+	++	+++
DSPV 358T	<i>P. acidilactici</i>	+	-	+

-representa que no hay presencia de halo de inhibición, +representa presencia de halo de inhibición de hasta 2 mm, ++representa presencia de halo de inhibición de 2 a 3 mm y +++representa presencia de halo de inhibición mayor a 3mm. Las filas sombreadas pertenecen a las cepas positivas a la inhibición de los 3 patógenos utilizados.

Algunas BAL que no presentaron propiedades de agregación o coagregación, sí mostraron propiedades de inhibición, ó viceversa. Otras cepas tales como *L. ruminis* DSPV 343T, *W. paramesenteroides* DSPV 349T, no presentaron ninguna de las características evaluadas. Los mejores exponentes para un inóculo potencialmente probiótico son aquellos que presentan las 3 características evaluadas, y en este caso representan 10 cepas de *L. salivarius* y 2 *L. plantarum* (tabla 14).

Tabla 14: Propiedades probióticas *in vitro* de las BAL aisladas desde terneros jóvenes.

Cepa	Especie asociada	Autoagregación	Coagregación	Inhibición
DSPV 320T	<i>E. hirae</i>	+	-	+
DSPV 322T	<i>L. salivarius</i>	-		+
DSPV 323T	<i>L. salivarius</i>	-		+
DSPV 324T	<i>L. salivarius</i>	+	+	+
DSPV 325T	<i>L. salivarius</i>	-		+
DSPV 326T	<i>L. salivarius</i>	+	+	+
DSPV 327T	<i>L. salivarius</i>	+	+	+
DSPV 329T	<i>L. salivarius</i>	-		+
DSPV 333T	<i>L. salivarius</i>	+	+	+
DSPV 337T	<i>L. salivarius</i>	+	+	+
DSPV 340T	<i>L. salivarius</i>	+	+	+
DSPV 341T	<i>L. salivarius</i>	+	+	+
DSPV 343T	<i>L. ruminis</i>	-		-
DSPV 344T	<i>L. salivarius</i>	+	+	+
DSPV 346T	<i>E. hirae</i>	-		+
DSPV 347T	<i>L. plantarum</i>	+	+	+
DSPV 348T	<i>P. acidilactici</i>	-		+
DSPV 349T	<i>W. paramesenteroides</i>	-		-
DSPV 350T	<i>P. acidilactici</i>	-		+
DSPV 351T	<i>W. paramesen</i>	-		+
DSPV 352T	<i>L. curvatus</i>	+	-	+
DSPV 353T	<i>L. farcimins</i>	-		+
DSPV 354T	<i>L. plantarum</i>	+	+	+
DSPV 355T	<i>L. salivarius</i>	+	+	+
DSPV 356T	<i>L. salivarius</i>	+	+	+
DSPV 358T	<i>P. acidilactici</i>	-		+

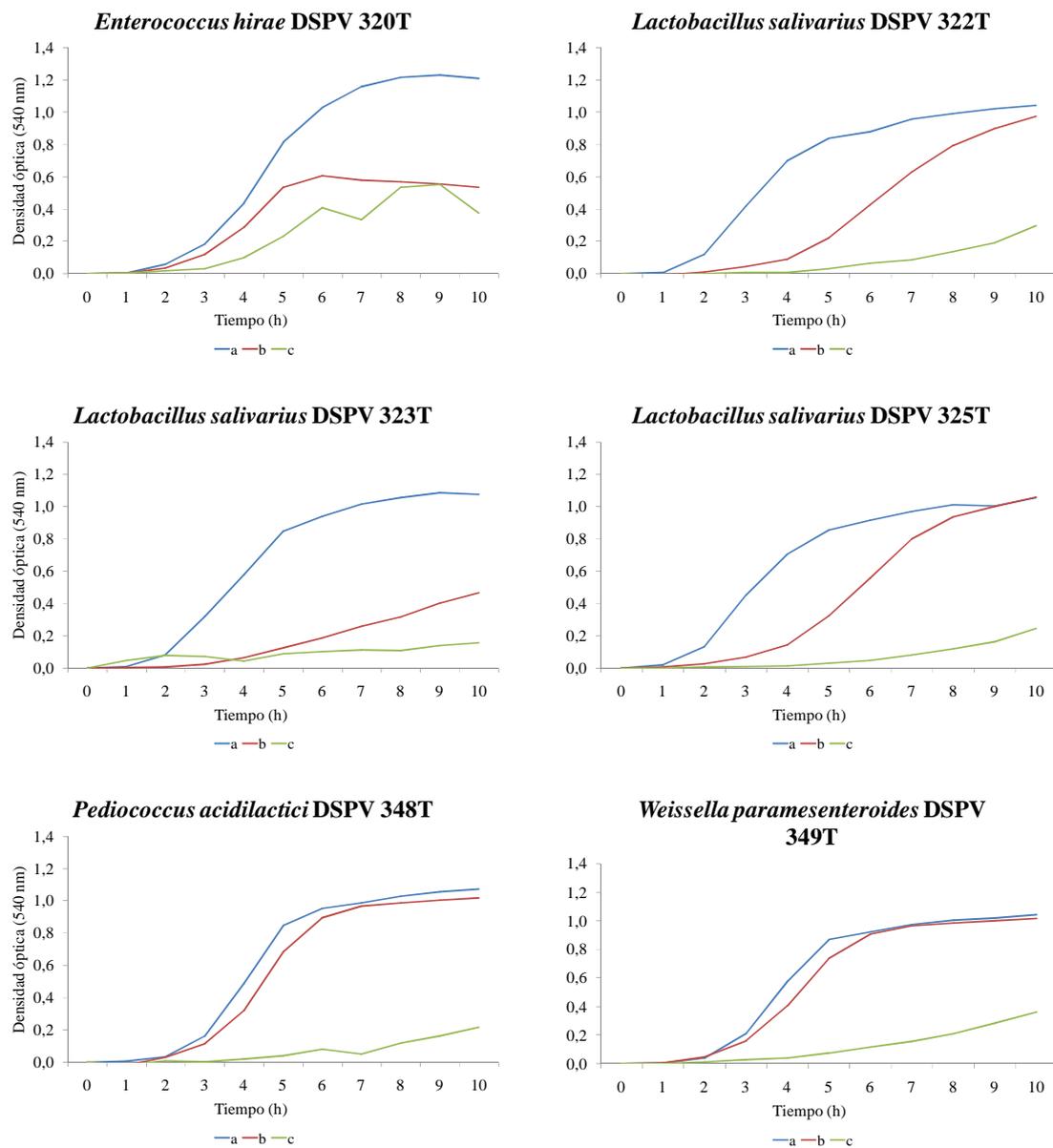
-significa negativo a la autoagregación, coagregación o inhibición según corresponda, + significa positivo a la autoagregación, coagregación o inhibición según corresponda. Las filas sombreadas corresponden a las cepas positivas a todas las propiedades evaluadas.

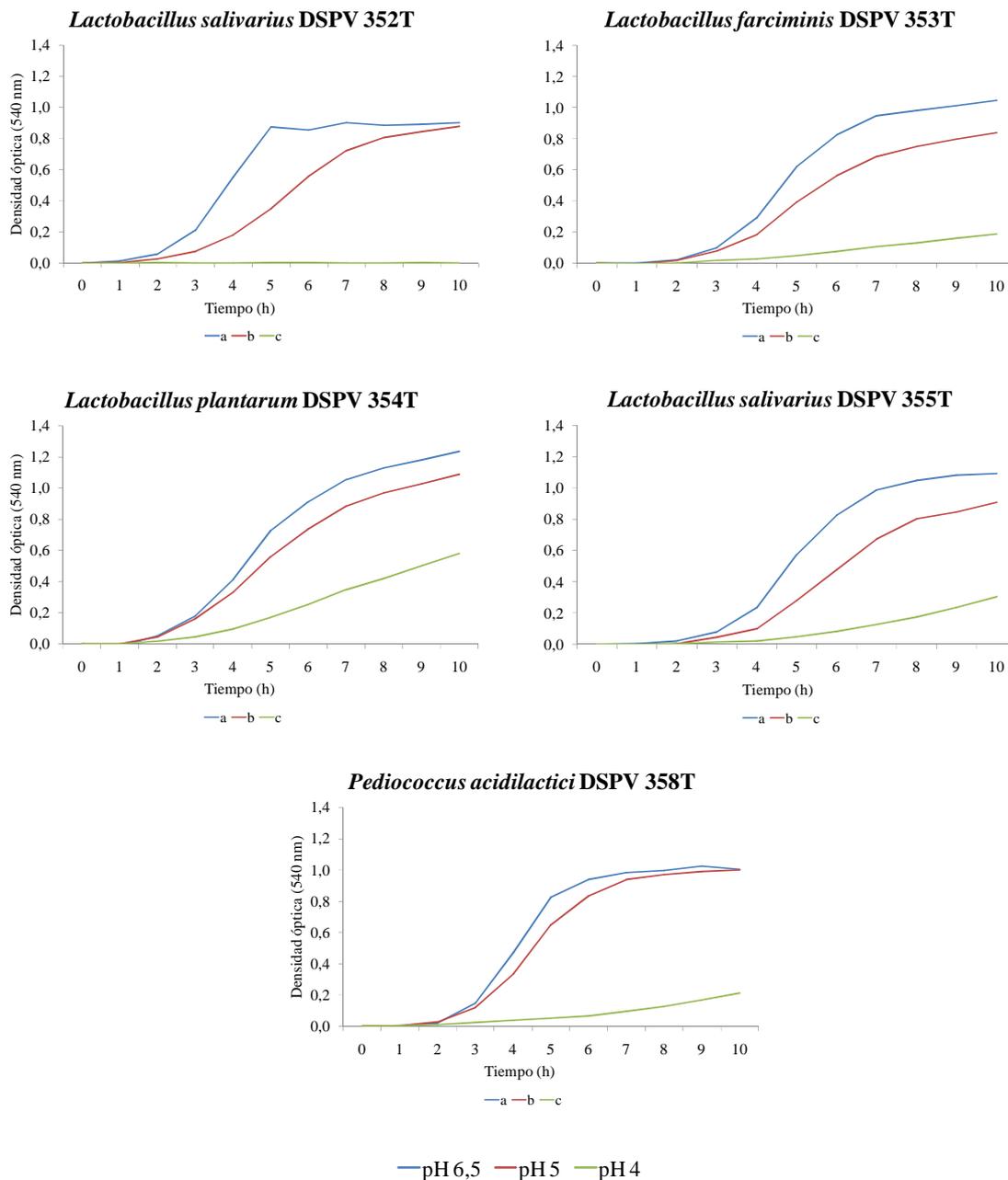
4.2.5. Influencia del pH sobre el crecimiento bacteriano

Las cepas que crecieron bien en MRS, fueron evaluadas en su crecimiento en dicho medio y en diferentes pHs. Ninguna de las cepas evaluadas tuvo capacidad de crecimiento a pH 2 y 3. Todas las cepas, con excepción de *L. salivarius* DSPV 352T crecieron a pH 4 y 5. El análisis estadístico de las curvas de crecimiento, permitió separar las cepas en 3 grupos.

El primer grupo (grupo 1) está compuesto por la mayoría de las cepas, las cuales presentaron alta sensibilidad a la disminución del pH. Las curvas de cada cepa difirieron significativamente, siendo menor el crecimiento cuanto más bajo era el pH (figura 6).

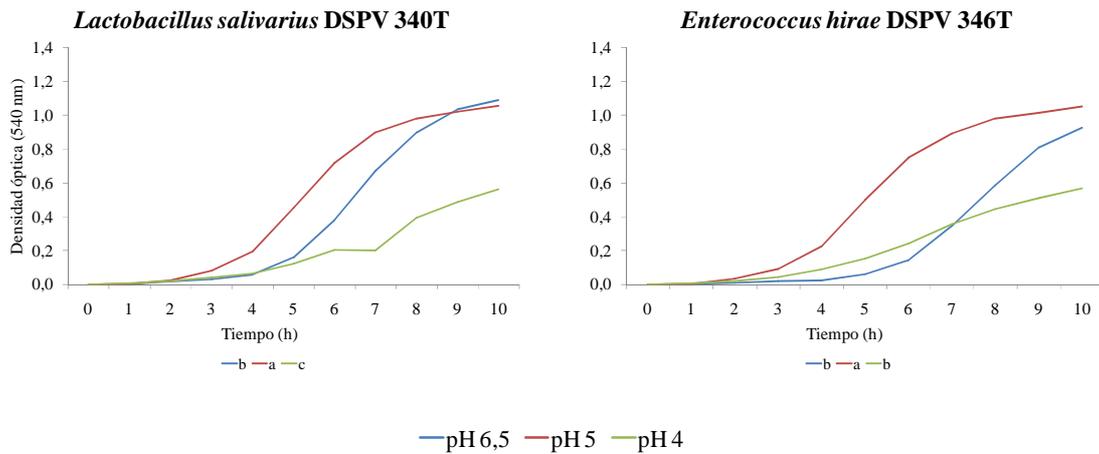
Figura 6: Cepas sensibles a pHs bajos.





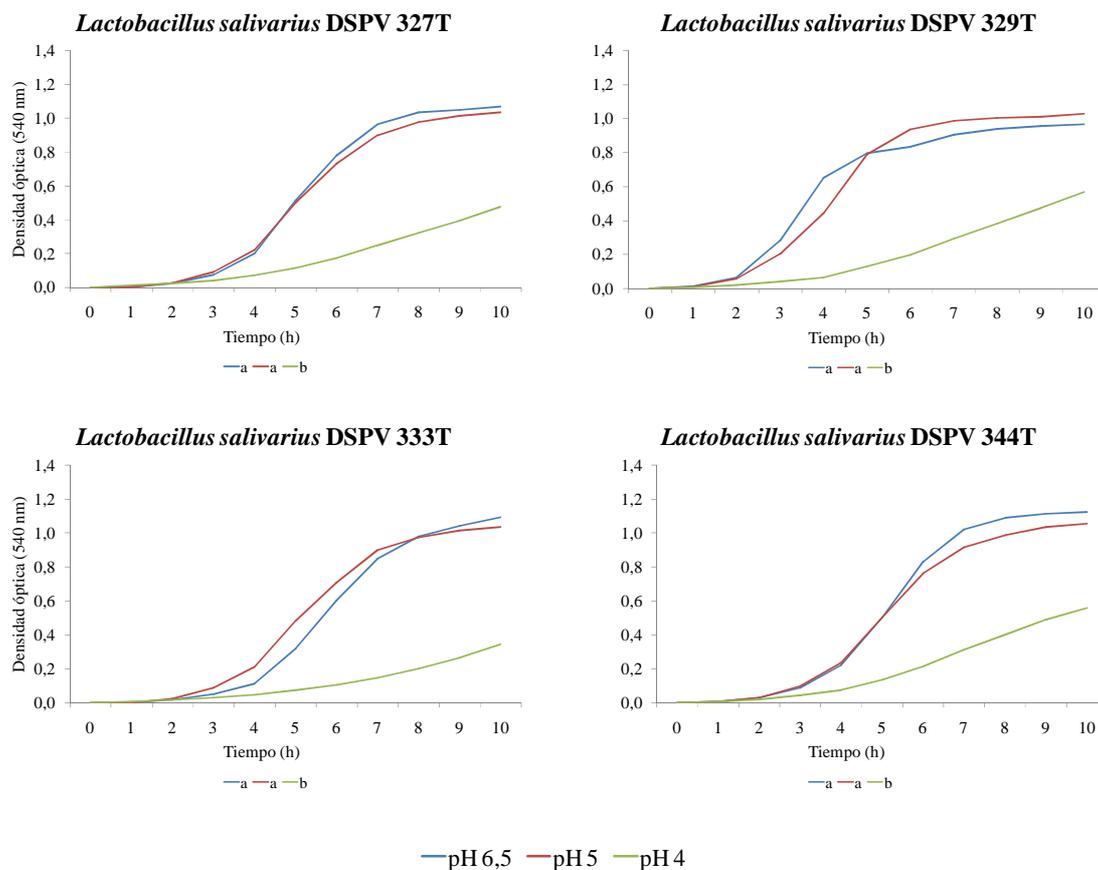
Letras diferentes representan diferencias significativas entre las curvas de crecimiento a diferentes pHs para la misma cepa.

El segundo grupo (grupo 2) está integrado solamente por 2 cepas, *E. hirae* DSPV 346T y *L. salivarius* DSPV 340T. Estas BAL presentaron la particularidad de tener mayor crecimiento ($P < 0,05$) a pH 5 que a pH neutro. Solamente *E. hirae* DSPV 346T presenta mayor desarrollo a pH 4 que neutro (figura 7).

Figura 7: Cepas con alto crecimiento a pH 5.

Letras diferentes representan diferencias significativas entre las curvas de crecimiento a diferentes pHs para la misma cepa.

El tercer grupo (grupo 3) está conformado por 4 cepas. Las mismas presentaron la característica de crecer de forma similar ($P > 0,05$) a pH 6,5 que a pH 5. A su vez, el crecimiento de las mismas a pH 4 es menor que en los pHs nombrados anteriormente (figura 8).

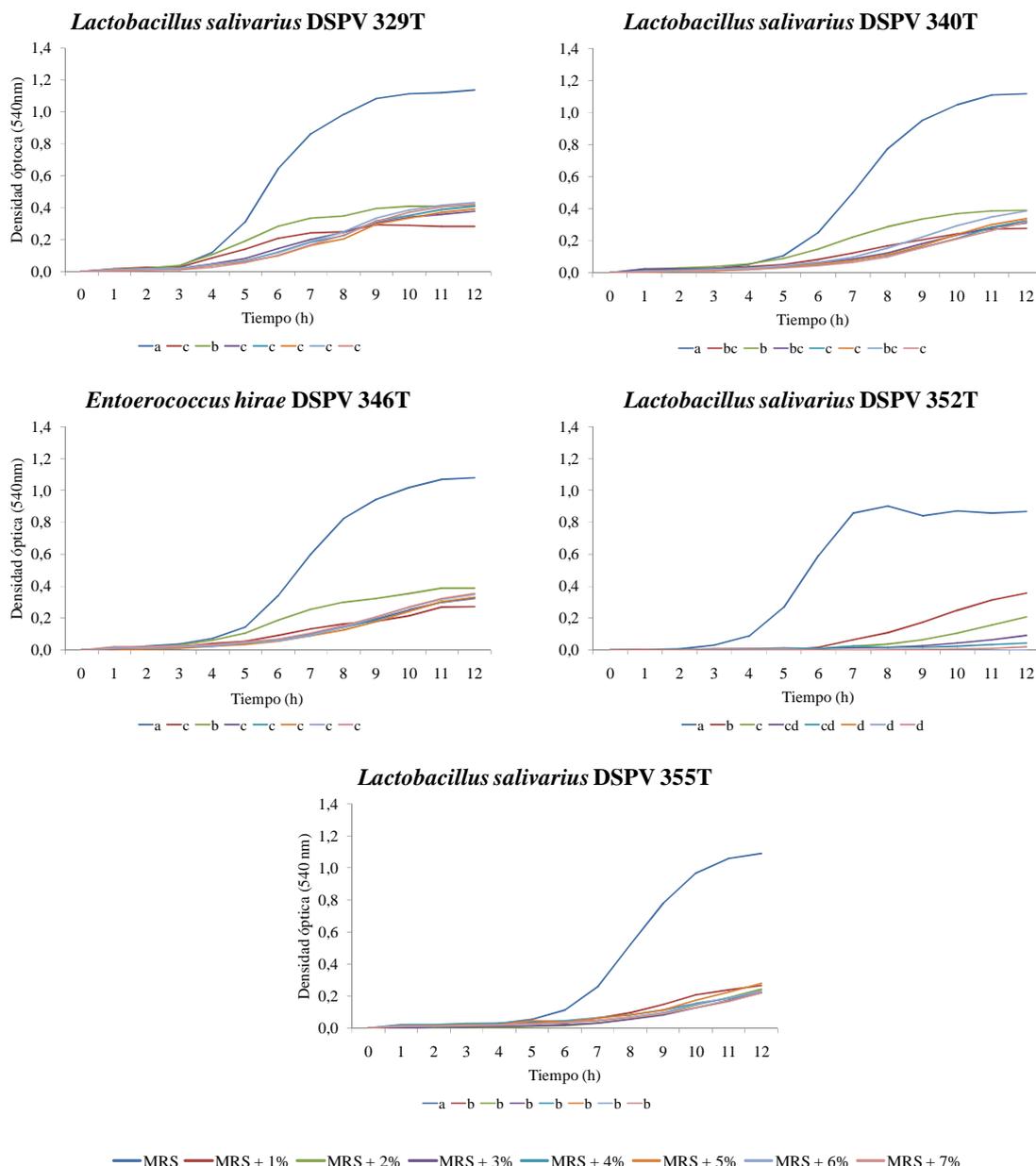
Figura 8: Cepas con crecimiento similar a pH 5 y a pH 6,5.

Letras diferentes representan diferencias significativas entre las curvas de crecimiento a diferentes pHs para la misma cepa.

4.2.6. Efecto de diferentes concentraciones de bilis sobre el crecimiento bacteriano

Los resultados permitieron agrupar las cepas en 3 grupos, dentro de los cuales, las cepas presentaron un comportamiento similar. El denominado grupo 1, compuesto por 3 cepas de *L. salivarius* y 1 cepa de *E. hirae* resultó altamente sensible a la presencia de bilis en el medio de crecimiento. El crecimiento máximo en bilis en todas las concentraciones utilizadas fue mucho menor que en MRS (figura 9).

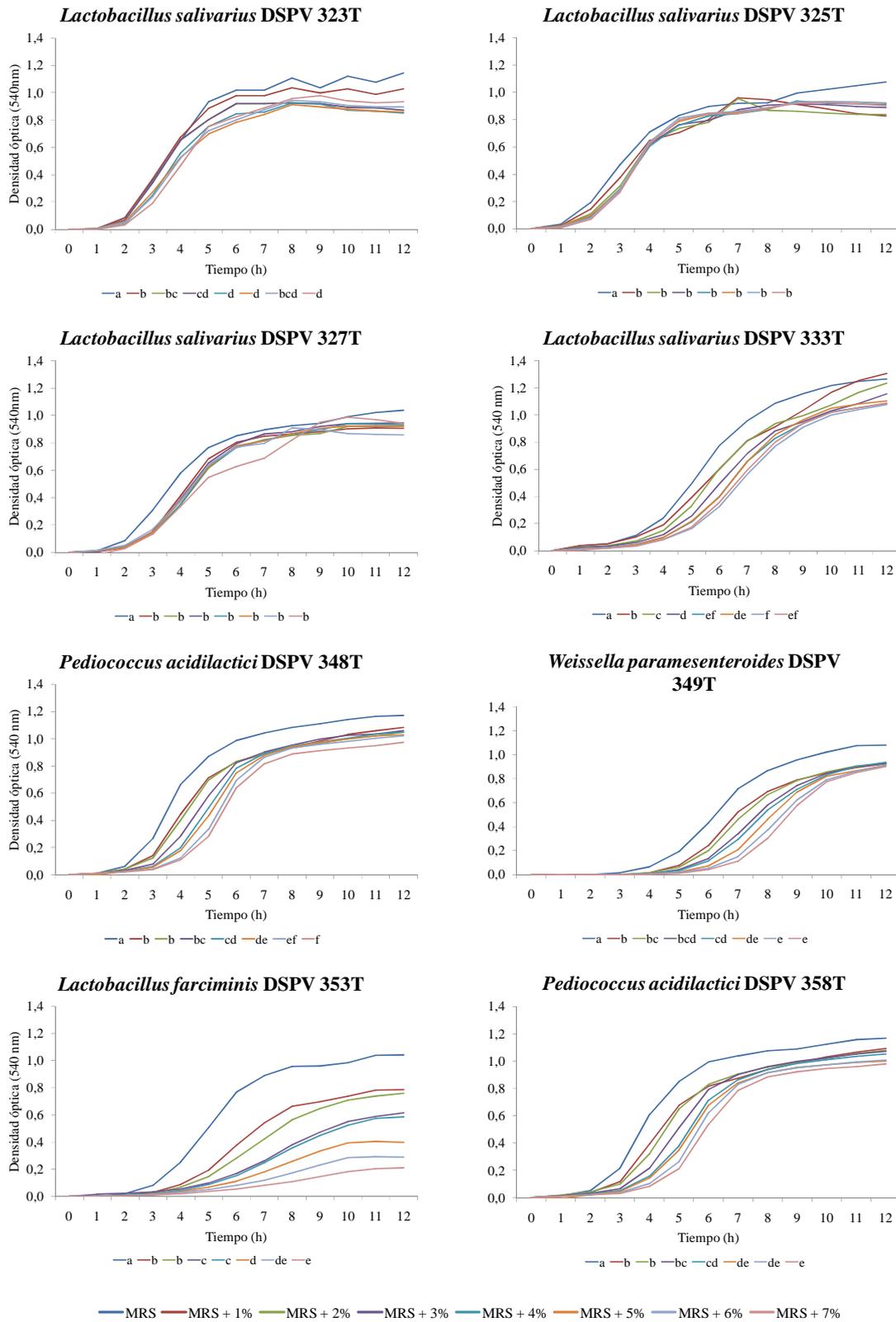
Figura 9: Grupo de cepas altamente sensibles a la presencia de bilis.



Letras diferentes representan diferencias significativas entre las curvas de crecimiento a diferentes concentraciones de bilis para la misma cepa.

El grupo 2 se conformó por cepas sensibles a las diferentes concentraciones de bilis. Está compuesto por 4 *L. salivarius*, 2 *P. acidilactici*, 1 *L. farciminis* y 1 *W. paramesenteroides*. Todas estas cepas presentaron curvas de crecimiento en MRS significativamente diferentes a las curvas de crecimiento en MRS + bilis. En general, estas cepas crecen menos, cuanto mayor es la concentración de bilis. Esta característica es más marcada para la cepa *L. farciminis* 353T (figura 10).

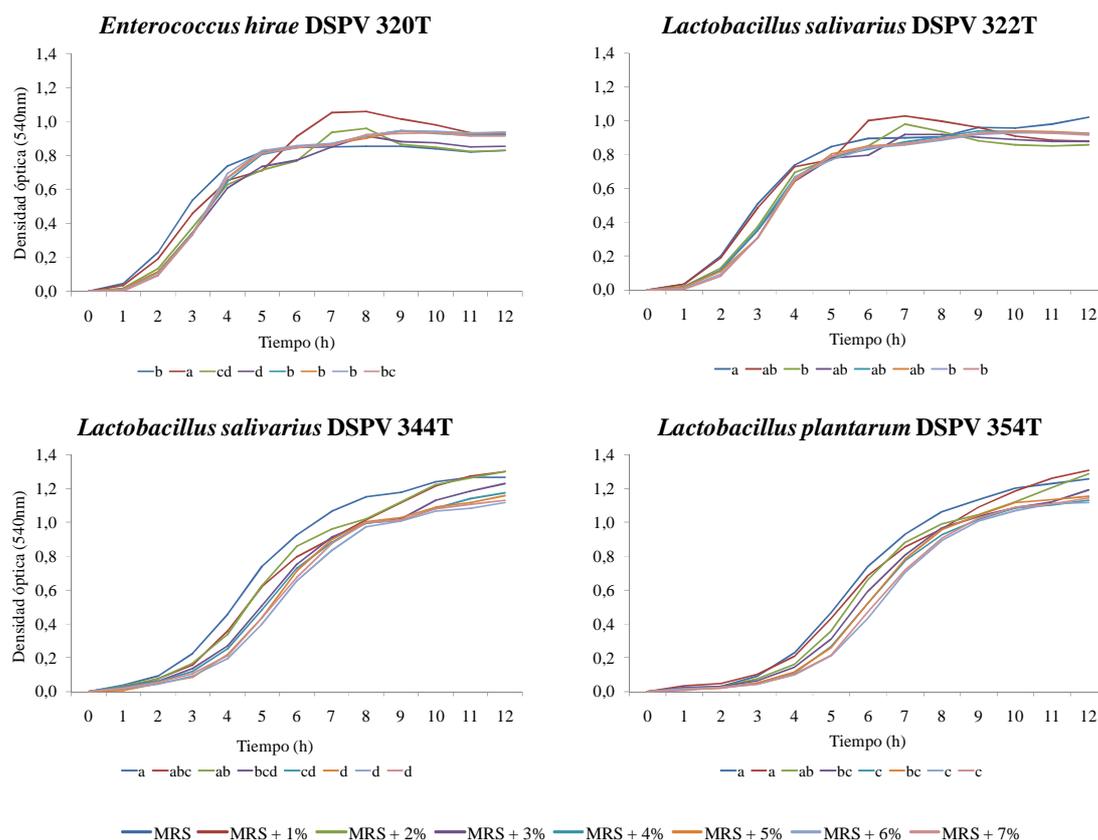
Figura 10: Cepas sensibles a las diferentes concentraciones de bilis.



Letras diferentes representan diferencias significativas entre las curvas de crecimiento a diferentes concentraciones de bilis para la misma cepa.

El grupo 3 concentra cepas poco sensibles a la presencia de bilis. Las mismas presentaron curvas similares ($P > 0,05$) en MRS y en las concentraciones de bilis más bajas. Las especies que conforman este grupo son 2 cepas de *L. salivarius*, 1 cepa de *E. hirae* y otra de *L. plantarum* (figura 11).

Figura 11: Cepas poco sensibles a la presencia de bilis.



Letras diferentes representan diferencias significativas entre las curvas de crecimiento a diferentes concentraciones de bilis para la misma cepa.

4.3. Suplementación de leche con hidrolizados proteicos como medio de crecimiento de BAL

4.3.1. Obtención de los hidrolizados

Para la hidrólisis de las diferentes proteínas se han utilizado 3 tipos de enzimas: alcalasa, neutrasa y acidasa, dejándolas actuar durante diferentes tiempos (tabla 15). El grado de hidrólisis se midió a través del ITCA, arrojando diferentes resultados según la naturaleza de la proteína y las condiciones de hidrólisis utilizadas. La caseína fue la que

mejor respondió a la hidrólisis, obteniendo los mayores ITCA. Los ITCA del gluten fueron altos también, pero algo menores a los de caseína. La hidrólisis alcanzada para el plasma fue muy escasa en comparación con las otras fuentes proteicas.

Tabla 15: Hidrolizados utilizados.

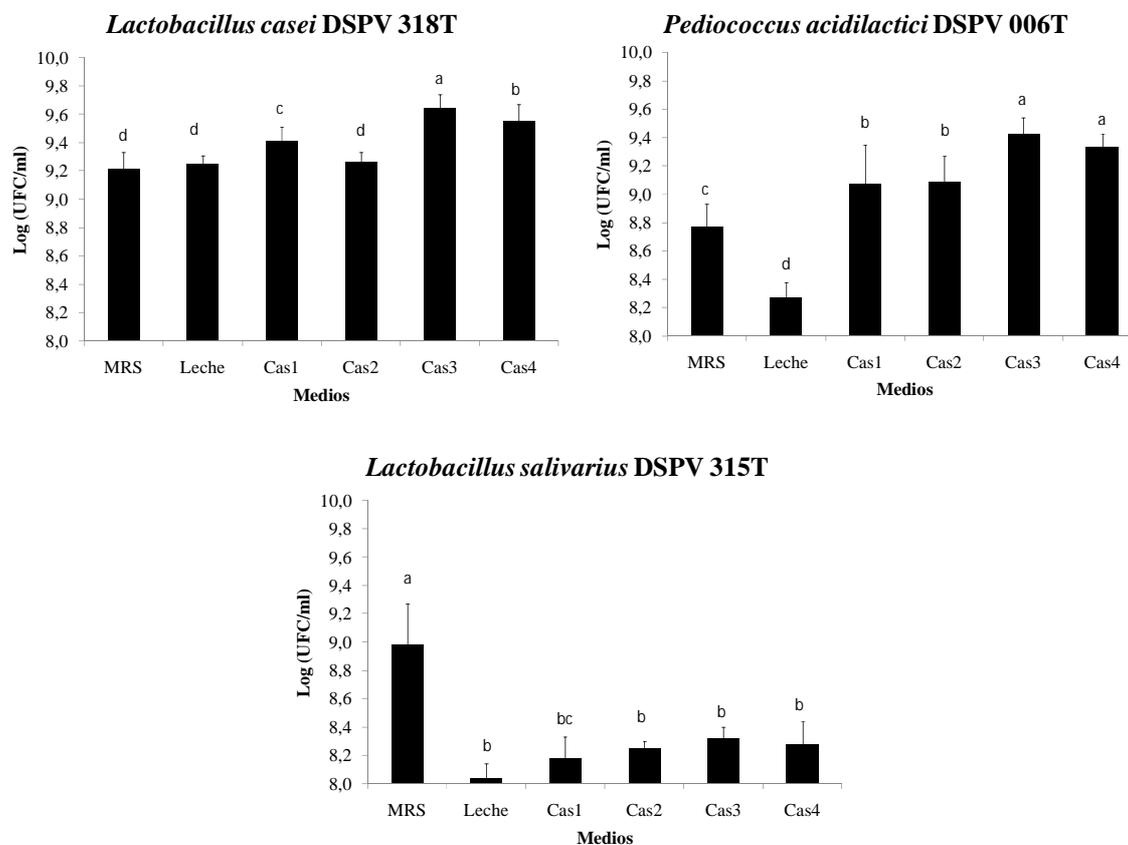
Origen	Proteinasa	Hidrolizado	Tiempo de Hidrólisis (min)	ITCA*
caseína	Alcalasa	Cas1	391	60,7
		Cas2	132	47,4
	Neutrasa	Cas3	118	54,8
		Cas4	390	61,5
gluten	Acidasa	Glu1	120	22,5
		Glu2	360	32,6
	Alcalasa	Glu3	156	41,2
		Glu4	156	31,5
Plasma	Alcalasa	Plas1	120	1,3
		Plas6	120	2,1
	Neutrasa	Plas3	120	3,18
	Alcalasa + Neutrasa	Plas4	240	4,17
		Plas5	240	3,38
Acidasa	Plas2	120	12,8	

*: Índice de tricloroacético.

4.3.2. Crecimiento de BAL en leche suplementada con hidrolizados de caseína

Cada una de las cepas tiene un crecimiento característico, tanto en MRS como en leche. La adición de hidrolizados de caseína aumentó en algunos casos el crecimiento en leche, y en otros casos superó el crecimiento alcanzado en MRS. En cuanto a *L. casei* DSPV 318T, la adición de Cas1, Cas3 y Cas4 aumentó el crecimiento celular con respecto al desarrollo logrado tanto en leche sin suplementar como en MRS. Para *P. acidilactici* DSPV 006T, sucedió lo mismo, pero en este caso, todos los hidrolizados tienen ese efecto. En cambio, el agregado de hidrolizados al medio de crecimiento de *L. salivarius* DSPV 315T no mejoró de manera significativa ($P > 0,05$) la cantidad de biomasa lograda (figura 12).

Figura 12: Crecimiento del inóculo en MRS, leche y leche suplementada con hidrolizados de caseína.

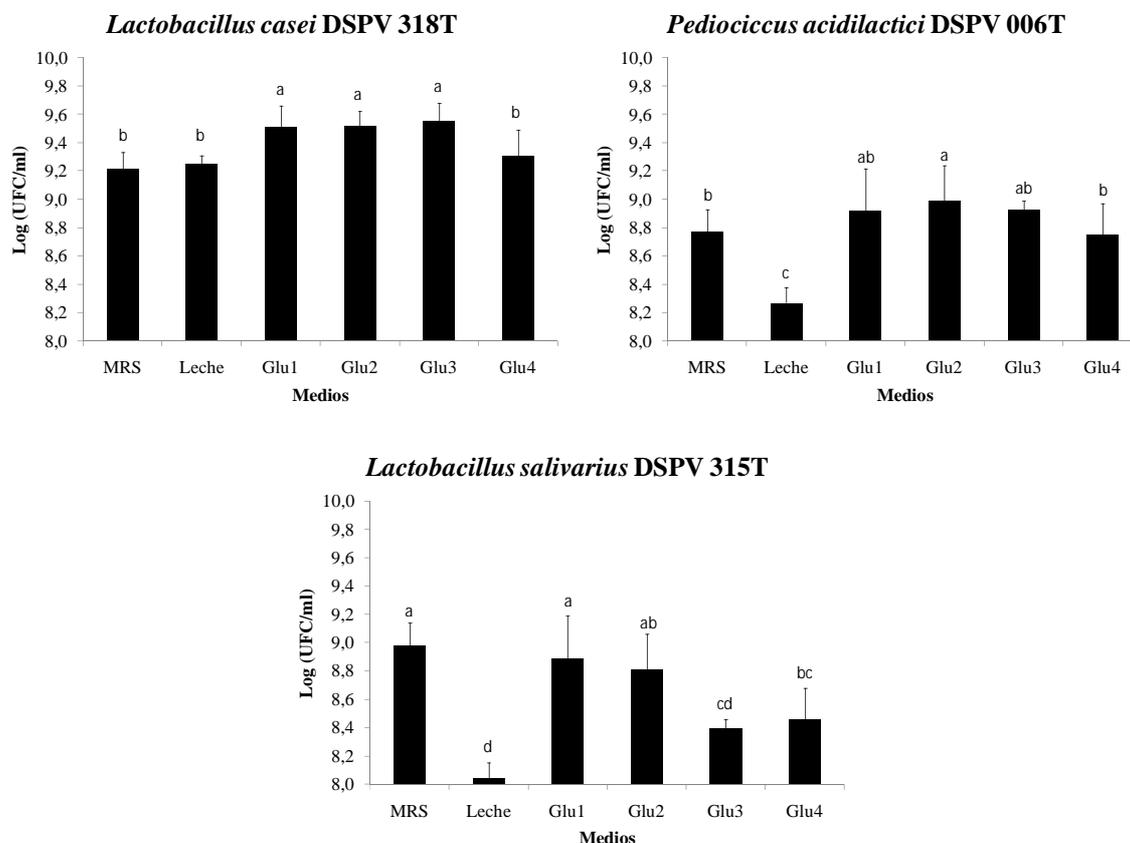


MRS: medio MRS; Leche: leche al 10% p/v; Cas1: leche al 10% p/v con hidrolizado Cas1 al 5%; Cas2: leche al 10% p/v con hidrolizado Cas2 al 5%; Cas3: leche al 10% p/v con hidrolizado Cas3 al 5%; Cas4: leche al 10% p/v con hidrolizado Cas4 al 5%. Letras diferentes representan diferencias significativas en el crecimiento de una misma cepa en medios con distintos hidrolizados.

4.3.3. Crecimiento de BAL en leche suplementada con hidrolizados de gluten

Los hidrolizados de gluten también produjeron un aumento significativo del crecimiento ($P < 0,05$) con respecto al desarrollo en leche sin suplementar y en MRS. Los hidrolizados que presentaron dichos efectos para la cepa *L. casei* DSPV 318T fueron Glu1, Glu2 y Glu3. En el caso de *P. acidilactici* DSPV 006T la adición de Glu2, provocó un desarrollo de la biomasa superior a la leche y al MRS. El resto de los hidrolizados mejoraron la concentración celular con respecto a la leche sin suplementar alcanzando un desarrollo similar al del MRS. La cepa *L. salivarius* DSPV 315T aumentó el crecimiento en leche cuando dicho medio era suplementado con Glu1, Glu2 y Glu4, alcanzando valores similares a los de MRS con los 2 primeros (figura 13).

Figura 13: Crecimiento del inóculo en MRS, leche y leche suplementada con hidrolizados de gluten.

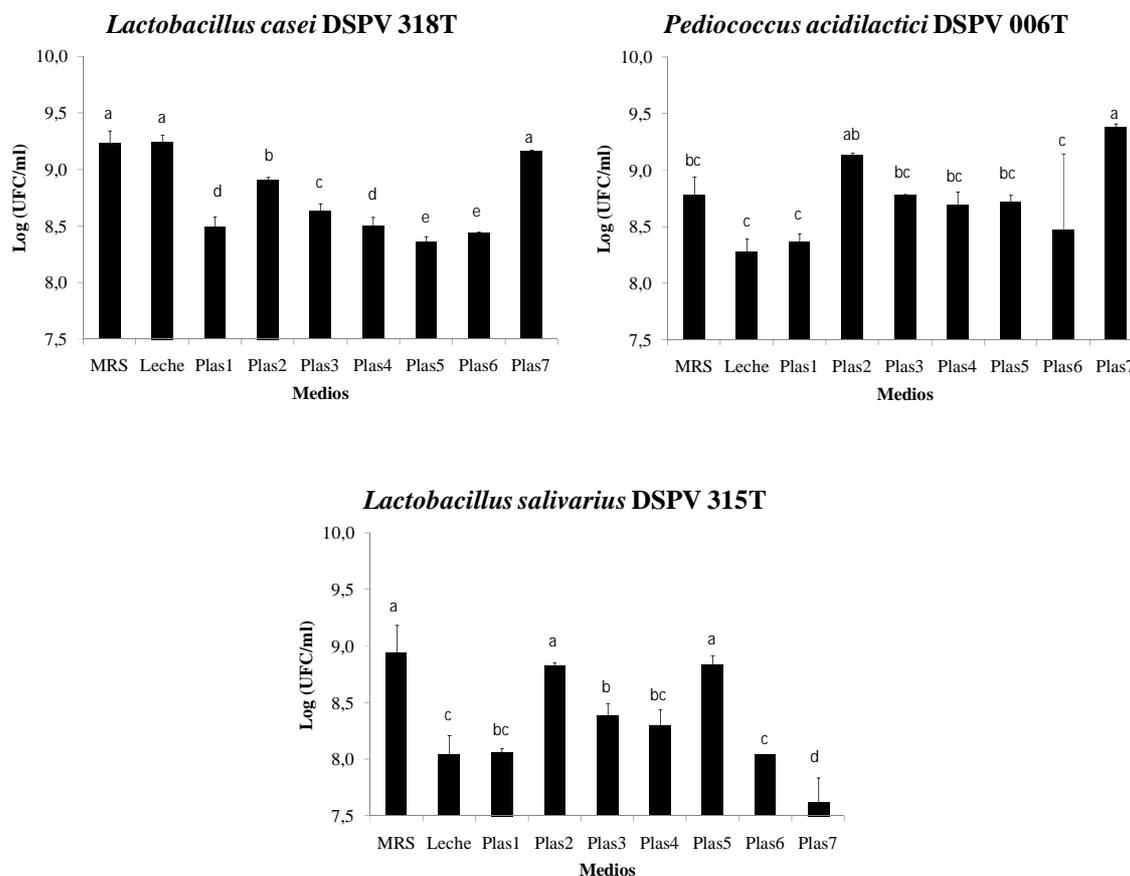


MRS: medio MRS; Leche: leche al 10% p/v; Glu1: leche al 10% p/v con hidrolizado Glu1 al 5%; Glu2: leche al 10% p/v con hidrolizado Glu2 al 5%; Glu3: leche al 10% p/v con hidrolizado Glu3 al 5%; Glu4: leche al 10% p/v con hidrolizado Glu4 al 5%. Letras diferentes representan diferencias significativas en el crecimiento de una misma cepa en medios con distintos hidrolizados.

4.3.4. Crecimiento de BAL en leche suplementada con hidrolizados de plasma

Los hidrolizados de plasma, no mejoraron el crecimiento de *L. casei* DSPV 318T, y a excepción de Plas7, los hidrolizados produjeron un crecimiento menor ($P < 0,05$) con respecto al medio no suplementado. Para la cepa *P. acidilactici* DSPV 006T, Plas7 produjo el mayor crecimiento ($P < 0,05$) de todos los medios evaluados, inclusive de MRS y Plas2 mejoró el crecimiento ($P < 0,05$) con respecto a la leche sin suplementar, alcanzando los valores de referencia del MRS. *L. salivarius* DSPV 315T presentó los mayores desarrollos de biomasa con los medios MRS, Plas2 y Plas5. El hidrolizado Plas3 no alcanzó los valores de los medios nombrados anteriormente, pero mejoró el desarrollo alcanzado por la leche no suplementada ($P < 0,05$) (figura 14).

Figura 14: Crecimiento del inóculo en MRS, leche y leche suplementada con hidrolizados de plasma.



MRS: medio MRS; Leche: leche al 10% p/v; Plas1: leche al 10% p/v con hidrolizado Plas1 al 5%; Plas2: leche al 10% p/v con hidrolizado Plas2 al 5%; Plas3: leche al 10% p/v con hidrolizado Plas3 al 5%; Plas4: leche al 10% p/v con hidrolizado Plas4 al 5%; Plas5: leche al 10% p/v con hidrolizado Plas5 al 5%; Plas6: leche al 10% p/v con hidrolizado Plas6 al 5%; Plas7: leche al 10% p/v con hidrolizado Plas2 al 50% v/v. Letras diferentes representan diferencias significativas en el crecimiento de una misma cepa en medios con distintos hidrolizados.

4.4. Conservación en condiciones de refrigeración y congelación

4.4.1. Conservación en refrigeración y congelación de los microorganismos multiplicados en MRS

En general, la viabilidad celular en el medio MRS mostró un comportamiento diferente ($P < 0,05$) entre las distintas temperaturas evaluadas (figura 15). En condiciones de refrigeración las cepas se conservaron viables por lo menos durante 84 días, en cambio, las condiciones de congelación permitieron encontrar células vivas, de todas las

cepas estudiadas, a lo largo de todo el ensayo (360 d). Además se observó una gran variabilidad entre las tres cepas al considerar sus porcentajes de viabilidad.

Las 2 cepas de *Lactobacillus* fueron las que presentaron el menor tiempo de supervivencia en condiciones de refrigeración (84 días) y no hubo diferencias ($P>0,05$) en el comportamiento de ambas en dichas condiciones.

La conservación en refrigeración de *L. casei* DSPV 318T produjo una disminución menos pronunciada del porcentaje de viabilidad respecto de la congelación ($P<0,05$). Hasta el día 84 de la experiencia, se encontró un mayor porcentaje de viabilidad ($P<0,05$) en refrigeración que en congelación, no obstante, en esta última condición de almacenamiento se pudieron encontrar células viables hasta el final del estudio. Los recuentos obtenidos fueron superiores al NMR hasta los días 63 y 21 del ensayo, en condiciones de refrigeración y congelación respectivamente.

L. salivarius DSPV 315T presentó un comportamiento en condiciones de refrigeración similar al descrito para *L. casei* DSPV 318T. Sin embargo, en congelación las células mantuvieron el NMR hasta el final del estudio.

A diferencia de las otras cepas estudiadas, *P. acidilactici* DSPV 006T permaneció viable durante los 360 días en ambas temperaturas, y no presentó diferencias significativas ($P>0,05$) entre las temperaturas de almacenamiento estudiadas hasta el día 42 inclusive. Sin embargo, a partir del día 63 la pérdida de la viabilidad fue significativamente menor en congelación ($P<0,05$), llegando al final del estudio con un alto porcentaje de células vivas y manteniendo el NMR hasta el final del ensayo. En condiciones de refrigeración el NMR sólo se mantuvo hasta el día 84.

4.4.2. Conservación en refrigeración y congelación de los microorganismos multiplicados en leche

Al igual que en MRS, en el medio leche se observaron diferencias significativas entre las dos temperaturas de almacenamiento estudiadas, siendo mayor la viabilidad de los microorganismos mantenidos en congelación (figura 15).

L. casei DSPV 318T fue la única cepa que no sobrevivió en condiciones de refrigeración por un periodo superior a los 84 días. La comparación de la viabilidad de esta cepa, en ambas temperaturas, no arrojó diferencias significativas ($P>0,05$) hasta el día 21 inclusive. A partir de este momento la pérdida de viabilidad fue

significativamente mayor en refrigeración. Sin embargo, en tales condiciones, la concentración celular permaneció en valores superiores al NMR hasta el día 84 del experimento. Por otro lado, en congelación se mantuvo un alto porcentaje de viabilidad hasta el día 360, con valores que superaron el NMR.

Las otras dos cepas estudiadas, a diferencia de *L. casei* DSPV 318T, permanecieron viables en ambas condiciones de almacenamiento durante todo de experimento. *L. salivarius* DSPV 315T no presentó diferencias significativas ($P > 0,05$) en cuanto a los recuentos bacterianos, entre las dos condiciones de temperatura estudiadas, hasta el día 63 inclusive. A partir del día 84, la pérdida de viabilidad de esta cepa fue mayor ($P < 0,05$) en refrigeración, no obstante, en estas condiciones los recuentos celulares superaron el NMR hasta el final del estudio.

Por su parte, *P. acidilactici* DSPV 006T presentó, en condiciones de congelación, recuentos celulares superiores ($P < 0,05$) a los encontrados en refrigeración a partir del día 42. A pesar de ello, la conservación en refrigeración permitió mantener altos porcentajes de viabilidad hasta el final del experimento, con valores que superaban el NMR.

4.4.3. Comparación entre medios de conservación y condiciones de almacenamiento

En forma general se observaron valores de viabilidad mayores en la leche que en MRS para ambas condiciones de almacenamiento evaluadas.

L. casei DSPV 318T permaneció viable hasta el día 84 en refrigeración y hasta el final del experimento en congelación en ambos medios (figura 15). No obstante, en refrigeración el porcentaje de viabilidad entre los dos medios estudiados fue diferente ($P < 0,05$), finalizando el estudio con una mayor concentración bacteriana en el medio leche. En congelación *L. casei* DSPV 318T también mostró mejores resultados en la leche a lo largo de la experiencia. Esta cepa mantuvo el 22,3% de viabilidad al final del estudio en la leche, resultando ampliamente superior ($P < 0,05$) al MRS el cual mantuvo vivas menos del 1% de las células, respecto de la cantidad inicial.

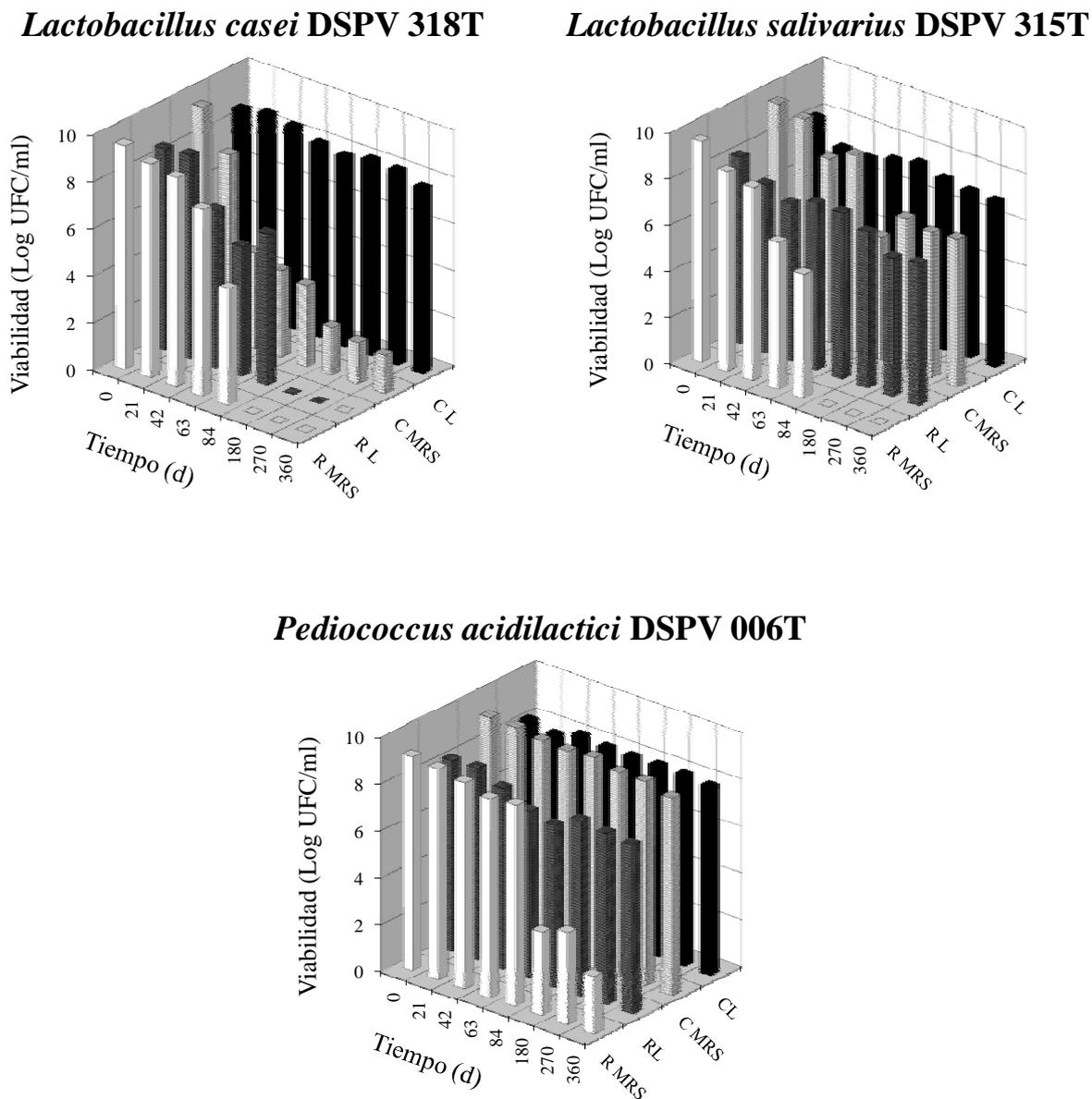
L. salivarius DSPV 315T, presentó diferencias significativas ($P < 0,05$) en el tiempo de conservación celular entre ambos medios en refrigeración; mientras que en MRS se observó viabilidad hasta el día 84, en la leche las células se mantuvieron

viables hasta el final de la experiencia (figura 12). En el medio leche, además, se obtuvieron recuentos superiores ($P < 0,05$) a los encontrados en el MRS en todas las determinaciones realizadas. Por otra parte, en condiciones de congelación se encontraron células viables hasta el final del estudio en ambos medios, no obstante, los recuentos encontrados en leche fueron superiores ($P < 0,05$) a los obtenidos en MRS a partir del día 42 inclusive.

P. acidilactici DSPV 006T mostró una viabilidad diferente ($P < 0,05$) entre los medios estudiados, tanto en condiciones de refrigeración como de congelación. A 4 °C no hubo diferencias entre los medios hasta el día 42, y desde este momento hasta el día 84 el porcentaje de viabilidad fue mayor ($P < 0,05$) para el MRS. Luego, la mayor viabilidad se encontró en la leche ($P < 0,05$), manteniendo el 12,1% de células vivas al final del estudio (figura 15). En congelación se presentaron diferencias ($P > 0,05$) a partir del día 42 inclusive, finalizando con un 74,4% de células vivas en leche al final del ensayo, y superando el porcentaje de viabilidad en MRS que sólo alcanzó el 18,8%.

Independientemente de la cepa estudiada, la conservación mediante congelación fue la que mostró mayor supervivencia de los microorganismos, encontrándose células vivas hasta el final del estudio (360 días). Desde el punto de vista del NMR, todas las cepas congeladas en medio leche mantuvieron dichos niveles de viabilidad hasta el año, mientras que en MRS sólo lo hicieron *L. salivarius* DSPV 315T y *P. acidilactici* DSPV 006T. Por el contrario, *L. casei* DSPV 318T en esas condiciones mantuvo el NMR sólo hasta el día 21. En refrigeración, se mantuvo el NMR por un mínimo de 84 días.

Figura 15: Viabilidad celular de *L. casei* DSPV 318T, *L. salivarius* DSPV 315T y *P. acidilactici* DSPV 006T durante su conservación en refrigeración (R) y congelación (C) en medio leche (L) y MRS.



4.5. Conservación de *L. casei* DSPV 318T por encapsulación en perlas de alginato de calcio y almidón

4.5.1. Ensayo de formación de cápsulas de alginato de calcio a partir de cultivos en diferentes medios

En primer lugar, se encontró que la relación 1 mol de EDTA/ 2 moles de calcio presentes en la leche, fue la más adecuada para secuestrar el calcio de la leche y evitar

interferencias. Por otro lado se observó que si la leche coagula, por la presencia de ácido láctico producto del metabolismo bacteriano, el EDTA no clarifica la leche. Por lo tanto, la forma de salvar este inconveniente fue finalizar el cultivo antes de su coagulación y agregar EDTA, o bien agregar EDTA antes de la inoculación de la leche con los microorganismos. A partir de tales resultados se continuaron los estudios utilizando como medio de desarrollo de la biomasa caldo MRS y medio base leche con la adición de EDTA antes del crecimiento microbiano.

Tabla 16: Recuentos bacterianos en perlas producidas a partir de diferentes cultivos y con diferentes concentraciones de alginato de calcio.

Medio de cultivo	Alginato de calcio	Rec. Inicial ^a (Log UFC/ml)	Rec. Cápsulas ^b (Log UFC/g)	Rec. Incubación ^c (Log UFC/g)
LECHE	1%	9,00	8,25	9,77
	4%	9,04	6,87	9,25
MRS	1%	9,48	< 5,40	8,93
	4%	9,42	< 5,45	8,56

^a Recuento bacteriano en el medio de cultivo.

^b Recuento bacteriano en las cápsulas.

^c Recuento bacteriano en las cápsulas luego de la incubación de las mismas en medio leche + suplemento proteico durante 24 h.

Las cápsulas formadas a partir del medio leche favorecieron el entrapamiento de las células que se puso de manifiesto arrojando un mayor recuento celular por g de perla que las producidas a partir del medio MRS (tabla 16). Además, se determinó un aumento del número de células dentro de las perlas incubadas en leche suplementada con hidrolizado proteico durante 24 h, donde también se observó mayor concentración bacteriana en las perlas que se formaron a partir del medio leche (tabla 16). Con respecto a la cantidad de alginato de sodio utilizada, la menor concentración permitió un desarrollo microbiano más alto ($P < 0,05$) (tabla 16), mientras que la concentración mayor originó una cápsula más compacta. La figura 16 muestra perlas formadas a partir de los cultivos en diferentes medios.

Figura 16: Perlas de alginato de calcio.

- a) Cápsula de alginato de calcio, con *Lactobacillus casei* desarrollada en caldo MRS.
 b) Cápsulas de alginato de calcio, con *Lactobacillus casei* desarrollada en medio leche clarificada con EDTA.

4.5.2. Evaluación del efecto de la suplementación de leche sobre el crecimiento de *L. casei* DSPV 318T

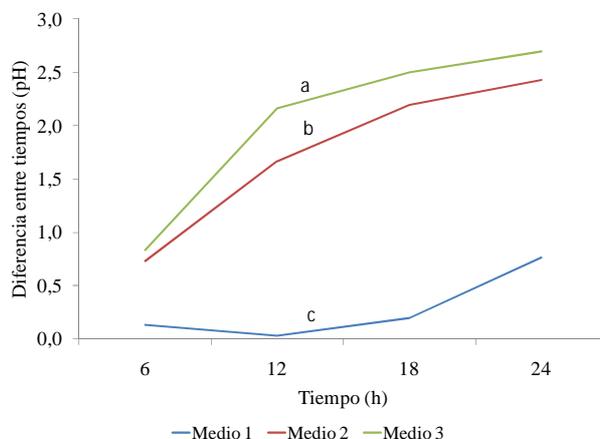
Los medios de cultivo evaluados para *L. casei* DSPV 318T mostraron diferencias significativas ($P < 0,05$) tanto en el recuento celular (tabla 17) como en la disminución del pH a través del tiempo (figura 17).

Tabla 17: Crecimiento de *L. casei* DSPV 318T en 3 medios diferentes.

Tiempo (h)	Log UFC/ml		
	Medio 1	Medio 2	Medio 3
0	6,81 ^a	6,76 ^a	6,70 ^a
6	7,77 ^c	8,10 ^b	8,26 ^a
12	8,41 ^c	9,02 ^b	9,14 ^a
18	8,59 ^b	9,19 ^a	9,19 ^a
24	8,86 ^a	8,68 ^a	8,85 ^a

Medio 1: Leche 10%; Medio 2: Leche 10% + glucosa 20 g/L + Mg 0,2 g/L + Mn 0,05 g/L;
 Medio 3: Leche 10% + glucosa 20 g/L + Mg 0,2 g/L + Mn 0,05 g/L + Hidrolizado de caseína (Cas3) 5%. Letras diferentes significan diferencias significativas entre medios para cada hora.

Figura 17: Diferencia de pH entre las horas 6, 12, 18 y 24 y la hora 0 para el crecimiento de *L. casei* DSPV 318T en medio leche con diferentes suplementos.



Medio 1: Leche 10%; Medio 2: Leche 10% + glucosa 20 g/L + Mg 0,2 g/L + Mn 0,05 g/L; Medio 3: Leche 10% + glucosa 20 g/L + Mg 0,2 g/L + Mn 0,05 g/L + Hidrolizado de caseína (Cas3) 5%. Letras diferentes significan diferencias significativas entre las curvas de cada medio.

Se determinó que el mejor medio fue el Medio 3, alcanzando el mayor recuento celular entre las 6 y 12 h. Teniendo en cuenta que para la producción de las cápsulas, es necesario que la leche no esté coagulada, se estableció que el tiempo óptimo para finalizar la fermentación fueron 10 h, debido a que la disminución del pH en ese momento no es suficiente para la coagulación del medio.

4.5.3. Producción de perlas de alginato de calcio con la adición de almidón

Las perlas producidas con la adición de almidón resultaron similares, en cuanto a su estructura macroscópica, a las perlas producidas solamente con alginato de sodio (figura 18). En relación al recuento de células viables dentro de las cápsulas, las perlas formadas por alginato (0,5%) + almidón (0,5%) mostraron mayores concentraciones celulares ($P < 0,05$) (Doleyres y Lacroix, 2005, Dembezynski y Jankowski, 2002). La incubación de las perlas generó un aumento de la concentración celular. Luego de 9 h, aumentaron en promedio 2,4 Log UFC/g y continuaron teniendo mayores recuentos las cápsulas de alginato + almidón, que las de alginato solo. Luego de 18 h de incubación de las cápsulas se produjo nuevamente un aumento ($P > 0,05$) del recuento celular, siendo las perlas de alginato + almidón de 2 ml las que tenían los mayores recuentos (figura 19). Las cápsulas que presentaron mayor concentración celular fueron las

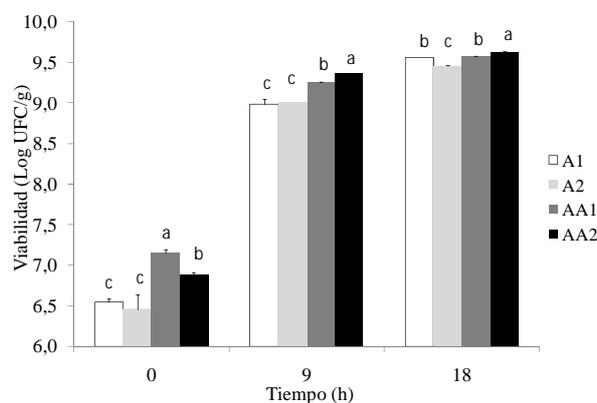
creadas con alginato + almidón y de un tamaño de 2 ml, por lo que este tipo de perlas fue el elegido para continuar con los ensayo de conservación.

Figura 18: Cápsulas de alginato 0,5% + almidón 0,5% en solución de cloruro de calcio.



a: cápsula de alginato 0,5% + almidón 0,5% de 2 ml en solución de cloruro de calcio; b: cápsula de alginato 0,5% + almidón 0,5% de 1 ml en solución de cloruro de calcio.

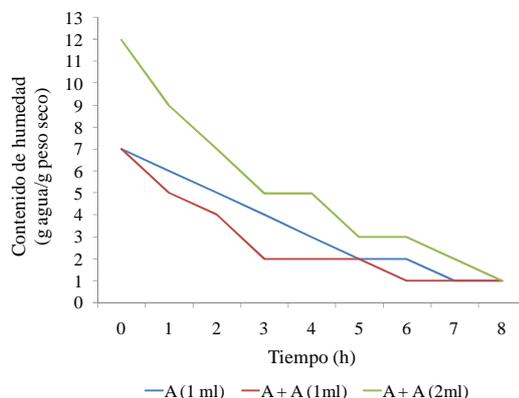
Figura 19: Recuento de células en cápsulas de alginato 1% y alginato 0,5% + almidón 0,5%, a diferentes tiempo de incubación en medio leche suplementado.



A1: cápsulas de alginato 1% de 1 ml; A2: cápsulas de alginato 1% de 2 ml; AA1: cápsulas de alginato 0,5% y almidón 0,5% de 1 ml; AA2: cápsulas de alginato 0,5% y almidón 0,5% de 2 ml.

4.5.4. Determinación del tiempo de secado

Se determinó que el tiempo necesario para el secado de las cápsulas es de 8 h, momento en el cual el peso de las perlas comenzó a ser constante (figura 20).

Figura 20: Determinación del tiempo de secado de las cápsulas.

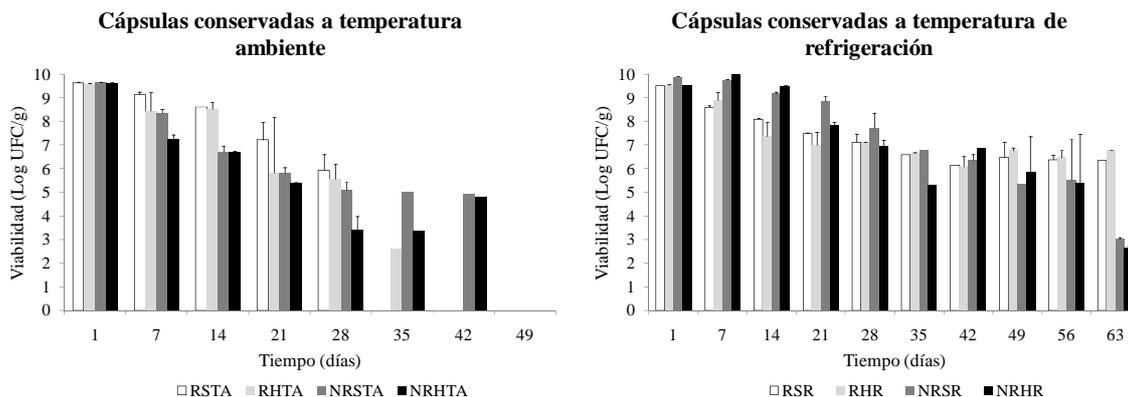
A (1ml): cápsulas de alginato 1% de 1 ml; A + A (1ml): cápsulas de alginato 0,5% + almidón 0,5% de 1 ml; A + A (2ml): cápsulas de alginato 0,5% + almidón 0,5% de 2 ml.

4.5.5. Producción y almacenamiento de perlas de alginato y almidón recubiertas con quitosano en diferentes condiciones de conservación

Durante los 63 días del experimento se encontró que la viabilidad celular dentro de las cápsulas fue disminuyendo a través del tiempo ($P < 0,05$). La temperatura de almacenamiento tuvo una gran influencia en el mantenimiento de las células. También influyó el contenido de humedad de las mismas, presentando mayor concentración bacteriana ($P < 0,05$) aquellas que fueron secadas bajo flujo laminar.

Las perlas que permanecieron bajo condiciones de refrigeración mantuvieron mayor viabilidad que las almacenadas a temperatura ambiente ($P < 0,05$). En estas últimas condiciones, sólo se encontraron células viables hasta el día 42 como máximo. En heladera, se encontraron diferentes concentraciones bacterianas dependiendo de las cápsulas, pero todas mantuvieron células vivas hasta el fin del experimento, y solamente las recubiertas con quitosano, tanto húmedas como secas, conservaron recuentos bacterianos mayores al NMR durante todo el periodo de evaluación. Por otro lado, las cápsulas no recubiertas y mantenidas bajo las mismas condiciones, conservaron el NMR sólo hasta el día 42 (figura 21). A temperatura ambiente las cápsulas mantuvieron el NMR por mucho menos tiempo: las recubiertas y secas hasta el día 21, y las húmedas hasta el día 14, al igual que las no recubiertas (figura 21).

Figura 21: Viabilidad de las células encapsuladas y conservadas en diferentes condiciones.



RSTA: Cápsulas recubiertas, secas y en temperatura ambiente; RHTA: Cápsulas recubiertas, húmedas y en temperatura ambiente; NRSTA: Cápsulas no recubiertas, secas y en temperatura ambiente; NRHTA: Cápsulas no recubiertas, húmedas y en temperatura ambiente; RSR: Cápsulas recubiertas, secas y en temperatura de refrigeración; RHR: Cápsulas recubiertas, húmedas y en temperatura de refrigeración; NRSR: Cápsulas no recubiertas, secas y en temperatura de refrigeración; NRHR: Cápsulas no recubiertas, húmedas y en temperatura de refrigeración.

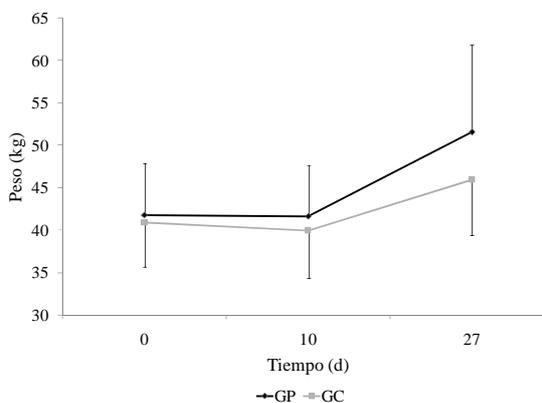
4.6. Desafío experimental frente a *Salmonella dublin* DSPV 595T en terneros lactantes inoculados con lactosa y BAL conservadas por congelación

4.6.1. Peso de los terneros

La figura 22 muestra el peso de los terneros durante el experimento. No se hallaron diferencias entre grupos para ningunos de los días evaluados.

Durante los primeros 10 días del experimento los terneros bajaron de peso, el GC bajó 1 kg y el GP bajó 0,1 kg en promedio. Al día 27, los animales que sobrevivieron presentaron un aumento de peso de 7,3 kg el GP y de 3,8 kg el GC desde el inicio del experimento.

Figura 22: Promedio de peso de los terneros en los días 0, 10 y 27.

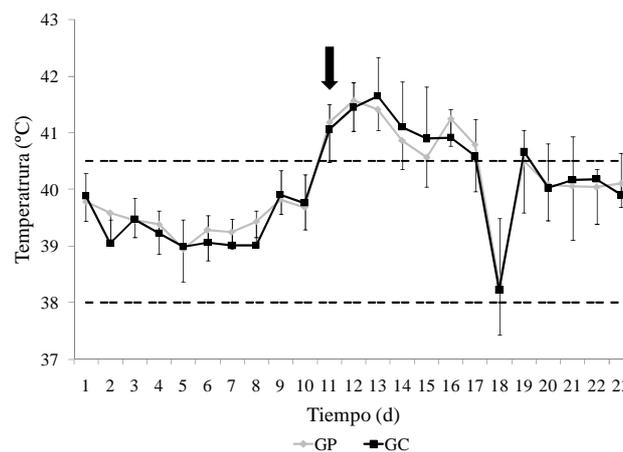


4.6.2. Signos Clínicos

Todos los signos clínicos evaluados mostraron valores normales durante los primeros 10 días del experimento, en la etapa pre infección con *S. dublin* DSPV 595T (datos no mostrados). En el periodo post infección, cada uno de los signos estudiados evidenciaron la infección con diferentes frecuencias de aparición en los animales de cada grupo.

A partir del mismo día de la inoculación con *S. dublin* DSPV 595T, la temperatura comenzó a aumentar evidenciando la infección. El pico máximo de temperatura se observó el día 13 (dos días después de administrado el patógeno) y fue disminuyendo gradualmente hasta llegar a los valores normales de temperatura en el día 20 (figura 23). Ambos grupos de terneros se comportaron de la misma manera.

Figura 23: Promedio de la temperatura rectal diaria del GC y GP



La flecha indica el momento de la inoculación con *Salmonella dublin* DSPV 595T
Las líneas de puntos indican el rango de valores normales de temperatura rectal en bovinos

La consistencia de materia fecal fue uno de los signos clínicos que más fuertemente evidenció la infección. Durante la primera etapa pre infección, la mayoría de los terneros presentaban una consistencia fecal de 2. Luego de la administración de *S. dublin* DSPV 595T la mayor parte de los terneros presentaban una consistencia fecal de 4 (diarrea). No se encontraron diferencias significativas en este parámetro. A su vez, se analizó la severidad de la diarrea a través de la ocurrencia de los diferentes niveles establecidos. Las diarreas se produjeron durante el periodo post infección, por lo que se

analizaron las características de las mismas en este tiempo. Se encontró que hay más animales en el GC con diarreas más severas ($P = 0,049$) que en el GP (figura 24).

En la fase post infección, la mitad de los terneros estuvieron normales y la otra mitad presentaron un nivel 2 (pálidas o hiperhémicas) (figura 24). Esta sintomatología característica se vio durante los primeros 10 días de la infección. A partir del día 10 post-infección, la cantidad de terneros que expresaban síntomas fueron disminuyendo gradualmente y no se encontraron diferencias entre el GC y el GP.

En cuanto a la secreción ocular y a la dificultad en la incorporación, muy pocos animales presentaron niveles anormales que evidenciaron la infección. Tampoco en estos parámetros se encontraron diferencias entre los tratamientos aplicados a los terneros (figura 24).

Durante los primeros 10 días del experimento, no se observó presencia de signología para extremidades frías, morro frío y debilidad en el tren posterior, denotando un estado normal de todos los animales. A partir del día 12 del experimento y durante los 10 días posteriores, se observó presencia de estos signos en alta frecuencia. Luego de este periodo, la frecuencia de aparición de tales signos comenzó a disminuir. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos a lo largo de todo el experimento para estos 3 signos evaluados (figura 25).

El grado de deshidratación fue evaluado a través de la medición de los parámetros de tiempo del pliegue cutáneo y presencia/ausencia de hundimiento de ojos. Ambas características fueron normales durante el periodo pre infección. Luego de la inoculación del patógeno, más de la mitad de los animales presentaron un tiempo de pliegue entre 2 y 4 s, evidenciando deshidratación. La presencia de hundimiento se observó en pocos animales en ambos grupos, pero en mayor cantidad en el GP (figura 26).

Figura 24: Signos clínicos con diferentes niveles de severidad: consistencia de materia fecal, severidad de la diarrea, estado de las mucosas, secreción ocular y dificultad en la incorporación durante el periodo post infección con *S. dublin* DSPV 595T para el GC y el GP.

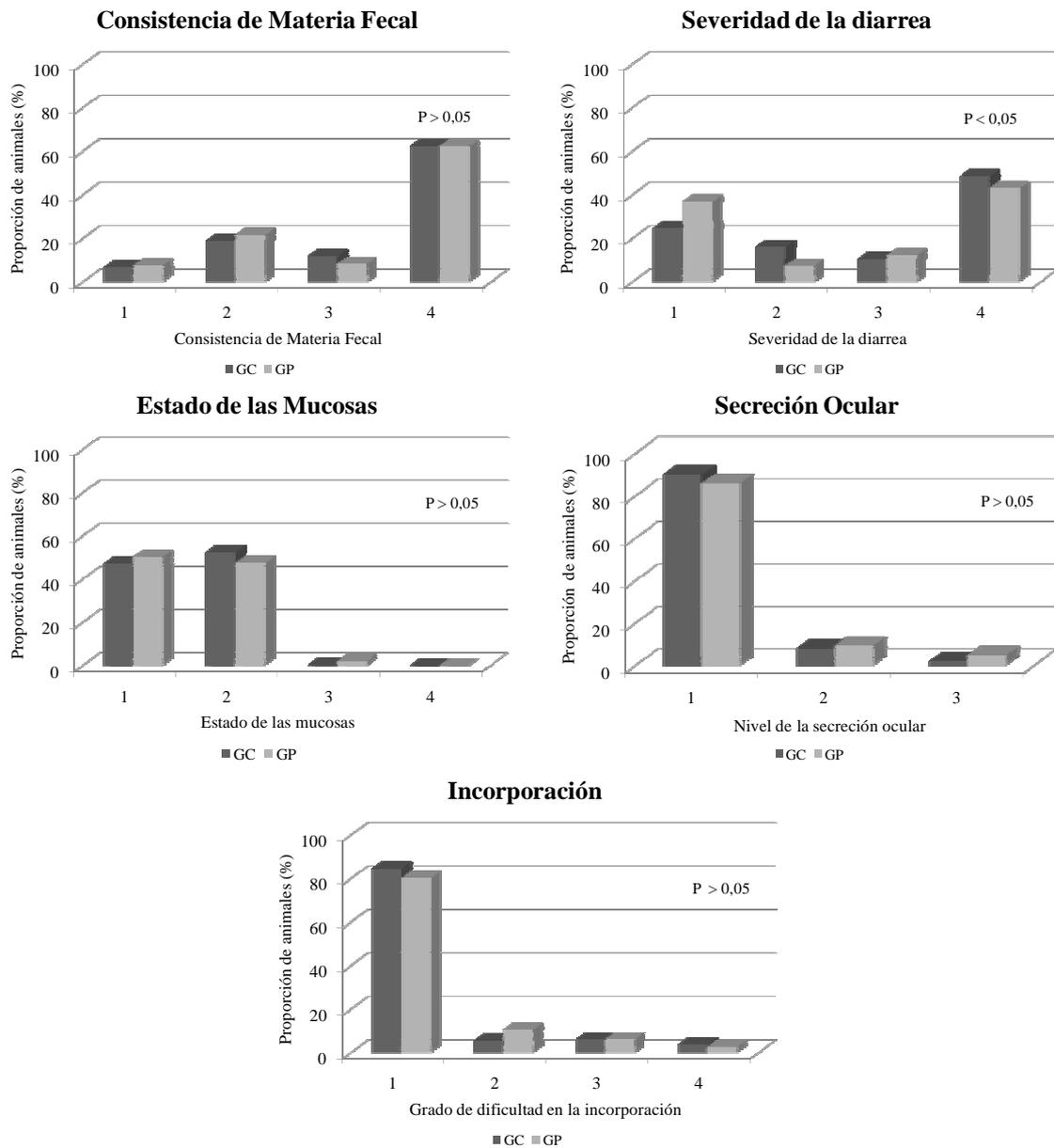


Figura 25: Signos clínicos con presencia-ausencia de signología a partir de la inoculación con el patógeno: extremidades frías, morro frío y debilidad en tren posterior.

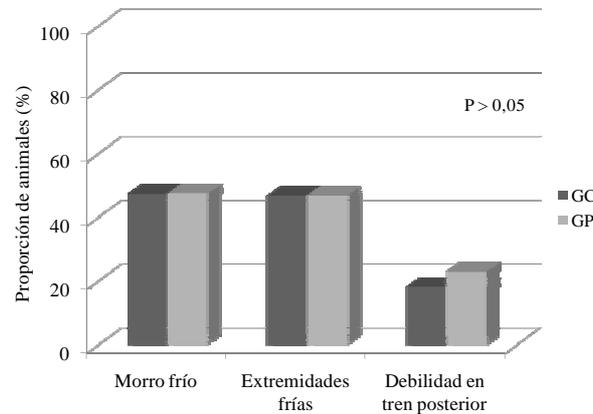
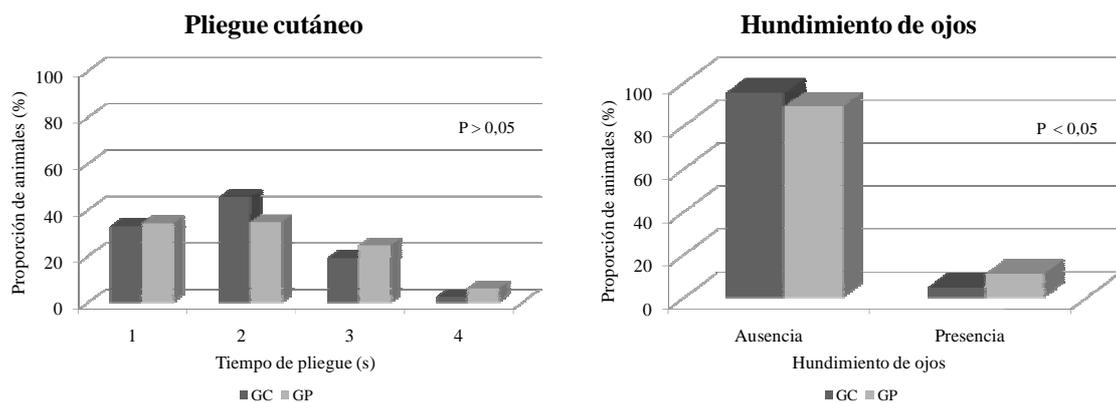
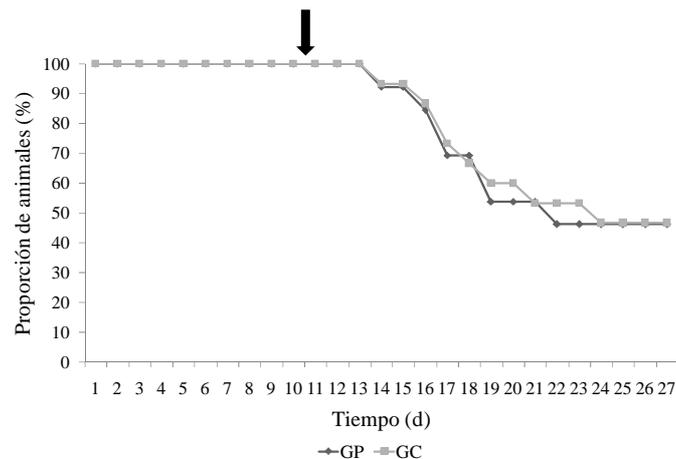


Figura 26: Grado de deshidratación determinado por el tiempo de pliegue pre y post inoculación con *S. dublin* DSPV 595T y el hundimiento de ojos a partir del momento de la administración del patógeno.



4.6.3. Supervivencia de los animales post infección con *S. dublin* DSPV 595T

Los animales comenzaron a morir el día 14 de la experiencia, es decir, 3 días post inoculación del patógeno. Las muertes se dieron “en goteo” (1 ó 2 animales/d/grupo). La mayoría de las muertes se produjeron durante los primeros 10 días post infección. Solamente 3 terneros murieron fuera de este lapso. El día 24 murió el último ternero. En total murieron espontáneamente el 53% de los animales de cada grupo (figura 27). Luego de 72 h sin que se produzca ninguna muerte se dio por finalizado el experimento.

Figura 27: Porcentaje de animales vivos del GC y GP a lo largo del experimento.

La flecha indica el momento de la inoculación con *Salmonella dublin* DSPV 595T

4.6.4. Recuperación del inóculo de BAL, *Lactobacillus* totales y otras poblaciones de la microbiota intestinal

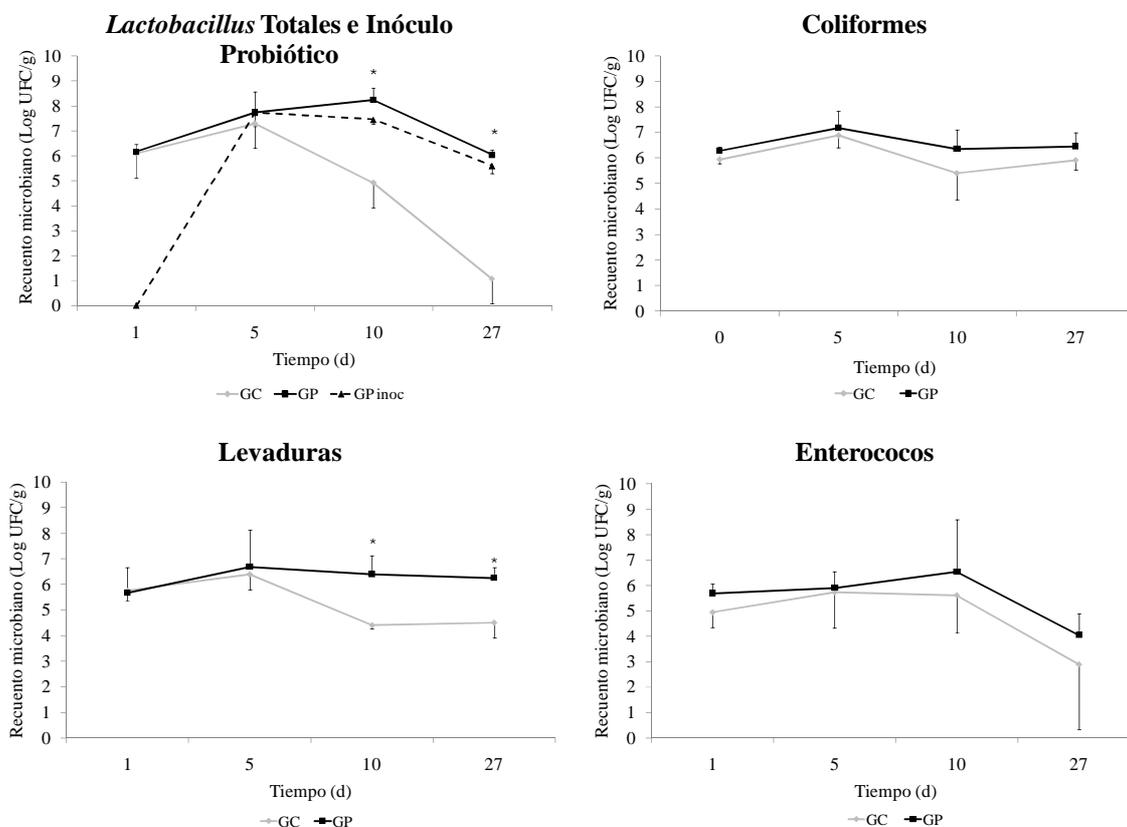
Luego de los primeros 10 días del experimento se encontraron diferencias en el recuento de *Lactobacillus* en materia fecal entre ambos grupos. El GC disminuyó los recuentos, presentando 2,19 Log UFC/g menos con respecto del GP. Al día 27 (16 días post infección con *Salmonella dublin* DSPV 595T) los recuentos de ambos grupos disminuyeron, pero esto fue más pronunciado en el GC que llegó a 1 Log UFC/g, esto representa 5 Log UFC/g menos que el GP. Al día 5 del comienzo de la administración del inóculo probiótico, la mayor parte de los *Lactobacillus* recuperados en materia fecal fueron las cepas suministradas. Esta relación se mantuvo durante el resto del experimento (figura 28).

La población de coliformes se mantuvo constante a lo largo del tiempo, excepto para el día 5 que se vio significativamente aumentada, tanto para el GC como para el GP (figura 28).

La población de enterococos no se vio afectada ni por el tratamiento probiótico ni por la infección inducida (figura 28).

La población de levaduras fue indirectamente afectada por la administración del inóculo presentando diferencias ($P < 0,05$) con respecto al GC al día 10 y 27 mayor a 1,5 Log UFC/ml. El GP mantuvo estable los recuentos a lo largo de la experiencia, en cambio el GC disminuyó significativamente a partir del día 10 (figura 28).

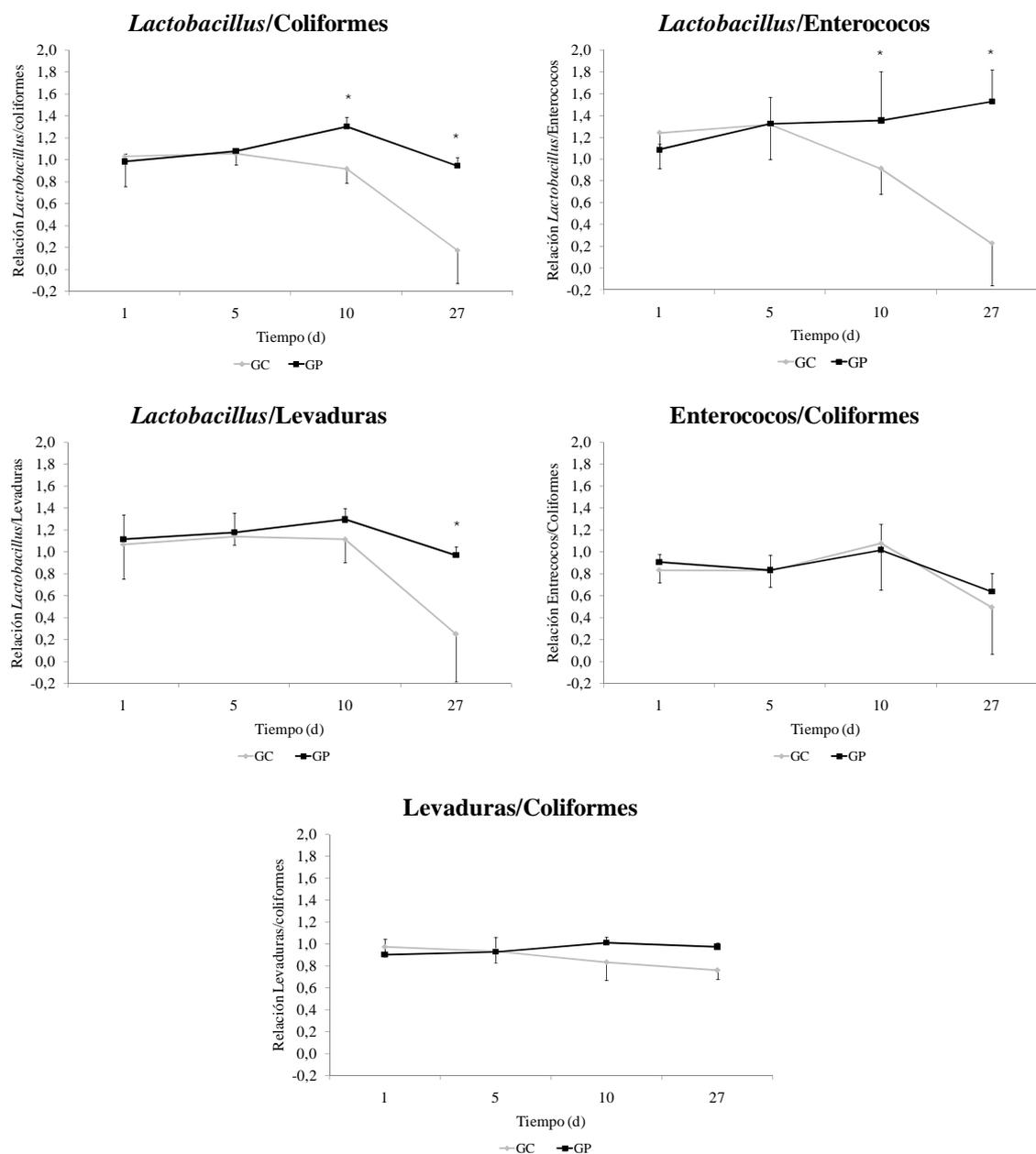
Figura 28: Recuento de las poblaciones de *Lactobacillus*, inóculo probiótico, coliformes, enterococos y levaduras, el día 1, 5, 10 y 27 del experimento en el GC y en el GP.



*Significa que hay diferencias significativas entre GC y GP para el mismo tiempo.
GPinoc representa el recuento de bacterias pertenecientes al inóculo en el GP.

Además de realizarse el estudio de algunas poblaciones de la microbiota, se analizó la relación entre ellas. Se determinó que si bien la única población que se vio afectada por la incorporación del probiótico fue la de levaduras, la relación entre las cantidades de los diferentes microorganismos se alteró por la incorporación del inóculo probiótico. La relación entre *Lactobacillus* y las otras 3 poblaciones evaluadas (coliformes, enterococos y levaduras) fue más alta para el GP a partir del día 10 de la experiencia. En cambio las relaciones enterococos/coliformes y levaduras/coliformes no se modificaron a lo largo de toda la experiencia y no hubo diferencias entre ambos grupos de animales (figura 29).

Figura 29: Relación entre las cantidades de diferentes poblaciones: *Lactobacillus*/Coliformes, *Lactobacillus*/Enterococos, *Lactobacillus*/Levaduras, Enterococos/Coliformes, Levaduras/Coliformes, en el GC y en el GP a lo largo del experimento.



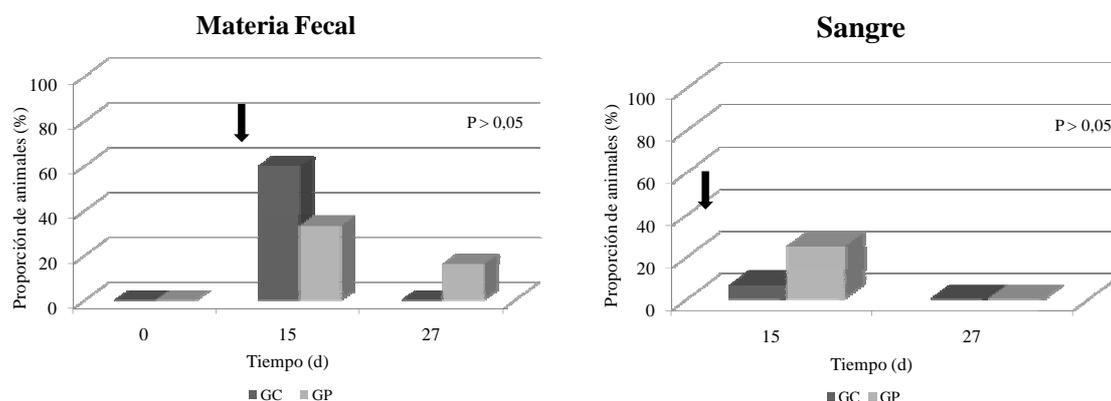
*Significa que hay diferencias significativas entre GC y GP para el mismo tiempo.

4.6.5. Detección de *Salmonella* en materia fecal y sangre

Previamente al inicio del experimento se realizó el análisis de *Salmonella* en materia fecal y se determinó que los animales estaban libres de dicho patógeno. El día 15 del experimento, que corresponde al día 4 post infección, se detectó *Salmonella* en

materia fecal y en sangre, evidenciando una infección sistémica, que se ponía de manifiesto con la mortalidad de los primeros animales desde el día 14 de la experiencia (figura 27). El día 27, no se detectó *Salmonella* en sangre, lo que se corresponde con el final de la fase aguda de la enfermedad. La presencia/ausencia de *Salmonella* en ambos grupos de animales no fue diferente ($P > 0,05$) para ninguno de los momentos evaluados (figura 30).

Figura 30: Presencia de *Salmonella* en materia fecal los días 0, 15 y 27 y en sangre los días 15 y 27 del experimento en el GC y en el GP.

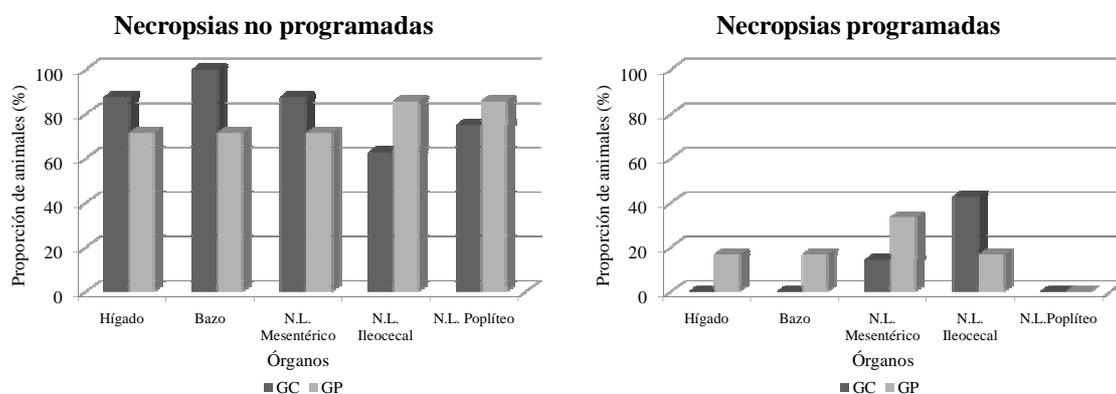


La flecha indica el momento de la inoculación con *Salmonella dublin* DSPV 595T

4.6.6. Evaluación de la translocación bacteriana al medio interno

La figura 21 muestra el porcentaje de terneros que presentaron translocación de *Salmonella* en hígado, bazo, nódulo linfático mesentérico, nódulo linfático ileocecal y nódulo linfático poplíteo. En las necropsias espontáneas, de los animales que murieron a causa de la infección con *Salmonella*, más del 50% de los animales presentaron cultivos positivos del patógeno en los órganos evaluados. En cambio, en los animales que sobrevivieron, a los cuales se les realizaron necropsias programadas al final de la experiencia, se encontró *Salmonella* en pocos órganos o en ninguno, según el caso. En el nódulo linfático poplíteo no se detectó presencia del patógeno (figura 21). No se han encontrado diferencias significativas entre el GC y el GP para la detección de *Salmonella* en cada uno de los órganos.

Figura 31: Detección de *Salmonella* en hígado, bazo, NL mesentérico, NL ileocecal y NL poplíteo en terneros que murieron espontáneamente (necropsias no programadas) y en los animales sacrificados al final del experimento (necropsias programadas) en el GC y en el GP.



4.6.7. Perfil bioquímico sanguíneo y hemograma

La figura 32 muestra los resultados del leucograma. El recuento de leucocitos bajó luego de la infección, pero se mantuvieron dentro de los límites normales. La diferencia entre grupos ($P > 0,05$) se manifestó en el día 10 del tratamiento, antes de la infección con *Salmonella*.

En cuanto al recuento de neutrófilos se observó un efecto de la interacción día*tratamiento. En el GC el recuento de neutrófilos permaneció constante a lo largo de toda la experiencia. En cambio en el GP disminuyó el recuento una vez comenzada la infección. Si bien no se encontró una diferencia entre los recuentos, se observó un comportamiento diferente para ambos grupos (figura 32).

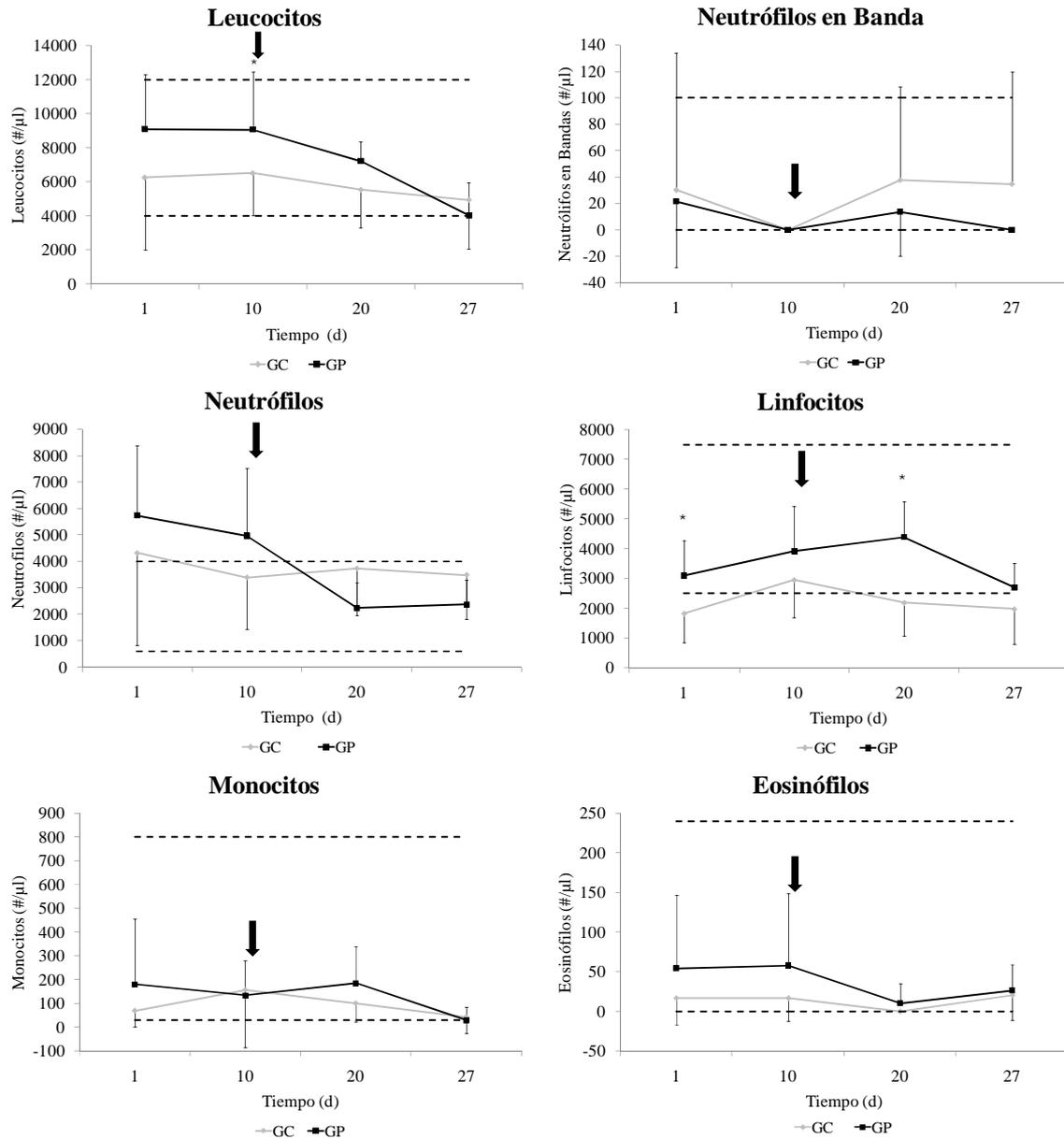
Antes de la infección (día 10) no se presentaron diferencias significativas entre ambos grupos en el recuento de linfocitos pero luego de la infección, día 20 del experimento, los recuento en el GP fueron mayores ($P < 0,05$) (figura 32).

Esta discrepancia entre ambos grupos en cuanto a los recuentos de linfocitos y neutrófilos provoca una diferencia ($P < 0,05$) también cuando se calcula la relación linfocitos/neutrófilos en el día 20 de la experiencia. Esta relación disminuye a través del tiempo en el GC luego de la infección, en cambio en el GP esta relación aumenta en el día 20, y disminuye al finalizar el experimento, provocando una diferencia significativa en el comportamiento de los diferentes grupos (tratamiento*día) (figura 33).

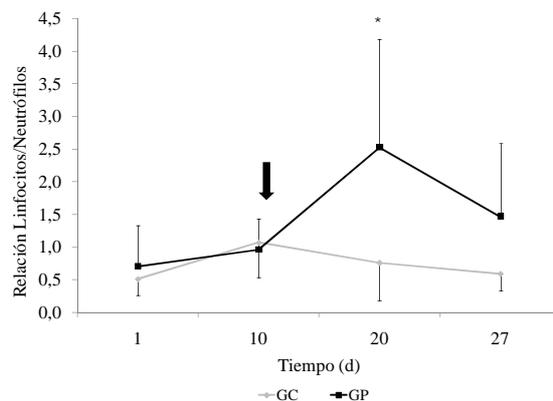
No se observaron diferencias entre tratamientos en los neutrófilos en banda, eosinófilos y monocitos. Tampoco se observaron modificaciones de los recuentos a

través del tiempo (figura 32). No se encontraron basófilos en ninguna de las muestras evaluadas.

Figura 32: Serie Leucocítica. Recuento de leucocitos, neutrófilos en banda, neutrófilos, linfocitos, monocitos y eosinófilos en el GC y el GP a lo largo del experimento.



La flecha indica el momento de la inoculación con *Salmonella dublin* DSPV 595T
 *Significa que hay diferencias significativas entre el GC y el GP para el mismo tiempo.
 Las líneas de puntos indican el rango de valores normales para cada uno de los parámetros para bovinos (Meyer y Harvey, 2007)

Figura 33: Relación linfocitos/neutrófilos en el GC y el GP a lo largo del experimento.

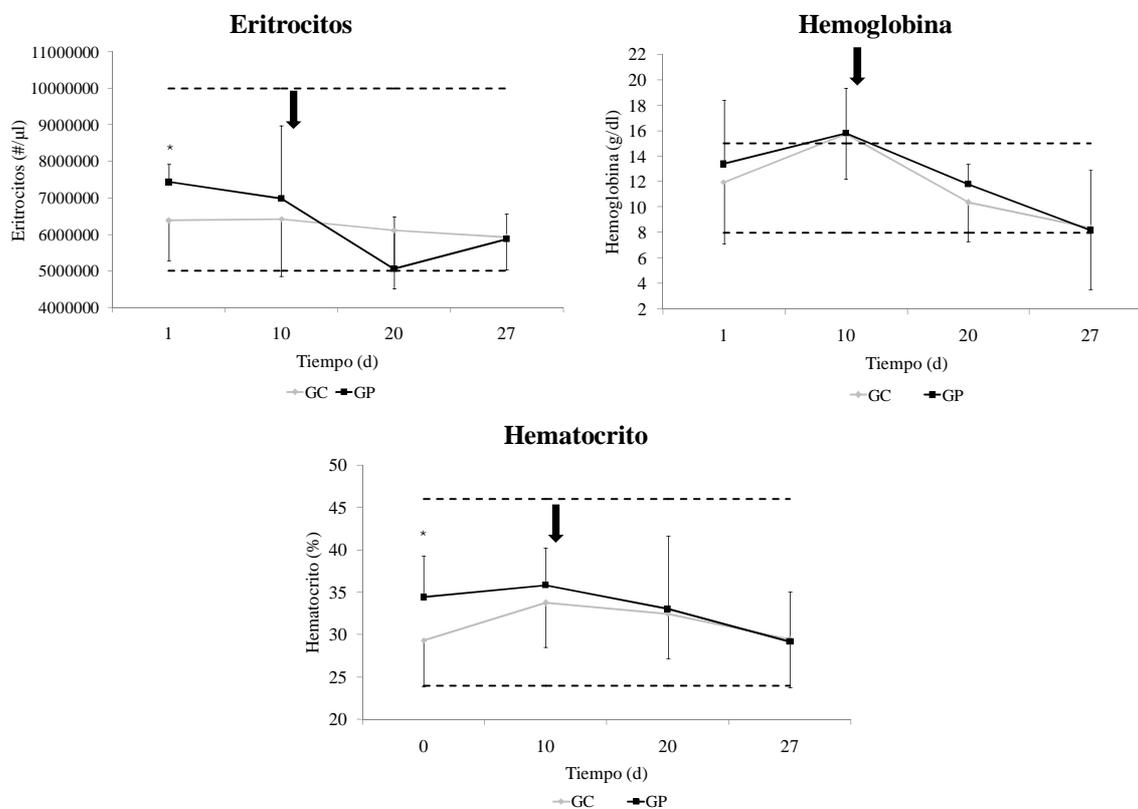
La flecha indica el momento de la inoculación con *Salmonella dublin* DSPV 595T
 *Significa que hay diferencias significativas entre el GC y el GP para el mismo tiempo.

La figura 34 muestra los resultados de la evaluación de la serie eritrocítica. El hematocrito presentó diferencias ($P < 0,05$) entre grupos al inicio del experimento que desaparecieron al día 10. Durante la fase infecciosa no hubo diferencias entre tratamientos. El hematocrito disminuyó en ambos grupos siendo diferentes los resultados del día 27 con respecto al día 10.

Para la hemoglobina no hubo diferencias a lo largo de todo el experimento entre grupos. Durante la primera fase de la experiencia, la hemoglobina aumentó ($P < 0,05$) y a partir de la infección, la cantidad de hemoglobina fue disminuyendo gradualmente ($P < 0,05$) (figura 34).

Al igual que el hematocrito, el recuento de eritrocitos fue diferente para ambos grupos al inicio del experimento, pero en el día 10 ya no se presentaron diferencias y continuaron igual por el resto del tiempo. El recuento de eritrocitos del GC permaneció sin modificaciones a lo largo del tiempo, en cambio para el GP se vio disminuido ($P < 0,05$) en el periodo post infección (día 20 y 27) con respecto al recuento al inicio del experimento (figura 34).

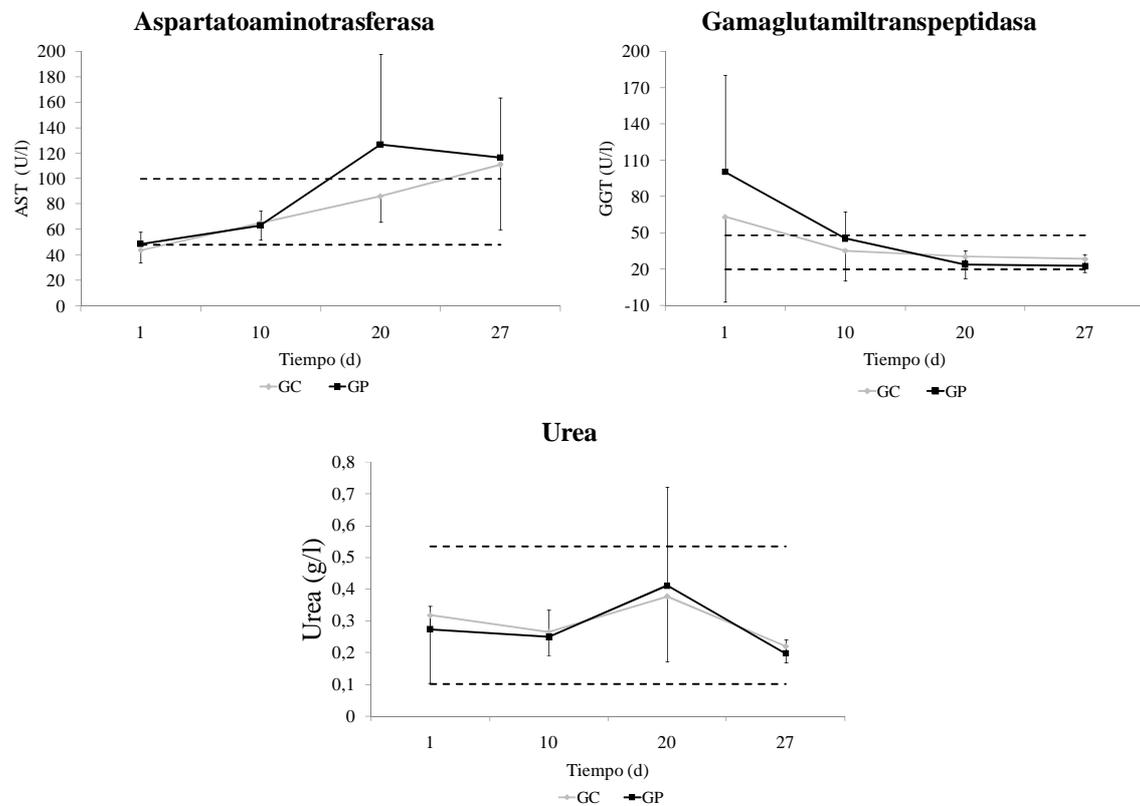
Figura 34: Serie eritrocítica. Determinación de eritrocitos, hemoglobina y hematocrito en el GC y el GP a lo largo del experimento.



La flecha indica el momento de la inoculación con *Salmonella dublin* DSPV 595T
 *Significa que hay diferencias significativas entre el GC y GP para el mismo tiempo.
 Las líneas de puntos indican el rango de valores normales para cada uno de los parámetros para bovinos (Meyer y Harvey, 2007)

Durante los primeros días del experimento los valores de AST fueron menores ($P < 0,05$) a las concentraciones de la enzima los días 20 y 27 que corresponden al momento post infección. En cambio, la enzima GGT al comienzo del experimento (día 1) estaba en concentraciones que superaban los valores normales. En los siguientes días los valores estuvieron dentro del rango normal. La urea presentó un aumento en la concentración ($P < 0,05$) en el día 20, que correspondió al momento crítico de la enfermedad. En el día 27 volvió a disminuir (figura 35).

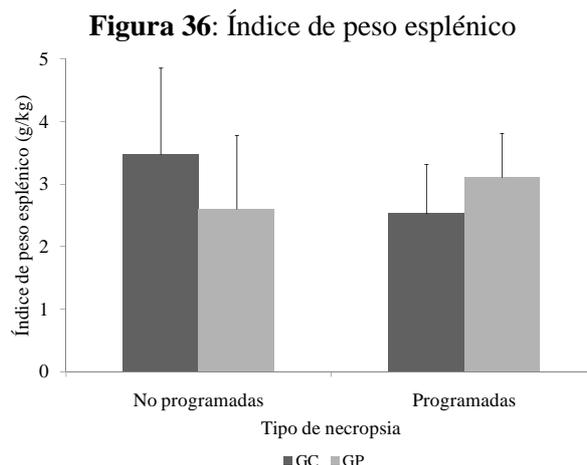
Figura 35: Concentración de aspartatoaminotransferasa, glutamiltranspeptidasa y urea los días 1, 10, 20 y 27 del experimento para el GC y el GP.



Las líneas de puntos indican el rango de valores normales para cada uno de los parámetros para bovinos (Meyer y Harvey, 2007)

4.6.8. Índice de peso esplénico

El índice de peso esplénico se evaluó separadamente para las necropsias espontáneas y programadas. En ninguno de los tipos de necropsias se encontraron diferencias significativas entre el GC y el GP (figura 36).



4.6.9. Lesiones macroscópicas

Durante la necropsia, en ambos grupos experimentales, en general se observaron en los órganos estudiados las mismas lesiones macroscópicas: esplenomegalia, hepatomegalia, ictericia hepática y nódulos miliares blancos visibles subcapsularmente o ubicados en el parénquima en la superficie de corte y distribuidos aleatoriamente en hígado y bazo. Las mucosas intestinales se observaron desde congestivas hasta hemorrágicas. Sin embargo, en las necropsias espontáneas se observaron diferencias ($P < 0,05$) entre grupos en el bazo; la mayoría de los terneros del GP no presentaron lesiones, en cambio un alto porcentaje de terneros del GC sufrió lesiones de nivel 2. El resto de los órganos diana no presentaron diferencias entre grupos (figura 37).

Los órganos no diana más afectados fueron pulmones y duodeno. El resto de los órganos no diana, no presentaron lesiones de nivel 3 ni 4, a diferencia de los diana en donde todos mostraron lesiones graves. A su vez se encontró que los pulmones del GC presentaban lesiones más graves ($P < 0,05$) que el GP (figura 38).

En las necropsias programadas la gravedad de las lesiones eran menores que en las necropsias realizadas a los animales que presentaron muertes espontáneas. Los órganos diana no presentaron diferencias entre grupos y solamente la válvula ileocecal y el hígado mostraron lesiones de nivel 3 y 4 (figura 39). Para los órganos no diana solamente se encontraron diferencias en las lesiones producidas en duodeno, las cuales fueron más intensas en el GP (figura 40).

Figura 37: Lesiones macroscópicas en necropsias no programadas de órganos diana: yeyuno, íleon, válvula ileocecal, hígado, bazo, NL ileocecal y NL mesentérico del GC y el GP.

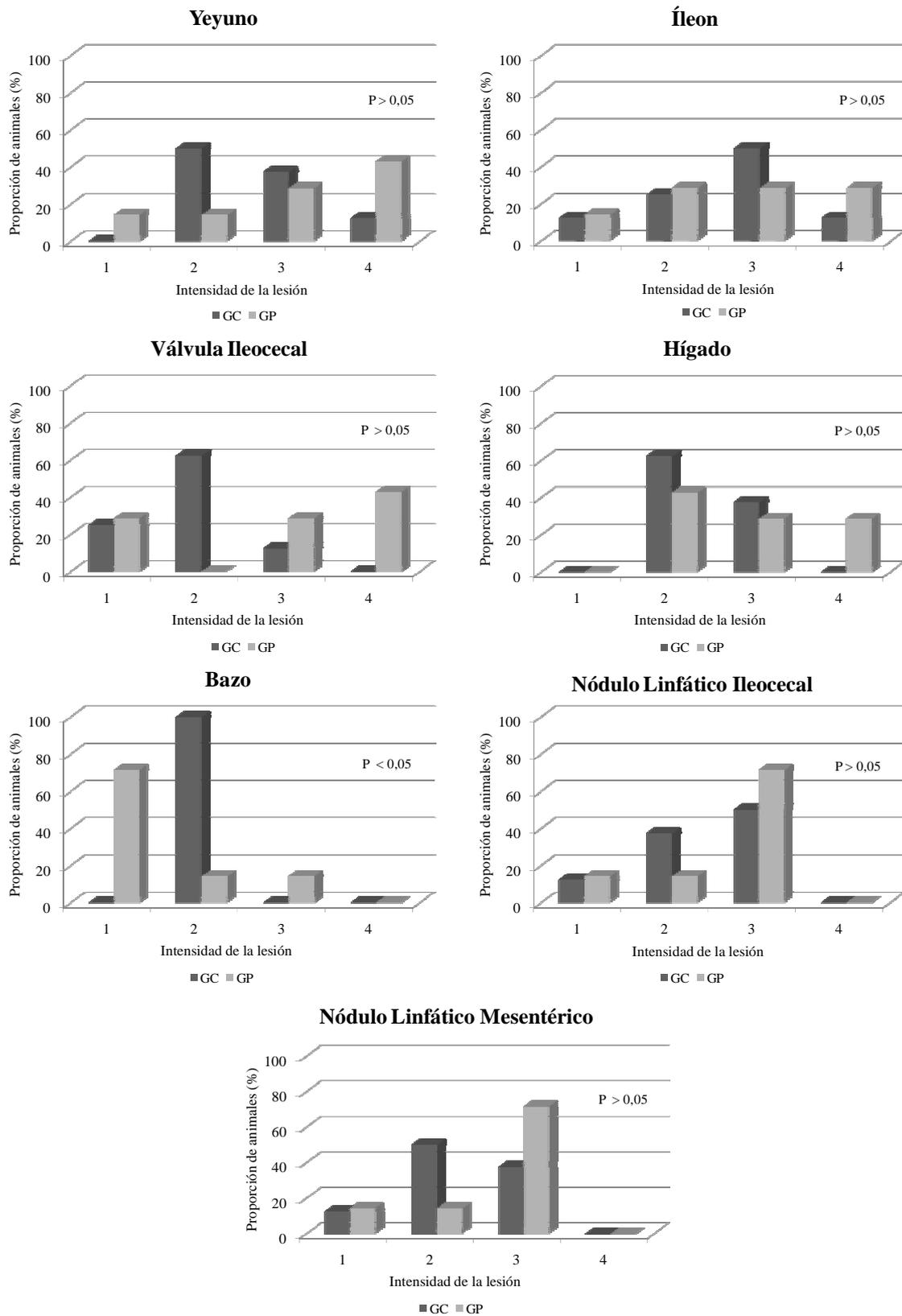


Figura 38: Lesiones macroscópicas en necropsias no programadas de órganos no diana: articulaciones, paladar duro y blando, faringe y esófago, abomaso, duodeno, pulmones y NL poplíteo del GC y el GP.

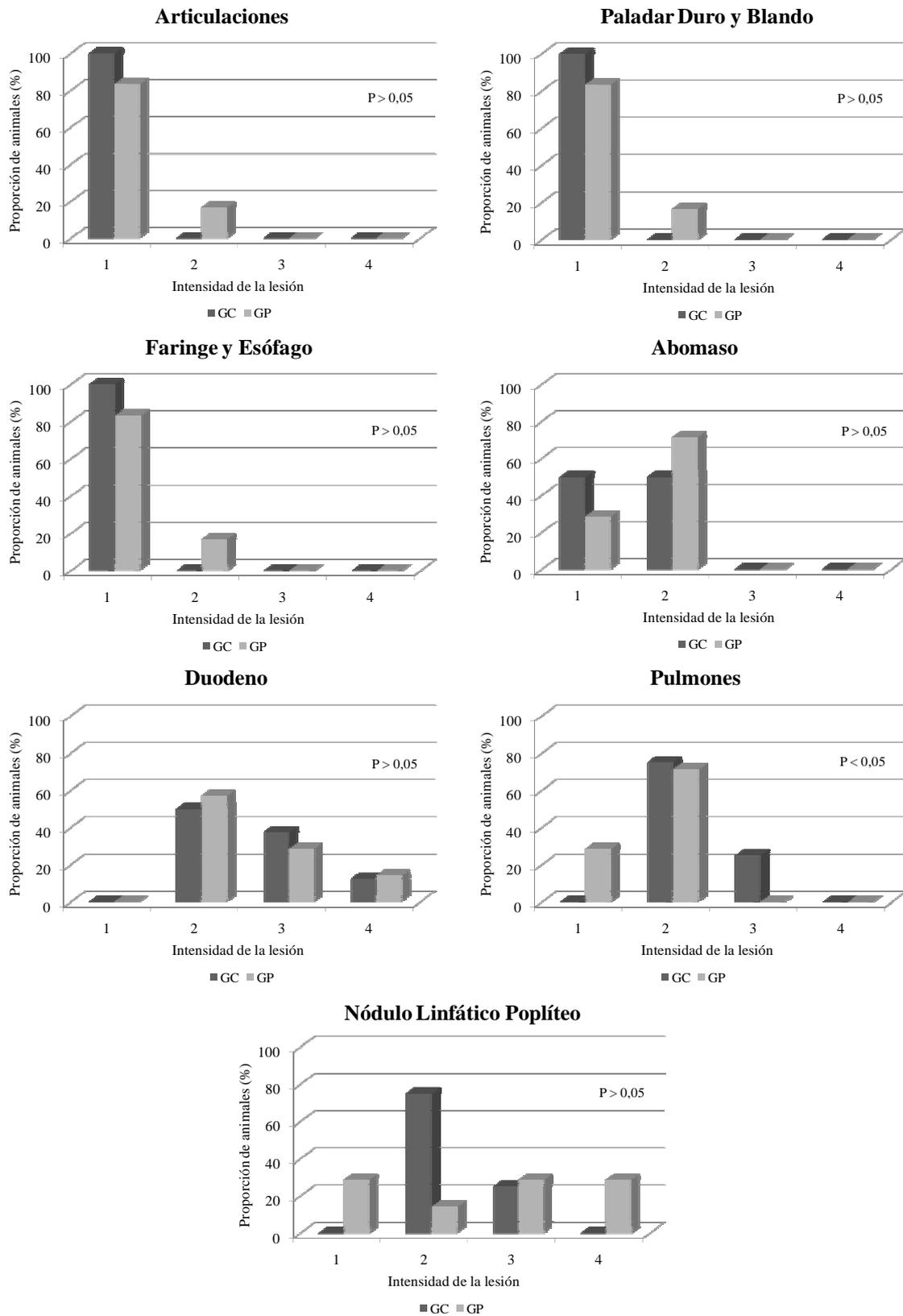


Figura 39: Lesiones macroscópicas en necropsias programadas de órganos diana: yeyuno, íleon, válvula ileocecal, hígado, bazo, NL ileocecal y NL mesentérico del GC y el GP.

