



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

**MAESTRIA EN CIENCIAS VETERINARIAS
MENCION: PROTECCIÓN DE LOS ALIMENTOS**

**UTILIZACIÓN DE MICROORGANISMOS
PROBIÓTICOS, SELECCIONADOS A PARTIR DE LA
MICROBIOTA INDÍGENA DE BOVINOS LECHEROS, EN
ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

Vet. Laureano Sebastián FRIZZO

**Tesis para optar al grado de
MASTER SCIENTIAE EN CIENCIAS VETERINARIAS**

Esperanza, noviembre de 2007



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

**MAESTRIA EN CIENCIAS VETERINARIAS
MENCION: PROTECCIÓN DE LOS ALIMENTOS**

**UTILIZACIÓN DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS,
SELECCIONADOS A PARTIR DE LA MICROBIOTA INDÍGENA
DE BOVINOS LECHEROS, EN ANIMALES DE
EXPERIMENTACIÓN**

AUTOR: Vet. Laureano Sebastián FRIZZO

DIRECTOR: Dr. Marcelo Raúl ROSMINI

CODIRECTOR: M. Sc. Med. Vet. Gabriel Jorge SEQUEIRA

Miembros del Jurado:

M. Sc. Vet. Diego Carlos DIAZ DAVID

Dr. Luis CALVINHO

Dra. Gabriela del Valle PERDIGÓN

**Tesis para optar al grado de
MASTER SCIENTIAE EN CIENCIAS VETERINARIAS**

Esperanza, noviembre de 2007

A aquellos incansables luchadores que siempre pusieron todo su esfuerzo en mi formación profesional y académica brindándome la confianza necesaria y su contagiosa perseverancia para fijar y avanzar hacia la meta; mis padres Domingo y Gloria.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Marcelo ROSMINI, por su dedicación, preocupación y buenos consejos; pero sobre todo por orientarme en el trabajo ofreciendo gentilmente sus conocimientos.

A los Profesores Gabriel SEQUEIRA, Enrique MARTI y Rodolfo DALLA SANTINA, por creer en mi y poner a disposición todo lo que a su alcance tenían para que el trabajo se lleve a cabo.

Al Departamento de Salud Pública Veterinaria, por fomentar la formación de posgrado, por todo el apoyo incondicional que me brindara para la realización de este trabajo de tesis y por costear buena parte de la matrícula de la Maestría.

Al Med. Vet. Carlos PERALTA, por su colaboración desinteresada en el estudio histopatológico.

Al Dr. Rafael LAJMANOVICH, por darme una mano en el estudio estadístico.

Al Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio, por ceder gentilmente sus instalaciones, equipos y utensilios y por el apoyo brindado en el manejo de los animales.

A la Universidad Nacional del Litoral, por premiarme con una Beca de Maestría para Docentes de la UNL que me permitió vivir y costear parcialmente la matrícula de la Maestría.

A Ezequiel BERTOZZI, Virginia ZBRUN, Lorena SOTO y Lucía ZEQUÍN, el grupo de apoyo que trabajó codo a codo con minuciosidad y mucha paciencia.

Al Dr. Marcelo SIGNORINI, por mostrar el camino con humilde genialidad.

INDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. La utilización de los antibióticos y su resistencia en la producción animal	2
I.2. Los probióticos como herramienta alternativa a los antibióticos	4
I.3. Objetivos establecidos	7
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	8
II.1. La microbiota intestinal	9
II.2. Probióticos: definición y objetivo de su utilización	14
II.3. Mecanismos de acción de la microbiota probiótica	18
II.4. Evaluación <i>in vitro</i> de las capacidades probióticas microbianas orientadas al diseño de inóculos probióticos multiespecie	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS	24
III.1. Estudio " <i>in vitro</i> " de las bacterias ácido lácticas (BAL) de origen bovino	25
III.1.1. Cepas lácticas utilizadas	25
III.1.2. Cuantificación del crecimiento de las cepas	26
III.1.3. Crecimiento en bilis	26
III.1.4. Tolerancia a jugos gástricos simulados (JGS)	26
III.1.5. Prueba de agregación	27
III.1.6. Prueba de coagregación	27
III.1.7. Hidrofobicidad de la superficie celular	28

III.1.8. Detección de la actividad inhibitoria	28
III.1.9. Análisis estadístico	30
III.2. Propiedades “ <i>in vivo</i> ” de BAL de origen bovino. Colonización microbiana, evolución de la microflora, comportamiento del peso y la conversión alimenticia en ratones (<i>Mus musculus</i>)	30
III.2.1. Animales de laboratorio	30
III.2.2. Microorganismos	30
III.2.3. Selección de mutantes de <i>Lactobacillus casei</i> DSPV 318T resistentes a rifampicina	31
III.2.4. Diseño del experimento	31
III.2.5. Preparación y administración del inóculo	32
III.2.6. Análisis microbiológico de las muestras fecales	32
III.2.7. Recuperación de <i>L. casei</i> DSPV 318T y de bacterias lácticas intestinales	34
III.2.8. Análisis estadístico	34
III.3. Propiedades “ <i>in vivo</i> ” de BAL de origen bovino. Desafío experimental frente a <i>Salmonella dublin</i> DSPV595T en ratones (<i>Mus musculus</i>)	35
III.3.1. Animales de laboratorio	35
III.3.2. Microorganismos	35
III.3.3. Preparación del inóculo	36
III.3.4. Tratamiento con el inóculo de BAL	36
III.3.5. Inoculación del patógeno	36

III.3.6. Diseño del experimento	37
III.3.7. Necropsias	38
III.3.8. Elaboración y observación de preparados histológicos	39
III.3.9. Análisis estadístico	39
IV. RESULTADOS	40
IV.1. Estudio “ <i>in vitro</i> ” de las BAL de origen bovino	41
IV.1.1. Cuantificación del crecimiento	41
IV.1.2. Crecimiento en bilis	41
IV.1.3. Tolerancia a jugos gástricos simulados (JGS)	41
IV.1.4. Hidrofobicidad	41
IV.1.5. Prueba de agregación y coagregación	44
IV.1.6. Sustancias antimicrobianas	45
IV.2. Propiedades “ <i>in vivo</i> ” de BAL de origen bovino. Colonización microbiana, evolución de la microflora, comportamiento del peso y la conversión alimenticia en ratones (<i>Mus musculus</i>)	45
IV.2.1. Performance de crecimiento	45
IV.2.2. Morbilidad y mortalidad	47
IV.2.3. Análisis microbiológico de las muestras fecales	47
IV.2.4. Recuperación de microorganismos	49
IV.3. Propiedades “ <i>in vivo</i> ” de BAL de origen bovino. Desafío experimental frente a <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T en ratones (<i>Mus musculus</i>)	51
IV.3.1. Efecto del tratamiento con bacterias ácido lácticas sobre la	

supervivencia de los ratones	51
IV.3.2. Efecto del tratamiento con bacterias ácido lácticas sobre la morbilidad de los ratones	52
IV.3.3. Efecto de <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T sobre el consumo de alimentos	53
IV.3.4. Efecto de <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T sobre el aumento del peso de los ratones	54
IV.3.5. Verificación de las lesiones ocasionadas por <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T sobre los tejidos	55
IV.3.6. Necropsias programadas (inicio de experimento)	58
IV.3.7. Necropsias no programadas (muerte espontánea post-inoculación con <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T)	58
IV.3.8. Necropsias programadas (final de experimento)	63
V. DISCUSIÓN	64
V.1. Estudio “ <i>in vitro</i> ” de las BAL de origen bovino	65
V.1.1. Cuantificación del crecimiento	65
V.1.2. Tolerancia a jugos gástricos simulados (JGS) y crecimiento en bilis ..	65
V.1.3. Pruebas de hidrofobicidad, agregación y coagregación	66
V.1.4. Sustancias antimicrobianas	67
V.2. Propiedades “ <i>in vivo</i> ” de BAL de origen bovino	68
V.2.1. Comportamiento del peso y la conversión alimenticia en ratones (<i>Mus musculus</i>), colonización microbiana y evolución de la microbiota .	68

V.2.2. Desafío experimental frente a <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T en ratones (<i>Mus musculus</i>)	77
V.3. Necropsias	81
VI. CONCLUSIONES	83
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Bacterias ácido lácticas indígenas utilizadas en el estudio	25
Tabla 2. Medios de cultivos y métodos para microorganismos intestinales	33
Tabla 3. Indicadores micromorfológicos de la enfermedad	38
Tabla 4. Detalle de las necropsias programadas efectuadas al inicio del experimento	38
Tabla 5. Ensayos de agregación, coagregación, hidrofobicidad, tolerancia a jugos gástricos simulados y de crecimiento en bilis bovina de las bacterias ácido lácticas indígenas estudiadas	43
Tabla 6. Detección de actividad inhibitoria e interacción entre bacterias ácido lácticas indígenas	44
Tabla 7. Performance de crecimiento en los ratones del grupo control (G-C) y del grupo tratado (G-BAL)	46
Tabla 8. Distribución por sexo de lesiones micromorfológicas patognomónicas de salmonelosis en los animales utilizados en el experimento	59

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Curvas estándar de calibración utilizadas para cuantificar bacterias ácido lácticas indígenas	42
Figura 2. Evolución de los pesos en los ratones del grupo control (G-C) y del grupo tratado (G-BAL) a lo largo del período de estudio	47
Figura 3. Recuentos de los componentes de la microbiota fecal en ambos grupos experimentales (G-C y G-BAL). El inóculo fue administrado diariamente entre los días 1-3 y en días alternos entre los días 5-11 en una cantidad de 10^9 UFC por animal	48
Figura 4. Flora láctica de los ratones tratados y no tratados con el inóculo de bacterias ácido lácticas y permanencia de <i>L. casei</i> DSPV 318T en materia fecal	50
Figura 5. Supervivencia de los ratones convencionales inoculados (G-BAL) y no inoculados (G-C) con bacterias ácido lácticas e infectados oralmente con <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T	52
Figura 6. Morbilidad acumulada y consumo de alimento diario promedio estimado de los ratones convencionales inoculados (G-BAL) y no inoculados (G-C) con las bacterias ácido lácticas (BAL) e infectados oralmente con <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T	54
Figura 7. Variación del peso vivo de los ratones convencionales, inoculados (G-BAL) y no inoculados (G-C) con las bacterias ácido lácticas (BAL) e infectados oralmente con <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T,	

durante los primeros 7 días posteriores a la inoculación del patógeno .	55
Figura 8. Secciones histopatológicas de hígado (a y b) y bazo (c) de los ratones muertos de salmonelosis. Tinción: hematoxilina-eosina. Secciones de hígado (d) y bazo (e) sin lesión aparente al final de experimento	56
Figura 9. Colangiohepatitis con infiltración periportal de mononucleares y estasis biliar intracanalicular (Hígado; H-E x 40)	60
Figura 10. Formación inicial de un nódulo paratifoideo con reclutamiento de PMN y macrófagos con escasa necrosis de coagulación (Hígado; H-E x 400)	60
Figura 11. Nódulo paratifoideo totalmente conformado con amplia necrosis de coagulación (Hígado; H-E x 400)	61
Figura 12. Nódulo paratifoideo inicial en la pulpa roja (Bazo; H-E x 400)	61
Figura 13. Nódulo paratifoideo totalmente conformado con un entorno de pulpa roja con esplenitis hemorrágica (Bazo; H-E x 400)	62
Figura 14. Enteritis con atrofia de las vellosidades, dilatación del quilífero central, infiltración mononuclear de la lámina propia e hiperplasia de la placa de Peyer (Yeyuno; H-E x 40)	62
Figura 15. Enteritis fibrinonecrótica con ausencia de vellosidades y capa de fibrina con restos celulares (Yeyuno; H-E x 400)	63

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis se difundieron parcialmente a través de las siguientes publicaciones:

FRIZZO, L.S.; PERALTA, C.; ZBRUN, V.; BERTOZZI, E.; SOTO, L.; MARTI, E.; DALLA SANTINA, R.; SEQUEIRA, G. & ROSMINI, M.R. (2005). Respuesta de ratones inoculados con bacterias lácticas de origen bovino a un desafío con *Salmonella dublin*. Revista FAVE-Ciencias Veterinarias 4: 41-53.

FRIZZO, L.S.; SOTO, L.P.; BERTOZZI, E.; SEQUEIRA, G.; MARTÍ, L.E. & ROSMINI, M.R. (2006). Evaluación *in vitro* de las capacidades probióticas microbianas orientadas al diseño de inóculos probióticos multiespecie para ser utilizados en la crianza de terneros. Revista FAVE-Ciencias Veterinarias 5: 61-72.

FRIZZO, L.S.; ZBRUN, M.V.; BERTOZZI, E.; SOTO, L.P.; SEQUEIRA, G.; MARTÍ E.; LAJMANOVICH, R. & ROSMINI, M.R. (2007). *Lactobacillus casei* DSPV 318T capacity to colonize and remain in mouse gastrointestinal tract. J. Anim. Vet. Adv. 6: 1158-1166.

FRIZZO, L.S.; ZBRUN, M.V.; BERTOZZI, E.; SOTO, L.P.; SEQUEIRA, G.; LAJMANOVICH, R.; PERDIGÓN, G. & ROSMINI, M.R. (2007). Protective effect of an inoculum of lactic acid bacteria from bovine origin against *Salmonella* serotype Dublin in the intestinal tract of mice. J. Vet. Sci. (enviado).

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue estudiar las propiedades probióticas de aislamientos bacterianos de origen bovino en condiciones de laboratorio “*in vitro*” y con animales de experimentación (*Mus musculus*) “*in vivo*” para evaluar su posterior incorporación como suplemento dietario a terneros lactantes. Además, se analizó la respuesta fisiológica de los animales inoculados con un grupo seleccionado de microorganismos y se determinó el grado de protección generado por el inóculo probiótico ante un desafío experimental con *Salmonella dublin* DSPV595T.

A través de los estudios *in vitro* se evaluó la capacidad de agregación, coagregación, hidrofobicidad, tolerancia a jugos gástricos simulados y de crecimiento en bilis bovina de las bacterias ácido lácticas indígenas estudiadas. Se realizaron dos ensayos con ratones en donde se utilizó un inóculo probiótico seleccionado constituido por *Lactobacillus casei* DSPV 318T, *Lactobacillus salivarius* DSPV 315T y *Pediococcus acidilactici* DSPV 006T. En el primero de ellos se determinó la capacidad de *Lactobacillus casei* DSPV 318T para colonizar y permanecer en el tracto gastrointestinal y en el segundo se evaluó la capacidad del inóculo para antagonizar los efectos de *Salmonella* serotipo Dublin DSPV 595T.

La administración del inóculo no produjo cambios en la actividad o apariencia de los ratones siendo esto un indicador del estado general de salud y de la ausencia de efectos adversos. El inóculo utilizado no interfirió en el normal funcionamiento de la microbiota y resultó inocuo para el huésped. El tratamiento con bacterias ácido lácticas protegió a los ratones desafiados con *Salmonella dublin* DSPV 595T.

Todo esto demuestra que las cepas seleccionadas son buenos exponentes y podrían ser incorporadas para su estudio a la dieta de los terneros como un inóculo probiótico multiespecie.

Palabras clave: Bacterias ácido lácticas - propiedades probióticas - probióticos multiespecies - protección de ratones - *Salmonella dublin*

SUMMARY

Use of probiotic microorganisms, selected from indigenous microbiota of dairy calves, in lab animals. The aim of this work was to study the probiotic properties of bovine bacterial strains under laboratory conditions “*in vitro*” and with lab animals (*Mus musculus*) “*in vivo*” to be considered for administration during the feeding in the breed stage of calves. Also, the physiologic response of the animals inoculated with a selected group of microorganisms was analysed and the protective effect generated by the probiotic inoculum against *Salmonella dublin* DSPV595T was determined.

The aggregation capacity, co-aggregation, hidrofobicity, tolerance to simulated gastric juices and growth in bovine bile of the indigenous lactic acid bacteria was evaluated. Two experiments with a probiotic inoculum constituted by *Lactobacillus casei* DSPV 318T, *Lactobacillus salivarius* DSPV 315T and *Pediococcus acidilactici* DSPV 006T were carried out. In the first one, the capacity of *Lactobacillus casei* DSPV 318T to colonize and to remain in the gastrointestinal tract was determined and in the second, the capacity of the inoculum for antagonize the effects of *Salmonella* serotype Dublin DSPV 595T was evaluated.

The inoculum administration didn't produce any change in the activity or appearance of the mice being this an indicator of health general state and the absence of adverse effects. The inoculum didn't interfere in the normal function of the microbiota and it was innocuous for the host. The treatment with lactic acid bacteria protected the mice challenged with *Salmonella dublin* DSPV 595T.

This results demonstrate that the strains are good exponents and could be incorporated for their study into the diet of the calves as a multispecies probiotic inoculum.

Key words: Lactic acid bacteria - probiotic properties - multispecies probiotics - mice protection - *Salmonella dublin*

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. La utilización de los antibióticos y su resistencia en la producción animal

Desde su descubrimiento, los antibióticos han representado una importante herramienta para el tratamiento de las enfermedades infecciosas en el hombre y los animales. También han tenido aplicación como promotores del crecimiento y para prevenir las enfermedades durante la crianza de animales domésticos. El uso continuo de estos productos, a veces en forma indiscriminada, produce la aparición de cepas bacterianas resistentes, proceso que se ve potenciado por la capacidad de ciertas bacterias de transferir dicha resistencia a otras, incluso de diferente género y especie (Teuber *et al.*, 1996; Saarela *et al.*, 2000).

La resistencia entre los patógenos animales reduce la efectividad de algunas drogas. Este efecto puede afectar potencialmente la salud pública si la utilización de estos medicamentos se incrementa en los animales de abasto para compensar la baja en la efectividad o si las drogas alternativas, que son cruciales para la salud humana, se usan para tratar animales (McEwen & Fedorka-Cray, 2002).

Las terapias con antibióticos, en especial las administradas por vía oral, si bien controlan los microorganismos patógenos también afectan a muchos gérmenes benéficos produciendo trastornos en el equilibrio de la microbiota gastrointestinal (Salminen *et al.*, 1998a). Muchos de estos antibióticos o sus residuos pueden quedar en los tejidos animales destinados al consumo humano.

Los antimicrobianos pueden incrementar la susceptibilidad de los animales a la infección al suprimir la microbiota normal y así aumentar la probabilidad que los patógenos colonicen un sitio debido a un efecto competitivo o, si fueron administrados

en el momento de exposición a un patógeno resistente, por facilitación de la infección por efecto selectivo (McEwen & Fedorka-Cray, 2002).

A lo largo de los años las condiciones de producción pecuaria han evolucionado modificando la capacidad de resistencia natural de los animales (por ejemplo, la utilización de animales seleccionados para aumentar la producción). Los nuevos métodos de alimentación caracterizados por el suministro de alimentos no naturales (sustitutos), la crianza intensiva que limita el contacto materno y utiliza condiciones de hábitat artificiales y el incremento del uso de compuestos antimicrobianos favorecen las condiciones de estrés de los animales, incrementan las deficiencias en la composición de su microbiota intestinal, hacen más frecuentes los desórdenes digestivos y producen una menor resistencia natural a la contaminación o a la colonización por microorganismos patógenos (James *et al.*, 1984; Fuller, 1992; Mulder *et al.*, 1997).

Algunas prácticas de tratamiento con antimicrobianos a animales pueden ejercer mayor presión selectiva de resistencia que otras. Se administran muchas medicaciones a concentraciones comparativamente bajas, en relación con las utilizadas de manera terapéutica, a los animales durante semanas, y a menudo durante años, en sucesivas generaciones. Esta práctica se corresponde con el principio general que habla de la capacidad de los microorganismos para resistir los efectos del agente antimicrobiano, sobrevivir y desarrollarse (McEwen & Fedorka-Cray, 2002).

Esta problemática ha estimulado el interés por el uso de aditivos alimentarios naturales y terapias alternativas no medicamentosas en reemplazo de los antibióticos utilizados en producción y sanidad animal, entre los cuales cabe destacar a los probióticos.

I.2. Los probióticos como herramienta alternativa a los antibióticos

El concepto de probióticos ha evolucionado a lo largo de los años, partiendo desde su significado original en griego “para la vida”, hasta la definición que los identifica como “organismos y sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal” (Parker, 1974). En la actualidad el concepto se ha redefinido y aduce que se trata de “cultivos de uno o varios microorganismos vivos que, cuando son suministrados al hombre o a los animales, afectan beneficiosamente al hospedador desarrollando las propiedades de la microbiota indígena” (Havenaar *et al.*, 1992).

Cuando los animales se desarrollan en sistemas de producción naturales (extensivos) o en forma salvaje, la colonización del aparato digestivo se da en forma espontánea y natural, y ellos adquieren la microbiota del entorno que lo rodea. En el animal sano, cada porción del intestino es colonizada por una microbiota típica, la cual se adapta y desarrolla en una simbiosis benéfica con el hospedador (Kurzak *et al.*, 1998). Por el contrario, en las crías artificiales, en especial cuando las crías son separadas de sus madres y alojadas en sistemas intensivos, la posibilidad de adquirir la microbiota autóctona natural se ve fuertemente disminuida y el intestino es fácilmente colonizado por patógenos (Rosmini *et al.*, 2004).

La microbiota protectora intestinal es muy estable, pero puede ser afectada en general por la dieta y los factores ambientales y, en particular, por la higiene excesiva (impide el contacto natural con los microorganismos del ambiente), la antibiótico-terapia (destruye la microbiota natural) y el estrés (modifica el equilibrio homeostático y facilita el desarrollo de patógenos) (Fuller, 1989).

En el caso de las afecciones gastrointestinales de los animales jóvenes criados en condiciones artificiales, la utilización de probióticos provenientes de la microbiota

indígena puede prevenir la colonización del tubo digestivo por patógenos, estimular el desarrollo del sistema inmunológico y contrarrestar el efecto negativo de dichas enfermedades (Rosmini *et al.*, 2004).

El mantenimiento del estado de salud en los animales, que posteriormente formarán parte de la dieta humana, a lo largo de toda la cadena de producción es clave tanto desde el punto de vista productivo como de la salud pública. La utilización de bacterias ácido lácticas (BAL) como suplemento probiótico responde a una tendencia mundial que promueve una alimentación preventiva, sana, natural, de mayor calidad nutritiva y libre de residuos.

El conocimiento del uso de probióticos como método menos agresivo para sustituir las terapias con antibióticos ha dado como resultado una nueva visión en la industria farmacéutica al contemplar una tecnología global, desde el aislamiento de probióticos de ecosistemas específicos tales como un hato o región geográfica, seleccionar y caracterizar a las bacterias responsables de la acción probiótica, producirlas a escala industrial, procesarlas y reintroducirlas a la dieta del animal. En muchos casos el uso no selectivo de probióticos (Fuller, 1989) distribuidos por casas comerciales ha dado como resultado muy baja o nula eficiencia en el aumento de la producción. Esto se ha debido a que los probióticos adquiridos procedían de otras regiones geográficas e incluso de otras especies animales. Es ahí donde radica la importancia de la selección de probióticos dirigidos a la producción de carne, a partir del organismo o alimentos de animales en un ecosistema específico, dirigiéndose en particular a los animales productores de carne.

A pesar de que el uso de antibióticos ha resuelto numerosas enfermedades, tanto en el hombre como en los animales, no ha sido tan eficiente como se esperaba y ha creado

algunos problemas nuevos tales como afectación de la microbiota intestinal protectora, predisposición a infecciones y aumento de cepas resistentes. Ante esta problemática, el uso de los probióticos para ayudar a proteger al hospedador de enfermedades y desórdenes intestinales aparece como una alternativa. Sin embargo, para la producción a nivel industrial de probióticos es indispensable considerar dos elementos fundamentales: las mejores cepas son las que provienen de especies semejantes y la importancia que el microorganismo sea utilizado en el mismo lugar donde actúa en el huésped.

A partir de los principios antes mencionados puede afirmarse que resulta de interés el estudio de los gérmenes autóctonos y la evaluación de su capacidad probiótica como alternativa de complementación de la dieta animal.

Por todo lo expuesto, se considera que la utilización de cepas microbianas indígenas probióticas, aisladas a partir de distintas regiones anatómicas de bovinos de diferentes edades, o incluso de los ensilados que estos consumen, permitirá mejorar las condiciones sanitarias y de producción de las explotaciones lecheras regionales.

Una mejora de las condiciones sanitarias con las que se manejan los animales en los establecimientos de producción, utilizando a los probióticos como suplementos alimenticios y terapéutica no medicamentosa, mejorará la inocuidad de las materias primas obtenidas en producción primaria y, por lo tanto, contribuirá a garantizar la seguridad de los alimentos de origen animal que a partir de ellas se producen.

I.3. Objetivos establecidos

Los objetivos del estudio fueron:

1. Estudiar las propiedades probióticas de los microorganismos en condiciones de laboratorio “*in vitro*” y con animales (*Mus musculus*) de experimentación “*in vivo*”.
2. Analizar la respuesta fisiológica de los animales de experimentación inoculados con microorganismos probióticos y con patógenos.
3. Determinar el grado de protección que generan los microorganismos probióticos ante una inoculación experimental con *Salmonella dublin* DSPV 595T.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. La microbiota intestinal

En el organismo animal sano, las superficies externas e internas están recubiertas por microorganismos que constituyen su microbiota natural. Se considera que el neonato es estéril durante la vida intrauterina (Berg, 1996), comenzando la colonización del tubo digestivo a las pocas horas del nacimiento a partir de la microbiota de la vagina, del intestino y la piel de la madre, así como del ambiente en general (Rotimi & Duerden, 1981; Delbecque, 1991; Salminen *et al.*, 1999).

Un importante número de bacterias que migran de estas fuentes sobreviven y se desarrollan en el tracto gastrointestinal; sin embargo una gran proporción de esta microbiota colonizadora no sobrevive ya que es incapaz de resistir tanto la presencia de antimicrobianos naturalmente presentes como los movimientos peristálticos. Con el fin de poder colonizar, las bacterias necesitan adherirse a la pared intestinal o desarrollarse más rápido que la velocidad del peristaltismo (Fuller, 1989).

Una vez establecida, la microbiota gastrointestinal normal está compuesta por dos grupos: la microbiota indígena y la microbiota transitoria. La microbiota indígena de una determinada especie animal está constituida por microorganismos que habitan en todos los integrantes de esa comunidad. En el caso de animales de abasto, es la microbiota presente en los animales de un hato o región geográfica. Esta microbiota está siempre presente en los individuos adultos, crece en anaerobiosis en el tracto gastrointestinal colonizando nichos determinados, está asociada íntimamente al epitelio de la mucosa y es capaz de mantener estable al ecosistema gastrointestinal. La microbiota indígena es la que mayor impacto tiene cuando se caracteriza a su ecosistema (Tannock, 1995; Berg, 1996).

La microbiota transitoria está formada por microorganismos no siempre presentes en todos los individuos de la comunidad. En general proviene del agua, los alimentos y de otras partes del cuerpo, pero transitan el tubo digestivo sólo en forma temporal (Tannock, 1995; Berg, 1996).

El tracto gastrointestinal de los animales se protege en forma natural por la microbiota indígena que lo coloniza a partir del momento de su nacimiento, dificultando la colonización del lumen por otros microorganismos, en especial por patógenos (Ziemer & Gibson, 1998). Este mecanismo ha sido probado por numerosos trabajos de investigación que demuestran la susceptibilidad de los animales libres de microorganismos a las infecciones intestinales como consecuencia de la acción de bacterias patógenas (Dubos & Schaedler, 1960; Abrams & Bishop, 1966; Boman, 2000). Se ha encontrado también una mayor susceptibilidad a las infecciones en animales a los que se ha suministrado previamente antibióticos (Sullivan *et al.*, 2003; Plummer *et al.*, 2005; Salminen & Isolauri, 2006). En resumen, estos trabajos han puesto en evidencia el efecto protector de la microbiota intestinal.

Una vez colonizado, el tracto gastrointestinal se transforma en un ecosistema complejo formado por elementos bióticos tales como microorganismos indígenas y transitorios, y células del epitelio intestinal; constituyentes de la dieta o componentes abióticos; y elementos endógenos como la saliva, las secreciones y excreciones de los diferentes órganos del tubo digestivo, las enzimas y las hormonas. El equilibrio de este ecosistema depende en gran medida de la microbiota intestinal indígena, muy estable en individuos adultos sanos y esencial para el mantenimiento de la salud del hospedador (Raibaud, 1992; Berg, 1996; Vaughan *et al.*, 1999). El efecto protector de la microbiota ayuda al animal a resistir a las infecciones, en particular a las del tracto gastrointestinal,

y ha recibido diferentes denominaciones: “antagonismo bacteriano”, “interferencia bacteriana”, “efecto barrera”, “resistencia a la colonización”, “exclusión competitiva” (Fuller, 1989). Para prevenir enfermedades, es muy importante que las cepas probióticas tengan la habilidad de inhibir el crecimiento de patógenos (Reid & Friendship, 2002).

Desde el punto de vista de su relación con el hospedador, la microbiota intestinal se puede clasificar en microorganismos benéficos, neutrales o peligrosos, teniendo un efecto importante sobre la estructura, la función y el metabolismo del intestino (Gibson & Roberfroid, 1995). Los patógenos ocasionan condiciones nocivas mientras que las especies neutrales inducen daños menores, como diarreas, cuando están presentes en un elevado número y son dominantes. Los microorganismos benéficos promueven síntesis de vitaminas (Kontula, 1999; Vaughan *et al.*, 1999), degradación de componentes alimenticios y producción de ácidos grasos de cadena corta y sus derivados tales como acetatos, propionatos y butiratos (Fooks *et al.*, 1999; Vaughan *et al.*, 1999), además de tener un efecto de barrera que aumenta la resistencia a la colonización por bacterias exógenas y por consiguiente previenen enfermedades intestinales, además de desarrollar el sistema inmunológico del hospedador (Berg, 1996; Salminen *et al.*, 1998b; Vaughan *et al.*, 1999).

Los microorganismos que predominan en el contenido intestinal son anaerobios obligados o facultativos, como eubacterias, peptococos, lactobacilos y bifidobacterias. En segundo lugar en abundancia se encuentran estreptococos y colibacterias. La microbiota incluye organismos sacarolíticos y proteolíticos (Pascual *et al.*, 1996; Ziemer & Gibson, 1998; Fooks *et al.*, 1999). Cerca del 90% de la microbiota intestinal que coloniza el tubo digestivo es permanente, mientras que sólo el 10% restante es transitoria (Pascual *et al.*, 1996).

Es importante hacer notar que cada especie animal presenta una composición microbiana intestinal distinta y específica, además de que la densidad de ésta varía en las diferentes zonas del tubo digestivo. Si se consideran solamente las regiones anatómicas, el duodeno es la zona de menor contenido, con no más de 10^4 unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g), seguido por el yeyuno, el estómago y la boca. En forma contraria, el íleon, el ciego y el recto son las zonas con mayor contenido, superior a 10^{11} UFC/g (Savage, 1986; Pascual *et al.*, 1996).

Con relación a la especie animal, en los pollos, el microorganismo dominante en el intestino y el ciego es *Lactobacillus salivarius* (Pascual *et al.*, 1996; Garriga *et al.*, 1998), mientras que en los patos predominan cinco géneros diferentes: *Lactobacillus* spp, *Streptococcus* spp, *Pediococcus* spp, *Enterococcus* spp y *Weissella* spp (Kurzak *et al.*, 1998). En terneros criados en condiciones artificiales se han aislado, a partir del tubo digestivo, en mayores cantidades *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus reuteri*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus casei* (Schneider *et al.*, 2004). Con excepción de *L. farciminis*, estos microorganismos han sido reportados en otras especies animales (Pascual *et al.*, 1996; Kurzak *et al.*, 1998). Es importante tomar en cuenta que el intestino de los terneros jóvenes es colonizado a partir del ambiente en el cual son criados (Schneider *et al.*, 2004).

Cuando se inicia el proceso de aislamiento de la microbiota indígena con el fin de producir probióticos a nivel industrial, la población microbiana recuperada es de importancia ya que, a mayor número de microorganismos obtenidos, mayor será la probabilidad de encontrar aquellos que posean actividad probiótica significativa para el hospedador. La metodología utilizada para aislar los microorganismos a partir de las

diferentes estructuras anatómicas puede ser determinante del número de microorganismos recuperados. El número de bacterias ácido lácticas encontradas en el buche de los patos oscila alrededor de $5,6 \times 10^4$ UFC/g cuando las muestras son obtenidas mediante el lavado de la superficie de la mucosa, y $1,1 \times 10^5$ UFC/g cuando dicha superficie es raspada. Esto pone en evidencia la capacidad de adherencia de algunos microorganismos que habitan en el tubo digestivo (Kurzak *et al.*, 1998).

La microbiota natural del intestino es una población compleja de microorganismos que ejercen una gran influencia sobre el hospedador. Cuando existe un equilibrio entre los componentes vivos y los abióticos se tiene una situación de eubiosis; la disbiosis es la situación opuesta. La eubiosis es muy estable, pero se encuentra influida por un gran número de factores: del hospedador (pH, secreciones, sales y enzimas, fisiología), microbianos (adhesión, motilidad, resistencia, tiempo de generación, requisitos nutricionales), interacciones microbianas (sinérgicas o antagónicas), dieta (composición, presencia de fármacos), ambientales, estrés (modificación del equilibrio homeostático que facilita el desarrollo de patógenos) y, en particular, por condiciones de asepsia excesiva que impiden el contacto natural del animal con los microorganismos del ambiente (Fuller, 1989; Collins *et al.*, 1998; Holzapfel *et al.*, 1998; Vaughan *et al.*, 1999; Allori *et al.*, 2000). Por otra parte, la microbiota de una porción específica del intestino está, en general, determinada por aspectos físicos como la motilidad, y químicos como el pH del ambiente; mientras que las variaciones individuales son debidas a los cambios en la dieta (Salminen *et al.*, 1998a). La microbiota presente en el estado de salud es conocida como microbiota normal, la cual preserva y promueve el bienestar y la ausencia de enfermedad, especialmente en el tracto gastrointestinal. Las

correcciones en las propiedades de la microbiota indígena desbalanceada racionaliza la utilización de la terapia probiótica (Isolauri *et al.*, 2004).

II.2. Probióticos: definición y objetivo de su utilización

Más allá de los cambios o evolución del concepto “probiótico”, los primeros conocimientos con base científica surgieron de los estudios que realizó Metchnikoff, a principios del siglo XX, acerca de los efectos que la flora intestinal tenía sobre la salud humana y sobre la observación que algunas poblaciones balcánicas alimentadas con productos lácteos fermentados tenían mayor longevidad. A pesar de esto, la búsqueda de conocimientos que fundamentaran el efecto benéfico de determinados gérmenes para la salud del hombre y de los animales mediante su posible acción probiótica se intensificó sólo después de los años ´50, período en que se masificó el uso de los antibióticos con la consiguiente aparición de resistencia microbiana y se desarrollaron los animales libres de gérmenes (Fuller, 1992).

Lilly & Stillwell (1965) utilizaron el término probiótico por primera vez para referirse a los productos de la fermentación gástrica. Posteriormente se identificó a los mismos como organismos y sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal (Parker, 1974). Actualmente se describen como “suplemento alimenticio microbiano vivo que afecta benéficamente al animal huésped fomentando su balance microbiano intestinal” (Fuller, 1989); aunque el concepto se ha redefinido como “cultivo de uno o varios microorganismos vivos que, cuando son suministrados al hombre o a los animales afectan beneficiosamente al huésped desarrollando las propiedades de la microbiota indígena” (Havenaar *et al.* 1992). Por otro lado, se ha propuesto que en la acción probiótica contribuyen dos mecanismos: aquellos no mediados por la microbiota

(Salminen *et al.*, 1998b), y los debidos a la composición química de las células microbianas *per se*. Por lo tanto, los probióticos no necesariamente son células viables (Salminen *et al.*, 1999). De todas maneras, una reunión de expertos destacó la importancia de las células vivas y definió: “los probióticos son microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren efectos benéficos al hospedador” (FAO/WHO, 2001).

Los numerosos trabajos que refieren a la utilización de probióticos identifican claramente dos áreas principales del conocimiento en las cuales se producirían los aportes mas relevantes: la sanidad (salud humana y animal) y la producción animal.

En el área de la sanidad se han destacado los estudios que explican el rol de la microbiota intestinal en el mantenimiento de la salud basado en el efecto protector de estos microorganismos (Hudault *et al.*, 1976; Smoragiewicz *et al.*, 1993; Fons, 1994; Bengmarck, 1998; Perdigón *et al.*, 2001, 2002). Los lactobacilos son componentes habituales de la microbiota intestinal normal del hombre y de los animales (Raibaud, 1992; Smoragiewicz *et al.*, 1993; Schneider *et al.*, 2004) y fueron identificados como responsables del control de las diarreas infantiles (Isolauri *et al.*, 1991), de la reducción del índice de diarreas en terneros (Abu-Tarboush *et al.*, 1996), de la reducción del número de coliformes en el intestino de terneros (Ellinger *et al.*, 1978; Bruce *et al.*, 1979) y del control de los efectos de los gérmenes patógenos como *Salmonella* sp. (Collins & Carter, 1978; Hudault *et al.*, 1997; Gill *et al.*, 2001) y *Escherichia coli* (Hudault *et al.*, 1976; Shu & Gill, 2002). Se ha demostrado que algunas bacterias ácido lácticas son capaces de inhibir a patógenos intestinales *in vitro* (Hudault *et al.*, 1997) y de proteger *in vivo* a ratones convencionales y gnotobióticos inoculados con *Salmonella enteritidis* subsp. typhimurium (Maia *et al.*, 2001; Moura *et al.*, 2001). La colonización

competitiva por parte de los microorganismos benéficos como *Lactobacillus* sp. y *Streptococcus* sp., para ayudar a proteger al animal frente a los dos patógenos antes mencionados, ocurre a muy temprana edad (Fox, 1988).

Los probióticos han sido usados terapéuticamente como moduladores de la inmunidad, para disminuir el colesterol, en tratamientos de artritis reumatoidea, en prevención del cáncer, para mejorar la intolerancia a la lactosa y prevenir o reducir los efectos de la dermatitis atópica, en la enfermedad de Crohn, en la diarrea y constipación y en las infecciones del tracto urinario (Reid, 1999).

En el campo de la producción animal, la importancia de los probióticos en cuanto a su uso en la alimentación de los animales de granja, se basa en las propiedades que se les atribuyen para mejorar la eficiencia de conversión alimenticia y como promotores del crecimiento (Dilworth & Day, 1978; Miles *et al.*, 1981; Mordenti, 1986). Algunos estudios reportan mejoras en la performance de crecimiento de los terneros (Bechman *et al.*, 1977; Gilliland *et al.*, 1980; Abe *et al.*, 1995; Meyer *et al.*, 2001) y recomiendan la incorporación del suplemento a temprana edad, momento en que la susceptibilidad a las enfermedades es mayor. Otros autores no han encontrado efecto sobre la performance de crecimiento (Hatch *et al.*, 1973; Ellinger *et al.*, 1978; Jenny *et al.*, 1991; Higginbotham & Bath, 1993; Abu-Tarboush *et al.*, 1996; Cruywagen *et al.*, 1996) aunque destacan mejoras en aspectos sanitarios de la crianza.

El resultado del estrés que el animal sufre a temprana edad en los sistemas de crianza y por la contaminación ambiental, es debido al balance entre la presencia de bacterias patógenas y no patógenas que colonizan el intestino (Fox, 1988). De esta forma se crea una exclusión competitiva que determina el establecimiento de microorganismos y estos, una vez instalados, generan un ambiente mediante la

producción de metabolitos que resultan tóxicos para el organismo competente (Miles, 1993). Esta situación afecta directamente el rendimiento de los animales de granja (Kurzak *et al.*, 1998).

El concepto de exclusión de patógenos a través de la colonización con no-patógenos se ha instalado y llevó a diferenciar los microorganismos que se adaptan mejor a cada segmento intestinal (Miles, 1993). El proceso de exclusión por competitividad entre la flora intestinal normal y las salmonellas ha sido relacionado con la competencia entre los microorganismos por los sitios de adhesión a la pared intestinal (Lloyd *et al.*, 1977). Esto tiene especial importancia en la patogenicidad, debido a que la adhesión es considerada el primer paso en el proceso de infección (Savage, 1984). Se ha demostrado que la adhesión de la microbiota nativa al intestino de aves se produce a pocas horas (6-8 h) después de su administración (Stavric *et al.*, 1991). Por otra parte, el suministro de nutrientes seleccionados (azúcares) puede ayudar al establecimiento de la microbiota benéfica debido a que son utilizados por los microorganismos y no por el huésped. Los fructo-oligosacáridos, como la sucrosa, no son digeridos en los primeros días de vida por las enzimas intestinales de los terneros lactantes, pero sí son aprovechados por los lactobacilos y bifidobacterias como recurso energético, lo cual favorece su desarrollo. Por su parte, *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* no son capaces de utilizar estos azúcares como nutrientes. Otro carbohidrato que se comporta en forma similar es la manosa, participando en el proceso de competencia entre los microorganismos a través de interferencias en la adherencia (Milerman *et al.*, 1980). La lactosa es un carbohidrato que puede ser digerido por los terneros (Cruywagen *et al.*, 1996) y por otras crías jóvenes de mamíferos. Además, la lactosa ha sido utilizada junto a las BAL para evitar la colonización de *Salmonella typhimurium* en el buche de aves (Johannsen *et al.*, 2004)

y se ha sugerido que promueve el crecimiento de bacterias que fermentan la lactosa y que compiten con *Salmonella typhimurium* por los sitios de colonización en el intestino (Oyofó *et al.*, 1989).

Ciertas cepas de bacterias lácticas, utilizadas en la producción de alimento humano y animal, tienen no sólo un efecto benéfico sobre la calidad higiénica del producto y de la duración de la vida útil al inhibir su flora nociva, sino que aumentan igualmente su valor dietético (Pollman *et al.*, 1980). Ellas enriquecen el alimento con vitaminas, sobre todo del complejo B, participan en la predigestión de las proteínas y los lípidos, hidrolizan y metabolizan la lactosa y degradan las sustancias cancerígenas (nitrosaminas) y los factores antinutricionales presentes en los productos agrícolas (Smoragiewicz *et al.*, 1993). Los lactobacilos en leches cultivadas son utilizados para suplementar la flora intestinal normal de personas que padecen enfermedades entéricas. Además, estas leches son toleradas por los individuos que padecen intolerancia a la lactosa, debido a que los propios lactobacilos utilizan este hidrato de carbono en el intestino (Smith & Palumbo, 1981).

En los últimos años se han puesto en marcha trabajos destinados a tratar de esclarecer el modo de acción de los probióticos (Fuller, 1997), necesarios para poder predecir y conocer su respuesta *in vivo*, y otros en los cuales, mediante la aplicación de técnicas de ingeniería genética, se busca mejorar cepas de *Streptococcus* sp. y *Lactobacillus* sp. (Goldin & Gorbach, 1992).

II.3. Mecanismos de acción de la microbiota probiótica

La composición y el metabolismo de la microbiota intestinal afecta el desarrollo de los animales de granja de diferentes formas, en especial a los animales jóvenes que

están sometidos al estrés ambiental (Kurzak *et al.*, 1998). Este efecto es producido mediante tres mecanismos: la competencia por nichos específicos en la mucosa intestinal, la disputa por nutrientes y la producción de compuestos bactericidas o bacteriostáticos (Fuller, 1989; Blum *et al.*, 1999).

Para poder excluir patógenos en el sistema gastrointestinal es importante diferenciar los microorganismos que se adaptan mejor a cada segmento intestinal (Miles, 1993). En el caso particular de la exclusión de *Salmonella*, microorganismo que causa serios problemas y pérdidas a los productores, se ha relacionado la competencia por los sitios de adhesión a la pared intestinal (Lloyd *et al.*, 1977), mecanismo que tiene especial importancia en la patogenicidad debido a que la adhesión es el primer paso en el proceso de infección (Savage, 1984; Stavric *et al.*, 1991).

La producción de compuestos antibacterianos específicos como las bacteriocinas (nisina y pediocinas) también han sido mencionadas entre los factores benéficos del uso de probióticos (Klaenhammer, 1988; Daeschel, 1989; Schillinger & Lucke, 1989). La eficiencia en la producción de bacteriocinas de algunos microorganismos nativos, la purificación y caracterización, y la superproducción de bacteriocinas por métodos de ingeniería genética han sido explorados a nivel de laboratorio e industrial (Havenaar *et al.*, 1992; Dunne *et al.*, 1999; Remiger *et al.*, 1999; Ross *et al.*, 1999; Frizzo *et al.*, 2002). Los efectos inhibitorios de las BAL sobre los microorganismos indeseables pueden deberse también a la disminución del pH del intestino debido a la producción de ácido láctico, acético y propiónico por bacterias lácticas hetero y homofermentativas o de peróxido de hidrógeno (Huber, 1997; Nousiainen & Setälä, 1998).

El tejido linfoide asociado al intestino hace del tracto gastrointestinal el órgano inmune más grande del cuerpo (Collins *et al.*, 1998). La mucosa intestinal contribuye a

la exclusión y eliminación de microorganismos y antígenos peligrosos presentes en la dieta (Brandzaeg, 1995). La exclusión de antígenos ha sido asociada con la capacidad de la mucosa intestinal para producir moco e IgA secretoria (Slomiany *et al.*, 1987). Algunos lactobacilos tienen la capacidad de aumentar el número de células inmunocompetentes productoras de IgA asociadas al intestino y de macrófagos, neutrófilos y eosinófilos relacionados con una respuesta inmune inflamatoria (Vitiñi *et al.*, 2000).

II.4. Evaluación *in vitro* de las capacidades probióticas microbianas orientadas al diseño de inóculos probióticos multiespecie

En la actualidad se reconocen dos principios básicos que deben respetarse cuando se seleccionan cepas bacterianas con el fin de ser administradas a los animales para revertir las deficiencias causadas por la crianza intensiva: la especificidad del huésped, el cual indica que las mejores cepas son las que provienen de especies semejantes (Fuller, 1997; Gilliland *et al.*, 1980), y la proximidad del ecosistema, que reconoce la importancia de que el microorganismo sea utilizado en el mismo lugar donde actúa en el huésped. El hecho de que existan sitios específicos en el tracto gastrointestinal tiene base en la capacidad de las cepas de adherirse a las células del epitelio intestinal (Fuller, 1989; Havenaar *et al.*, 1992).

En general se acepta que un microorganismo debe poseer un conjunto de propiedades para ser considerado un buen probiótico: provenir de la misma especie en la que será utilizado, ser capaz de demostrar un efecto benéfico en el hospedador, ser estable ante los ácidos gástricos y la bilis de forma que pueda desarrollar su metabolismo en el ambiente intestinal, poseer buena capacidad de adhesión a las

superficies de las mucosas, ser seguro para su uso como alimento -con funciones profilácticas- o como medicamento -con funciones terapéuticas (no ser patógeno ni tóxico)-, poseer buenas propiedades tecnológicas y de sobrevivencia en condiciones de almacenamiento (Fuller, 1989; Ziemer & Gibson, 1998; Ouwehand *et al.*, 1999).

La supervivencia durante el tránsito gastrointestinal de las bacterias ingeridas es importante para la selección y el desarrollo de inóculos probióticos, así como para entender mejor los posibles mecanismos de la función probiótica de los microorganismos (Marteau *et al.*, 1997).

Las cepas probióticas pueden ser seleccionadas teniendo en cuenta su condición de habitante intestinal normal (Gusils *et al.*, 2002). Si bien este concepto dirigiría la búsqueda de los exponentes microbianos hacia el tracto gastrointestinal (contenido y mucosas) resulta interesante comprobar el comportamiento de aquellos microorganismos que se encuentran en el ambiente cercano a los animales. Esto se debe a que es muy difícil confirmar la fuente de un microorganismo y no está aclarado totalmente el origen de la microbiota intestinal (FAO/WHO, 2001).

La especificidad de especie animal es un factor importante que interfiere en la colonización y en la adhesión *in vivo* por parte de los microorganismos. Esto indica que las cepas bacterianas aisladas desde la microbiota indígena de una determinada especie no colonizan necesariamente el mismo sitio en otra especie animal. Sin embargo, debido a que el desempeño de los microorganismos probióticos puede variar entre los animales de una misma especie, es conveniente que el inóculo a utilizar esté formado por una mezcla de varias cepas (Gardiner *et al.*, 2004), ya que la funcionalidad de un inóculo probiótico multicepa puede ser más efectiva y consistente que la de un monocepa (Timmerman *et al.*, 2004). Una ventaja de los inóculos integrados por varias cepas es la

posibilidad de complementar sus efectos expresando sus propiedades probióticas en forma sinérgica. Por otra parte, es más probable que la colonización de un ecosistema complejo como el gastrointestinal ocurra con inóculos probióticos multiespecies que con preparaciones monocepa.

La eficacia de las cepas seleccionadas debe ser comprobada antes que las mismas sean incorporadas a un producto alimenticio y suministradas a los animales. Para ello son utilizados una serie de criterios que permiten determinar *in vitro* algunas propiedades probióticas. La estabilidad a la bilis y a la acidez son propiedades que todas las cepas deberían reunir si se espera que ellas tengan efectos benéficos en el tracto intestinal (Nousiainen & Setälä, 1998). Los microorganismos ingeridos están expuestos, durante su tránsito gastrointestinal, a factores estresantes que comprometen su supervivencia (Marteau *et al.*, 1997). Esto determina la necesidad de contar con métodos *in vitro* confiables que permitan seleccionar cepas prediciendo su supervivencia en el tubo digestivo (Jacobsen *et al.*, 1999).

La condición ácida del estómago es una barrera natural que previene el paso de la mayoría de los microorganismos hacia el intestino. Aunque pocas bacterias pueden tolerar un ambiente ácido (pH 3), las BAL tienen la habilidad de sobrevivir y crecer en ambientes con pH bajo. Además, la producción de ácidos orgánicos por las BAL disminuye el pH de su entorno y las coloca en una situación ventajosa frente a microorganismos sensibles a la acidez. Después del pasaje a través de las condiciones ácidas del estómago, los microorganismos incorporados a la dieta deben ser capaces de sobrevivir a los efectos tóxicos de la bilis en el intestino (Gotcheva *et al.*, 2002). Este efecto estresante sobre las cepas de *Lactobacillus* es complejo porque la concentración de bilis y el tiempo de residencia varía en cada parte del tracto gastrointestinal. Además,

la resistencia a la bilis puede ser incrementada debido al efecto protector de algunos componentes de los alimentos.

Una propiedad valiosa para considerar su aplicación en la dieta de los animales es la capacidad que tienen las BAL para controlar los efectos adversos que producen algunos patógenos intestinales (Frizzo *et al.*, 2005). El desarrollo de productos probióticos eficaces sugiere que las cepas deberían poseer actividad antimicrobiana porque esta característica hace que las BAL, cuando se administran en cantidad adecuada, tengan potencial para generar una barrera frente a los patógenos. Esto ayudaría a mantener en balance la microbiota intestinal durante etapas críticas del desarrollo de los animales (Fuller, 1989). Si bien algunas cepas han mostrado efectos benéficos al ser suministradas con fines terapéuticos, la administración de microorganismos junto con los alimentos, a manera de profilaxis y desde el nacimiento, permite incorporar y establecer las cepas seleccionadas que integran el inóculo junto a la microbiota del animal. Esta colonización temprana de las BAL benéficas en el ecosistema intestinal permitiría la acción del inóculo en situaciones fisiológicas y colocaría al animal en una posición ventajosa ante la invasión de algún patógeno.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Estudio “*in vitro*” de las BAL de origen bovino

III.1.1. Cepas lácticas utilizadas

Los microorganismos usados fueron obtenidos en un estudio anterior (Schneider *et al.*, 2004) mediante aislamiento desde la saliva y las diferentes partes del intestino (duodeno, yeyuno y colon) de terneros lactantes de entre 5 y 25 d de vida, criados en “guacheras” de los establecimientos lecheros, y de la vagina de vacas que estaban próximas al parto. Todos los establecimientos donde se tomaron muestras estaban en el área de influencia de la FCV-UNL. La identificación se hizo por técnicas de biología molecular (16s-rDNA-PCR) (Schneider *et al.*, 2004). Las BAL indígenas utilizadas en el trabajo se encuentran listadas en la tabla 1.

Tabla 1. Bacterias ácido lácticas indígenas utilizadas en el estudio.

Especie	Cepa	Origen
<i>Lactobacillus farciminis</i>	DSPV 003T	Saliva
<i>Pediococcus acidilactici</i>	DSPV 006T	Duodeno
<i>Enterococcus faecium</i>	DSPV 022T	Vagina
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSPV 301T	Saliva
<i>Lactobacillus reuteri</i>	DSPV 311T	Colon
<i>Lactobacillus salivarius</i>	DSPV 315T	Yeyuno
<i>Lactobacillus casei</i>	DSPV 318T	Saliva

III.1.2. Cuantificación del crecimiento de las cepas

Las BAL se multiplicaron en caldo MRS (De Man *et al.*, 1960) (Biokar, Francia) durante 18 h a 37 °C para obtener un cultivo madre de cada una de las cepas en estudio. Con el fin de establecer un método rápido de cuantificación se realizaron diluciones decimales a partir de cada cultivo madre. A estos cultivos y a sus diluciones se le realizaron determinaciones de densidad óptica a 560 nm (DO_{560}) con un espectrofotómetro (Metrolab 330, UV Vis) y, paralelamente, se efectuaron los recuentos en placas para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC). Para cada cepa se construyó su curva estándar a partir del logaritmo de las UFC y de las lecturas de DO_{560} obtenidas (figura 1). La curva se utilizó para cuantificar y evaluar la capacidad de las cepas para producir biomasa.

III.1.3. Crecimiento en bilis

El estudio de la resistencia a la bilis se llevó a cabo de acuerdo con la metodología utilizada por Walker & Gilliland (1993). Las BAL fueron multiplicadas en caldo MRS con 0% (control), 0,3%, 0,5% y 1% de bilis bovina (Britania, Argentina). Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 24 h y el crecimiento se midió por DO_{560} . Los resultados se expresaron en \log_{10} UFC/ml utilizando la ecuación del modelo de cuantificación.

III.1.4. Tolerancia a jugos gástricos simulados (JGS)

El ensayo de tolerancia a los jugos gástricos se llevó a cabo de acuerdo con las indicaciones de Charteris *et al.* (1998). El JGS consistió en una solución de pepsina (Riedel-de Haën, Alemania) (0,3% p/v) y NaCl (0,5% p/v) ajustada a pH 3. Cultivos frescos de cada cepa fueron centrifugados a 4000g por 10 min. El “pellet bacteriano” se

lavó 2 veces con PBS pH 6,5 y, por un lado, 1 ml de la suspensión celular se resuspendió en 5 ml de JGS para evaluar su efecto. Por otra parte, a 1 ml de la misma suspensión se le agregó PBS pH 6,5 (control). Se realizaron recuentos de células viables en agar MRS a tiempo 0. Las suspensiones celulares se incubaron durante 3 h a 37 °C y se repitieron los recuentos. En ambos casos las placas fueron incubadas durante 48 h a 37 °C en atmósfera anaeróbica.

III.1.5. Prueba de agregación

El ensayo de agregación se llevó a cabo de acuerdo a la técnica utilizada por Reniero *et al.* (1992). Los cultivos de las BAL utilizadas, incubados 18 h a 37 °C en MRS, fueron lavados tres veces con agua destilada y resuspendidos en el volumen inicial con una solución Ringer ¼. Los sobrenadantes de cada una de las cepas fueron esterilizados por filtración y agregados a la suspensión a una concentración final del 10% (v/v) e incubados a temperatura ambiente. La agregación se consideró positiva cuando partículas visibles, similares a la arena y formadas por las células agregadas, se depositaron en el fondo del tubo dejando el sobrenadante limpio en un período máximo de 2 h a temperatura ambiente.

III.1.6. Prueba de coagregación

El ensayo de coagregación se realizó de acuerdo al procedimiento utilizado por Kmet *et al.* (1995) y fueron utilizadas las cepas que mostraron actividad de agregación positiva. Se prepararon suspensiones en PBS de las BAL y de las cepas indicadoras utilizadas: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella dublin* DSPV 595T. Se mezclaron 250 µl de los cultivos, incubados 18 h a 37 °C en MRS, de las BAL lavadas y

resuspendidas en agua junto a 250 µl de *Escherichia coli* ATCC 25922 o *Salmonella dublin* DSPV 595T lavadas con agua (multiplicadas a 37 °C durante 18 h en BHI (Britania, Argentina)). A la mezcla se le agregó 500 µl de PBS (pH = 6,0). La prueba se consideró positiva cuando se hizo visible la sedimentación de las células sobre el fondo del tubo en un período máximo de 2 h a temperatura ambiente. Se desarrollaron controles con suspensiones en PBS de las BAL y los patógenos utilizados.

III.1.7. Hidrofobicidad de la superficie celular

Para evaluar la hidrofobicidad en la superficie bacteriana se realizó un ensayo en base a las indicaciones de Kmet & Lucchini (1997). Cada una de las BAL tomadas de un cultivo fresco en caldo MRS a 37 °C ($DO_{560} = 0,6$) y lavadas con PBS, fueron mezcladas con la misma cantidad de *n*-hexadecano (Merck, Alemania) a temperatura ambiente. Después de un tiempo de separación de 60 min, se midió la DO_{560} de la fase acuosa. El porcentaje de hidrofobicidad se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de hidrofobicidad} = \frac{(DO_{560} \text{ antes de mezclar} - DO_{560} \text{ después de mezclar}) \times 100}{DO_{560} \text{ antes de mezclar}}$$

Así, la disminución en la DO fue usada como medida de la hidrofobicidad de la superficie celular y se expresó como porcentaje. Además, estos resultados se expresaron como \log_{10} UFC utilizando las ecuaciones del modelo para cuantificar los microorganismos (figura 1).

III.1.8. Detección de la actividad inhibitoria

La detección de la actividad inhibitoria se realizó utilizando el método de difusión en agar (Bhunja *et al.*, 1988). Sobre 10 ml de medio MRS (1,5% de agar) solidificado

en una placa de Petri se colocó una delgada lámina de 8 ml de medio MRS (0,8% de agar) inoculado con 0,3 ml de una dilución 1/10 del cultivo de la cepa blanco u objetivo. Las placas se colocaron a 4 °C durante 1 h y se prepararon hoyos de 5 mm de diámetro sobre la capa de agar superior. Cuando se utilizaron microorganismos patógenos y alterantes como cepa blanco, fue empleado el agar BHI o agar tripticasa soya en esta parte del ensayo.

Por otro lado, las BAL se cultivaron en caldo MRS durante 18 h a 37 °C. Los sobrenadantes de los cultivos frescos obtenidos por centrifugación fueron ajustados a pH 5,8 y pH 6,5 y esterilizados por filtración para obtener así el extracto libre de células (ELC). Este fue utilizado en un volumen de 25 µl para rellenar cada hoyo, de los mencionados anteriormente. Las placas se incubaron a 37 °C durante 18 a 24 h y se examinaron en busca de halos de inhibición alrededor de los hoyos. Los resultados se informaron como positivos o negativos según la presencia o ausencia de zona de inhibición.

Como microorganismos blanco se utilizaron *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella dublin* DSPV 595T. Además, las propias BAL fueron empleadas como blanco para determinar la inhibición entre ellas, y por lo tanto, su interacción. Como microorganismo control (productor de bacteriocina) se utilizó una cepa de *Lactococcus lactis* y como control blanco (cepa sensible) se utilizó una cepa de *Lactobacillus sake*. Los microorganismos patógenos y alterantes se cultivaron en caldo Tripticasa soya (Britania, Argentina) y BHI durante 18-24 h a 37 °C. Todas las cepas utilizadas estaban almacenadas a -80 °C con 35% de glicerol como crioprotector y antes de su utilización fueron activadas.

III.1.9. Análisis estadístico

Para cuantificar las cepas se empleó un modelo logarítmico de regresión. Los datos representados por variables continuas fueron analizados utilizando un ANOVA mediante el Programa Statgraphics Plus para Windows ver. 3.0. (Statgraphics Plus software®, 1997). Cuando las diferencias resultaron significativas se aplicó el test de Tukey de comparaciones múltiples de medias.

III.2. Propiedades “*in vivo*” de BAL de origen bovino. Colonización microbiana, evolución de la microflora, comportamiento del peso y la conversión alimenticia en ratones (*Mus musculus*)

III.2.1. Animales de laboratorio

Se utilizaron 56 ratones convencionales (*Mus musculus*) de cepa Swiss con 21 d de vida, que fueron provistos por el Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio (FCV-UNL). Los animales fueron mantenidos en jaulas, en condiciones de confort ambiental y alimentados con balanceado comercial peleteado (Balanceados Constantino, Córdoba, Argentina) y agua, suministrados ambos *ad libitum* durante todo el experimento. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a la Guía para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (NRC, 1996).

III.2.2. Microorganismos

Se utilizaron 3 cepas lácticas de origen bovino: *Lactobacillus casei* DSPV 318T, *Lactobacillus salivarius* DSPV 315T y *Pediococcus acidilactici* DSPV 006T. Estos microorganismos se conservaron a -80 °C en medio MRS con 35% de glicerol. Las

cepas fueron cultivadas sucesivamente 2 veces en 10 ml de caldo MRS a 37 °C antes de generar la biomasa a inocular en los animales.

III.2.3. Selección de mutantes de *L. casei* DSPV 318T resistentes a rifampicina

Las cepas de *L. casei* DSPV 318T resistentes al antibiótico se obtuvieron por cultivos seriales en medio MRS desde niveles bajos hasta una concentración de 100 µg/ml de rifampicina (Kurzak, 2000; Demecková *et al.*, 2002). La rifampicina se preparó en una solución stock (10 mg/ml) y fue utilizada a una concentración final de 100 µg/ml. A partir de un cultivo “overnight” de dicho microorganismo se sembraron placas que contenían agar MRS suplementado con rifampicina y fueron incubadas durante 48 h a 37 °C. Finalmente, se obtuvo una colonia utilizando el método de aislamiento. La cepa resistente a rifampicina se propagó en caldo MRS durante 24 h a 37°C. Se compararon los parámetros fisiológicos y bioquímicos de la cepa original y la resistente a rifampicina para asegurar que la única diferencia entre ambas era dicha resistencia. El cultivo de *L. casei* DSPV 318T resistente a rifampicina fue conservado a -80 °C en caldo MRS con 35% de glicerol. La cepa resistente obtenida se incorporó al inóculo probiótico en reemplazo de la cepa original.

III.2.4. Diseño del experimento

Los animales se dividieron al azar en dos grupos experimentales, grupo control (G-C) y grupo inoculado (G-BAL), de 29 y 27 individuos respectivamente. Para evaluar la performance de crecimiento se determinó diariamente el consumo de alimento de cada grupo y la evolución del peso vivo. A partir del valor correspondiente al consumo de alimento se calculó el consumo individual estimado (CIE). La conversión alimenticia

fue calculada cada 72 h a partir de los datos del consumo de alimento grupal y la variación de peso en ese período de tiempo. La presencia de signos de enfermedad en los ratones se evaluó de acuerdo a los criterios utilizados por Shu & Gill (2002). La morbilidad se calculó en base a la proporción relativa de animales con apariencia anormal en cada grupo. Además, fueron registrados los datos de mortandad por lote. Para determinar la colonización del tracto intestinal de los ratones por el *Lactobacillus casei* DSPV 318T se realizaron recuentos de colonias viables (UFC) recuperadas de materia fecal (MF) y de intestino delgado (ID). Algunas de las especies que integran la microbiota intestinal de los ratones fueron analizadas, a partir de la materia fecal, con el fin de evaluar su posible relación con el inóculo.

III.2.5. Preparación y administración del inóculo

El inóculo estaba formado por una dosis de 100 µl de una suspensión de los tres microorganismos antes mencionados, en una solución de NaCl 0,15M, a una concentración final de 10^9 UFC y fue administrado a los ratones del G-BAL por “gavage” esofágico durante los primeros 3 d desde el inicio de la experiencia y en días alternos hasta completar la séptima dosis. El G-C fue inoculado de la misma manera pero con 100 µl de la solución de NaCl 0,15M a manera de placebo.

III.2.6. Análisis microbiológico de las muestras fecales

Las muestras fecales, obtenidas de los ratones cada 4 d, se agruparon en un “pool” general para cada grupo experimental (Rogelj *et al.*, 2002). Las muestras, previamente pesadas, fueron diluidas 1/100 en solución Ringer $\frac{1}{4}$ y homogeneizadas, mediante agitación manual con perlas metálicas, en condiciones de esterilidad. A partir de las

diluciones seriadas de cada muestra se sembraron, por triplicado, en los medios de cultivo y bajo las condiciones que muestra la tabla 2.

Tabla 2. Medios de cultivos y métodos para microorganismos intestinales.

Medio	Principales microorganismos enumerados	Tiempo de incubación (d)	Cita bibliográfica
Cultivo aeróbico			
BBAs ¹	Aerobios	2	Summanen <i>et al.</i> , 1993
KF ²	<i>Enterococcus</i> spp.	1	Gelsomino <i>et al.</i> , 2001
SDs ³	Levaduras	2	Tannock <i>et al.</i> , 2000
VRBA ⁴	Coliformes	1	Demecková <i>et al.</i> , 2002
Cultivo anaeróbico			
BBAs ¹	Anaerobios	2	Summanen <i>et al.</i> , 1993
Beerens ⁵	<i>Bifidobacterium</i> spp.	2	Beerens, 1990
MRS ⁶	<i>Lactobacillus</i> spp.	2	De Man <i>et al.</i> , 1960
BBEAs ⁷	<i>Bacteroides</i> spp. esc + <i>Bacteroides</i> spp. esc -	2	Summanen <i>et al.</i> , 1993

¹Agar sangre brucella suplementado con hemina (5 µg/ml) y vitamina K₁(1 µg/ml).

²Agar KF base para enterococos suplementado con TTC (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio, 100 µg/ml).

³Agar Sabouraud dextrosa suplementado con cloranfenicol (50 µg/ml).

⁴Agar violeta rojo y bilis.

⁵Agar Beerens selectivo para bifidobacterias.

⁶Agar de Man, Rogosa y Sharpe para lactobacilos.

⁷Agar esculina bilis bacteroides suplementado con hemina (5 µg/ml) y gentamicina (40 µg/ml).

Para verificar la presencia de *L. casei* DSPV 318T, se sembraron diluciones apropiadas en agar MRS suplementado con rifampicina (100 µg/ml) y se incubaron a 37

°C durante 48 h en condiciones anaeróbicas. Se seleccionaron colonias al azar desde las placas con antibiótico para posteriormente evaluar la morfología y la reacción de Gram (Demecková *et al.*, 2002).

III.2.7. Recuperación de *L. casei* DSPV 318T y de bacterias lácticas intestinales

Se realizaron necropsias programadas, cada 7 d, de 4 animales escogidos al azar en cada grupo experimental. La muestra se preparó agrupando, en un pool general para cada grupo, el ID de los ratones obtenido en condiciones asépticas. Cada muestra fue diluida 1/10 con solución Ringer ¼ y homogeneizada, mediante agitación manual, con perlas metálicas. A partir de esta, se realizaron diluciones seriadas de cada muestra y se sembraron, por triplicado, placas de agar MRS para contar *Lactobacillus* totales y placas de agar MRS con rifampicina (100 µg/ml) para los recuentos de *Lactobacillus casei* DSPV 318T. Las placas de Petri se incubaron a 37 °C durante 48 h en condiciones anaeróbicas. Se seleccionaron colonias al azar desde las placas con antibiótico para posteriormente evaluar la morfología y la reacción de Gram y así confirmar la recuperación de *L. casei* DSPV 318T (Demecková *et al.*, 2002).

III.2.8. Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA para determinar si existían diferencias significativas entre las variables del G-C y del G-BAL estudiadas (peso vivo, ganancia de peso vivo, consumo de alimento, UFC en poblaciones microbianas). La sobrevivencia en ambos lotes se analizó mediante el test de χ^2 con corrección de Yates. Las pruebas estadísticas se realizaron con el Programa Graphpad Instat Software version 3.01 (Graphpad Instat Software®, 1994).

III.3. Propiedades “*in vivo*” de BAL de origen bovino. Desafío experimental frente a *Salmonella dublin* DSPV595T en ratones (*Mus musculus*)

III.3.1. Animales de laboratorio

En el estudio se utilizaron 63 ratones convencionales (35 machos y 28 hembras) (*Mus musculus*) de cepa Swiss de 21 d de vida provistos por el Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio (FCV-UNL). Fueron agrupados al azar en jaulas y se mantuvieron en condiciones de confort ambiental durante todo el experimento. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a la Guía para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (NRC, 1996). Se alimentaron con comida peleteada para roedores (Balanceados Constantino, Córdoba, Argentina). El alimento y el agua de bebida se suministraron *ad libitum* durante todo el experimento.

III.3.2. Microorganismos

Se utilizaron 3 cepas bacterianas de origen bovino: *Lactobacillus casei* DSPV 318T, *Lactobacillus salivarius* DSPV 315T, y *Pediococcus acidilactici* DSPV 006T. Estos microorganismos se conservaron a -80 °C en medio MRS con 35% de glicerol.

La cepa de *Salmonella dublin* DSPV 595T es de origen bovino y se obtuvo de un aislamiento realizado en la FCV a partir de órganos procedentes de una necropsia llevada a cabo en el Hospital de Salud Animal. Este microorganismo se mantuvo a -80 °C en medio BHI con 35% de glicerol. Su perfil bioquímico se determinó 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 Institutos de Salud (A.N.L.I.S.), “Dr. Carlos G. Malbrán” (Argentina).

III.3.3. Preparación del inóculo

Para preparar el inóculo que se administró a los animales, cada cultivo madre fue centrifugado a 2000g durante 5 min y resuspendido en solución fisiológica (NaCl 0,15M) hasta obtener una concentración individual de 10^9 UFC/ml. A continuación se mezclaron las 3 cepas en contenedores *ad hoc*, se realizó un nuevo centrifugado en las condiciones antes mencionadas y se resuspendieron en 1/10 del volumen original con el fin de obtener una concentración de 10^9 UFC de cada cepa por cada 100 μ l de suspensión.

III.3.4. Tratamiento con el inóculo de BAL

El inóculo de BAL estaba formado por una dosis diaria de 100 μ l de la suspensión antes mencionada, la cual fue administrada a los 31 ratones del grupo tratado (G-BAL) por gavage esofágico, durante 10 d, antes de la administración del microorganismo patógeno y en días alternos durante el resto del experimento. El grupo control (G-C) fue inoculado de la misma manera pero con 100 μ l de solución fisiológica.

III.3.5. Inoculación del patógeno

Una cepa de *Salmonella dublin* DSPV 595T, desarrollada en caldo BHI durante 18 h a 37 °C, fue administrada por gavage esofágico, en el día 11 del experimento, a todos los ratones de ambos grupos estudiados (G-BAL y G-C). El inóculo contenía una suspensión de $2,5 \times 10^5$ UFC en un volumen de 250 μ l. La dosis infectiva fue elegida tomando como referencia la información bibliográfica disponible (Silva *et al.*, 1999).

III.3.6. Diseño del experimento

Los animales se dividieron en dos grupos donde 31 ejemplares (18 machos y 13 hembras) conformaron el G-BAL o grupo tratado y 32 (17 machos y 15 hembras) integraron el G-C o grupo control. Se determinaron diariamente las ganancias de peso individual (GPI), el consumo de alimento grupal (CAG), la morbilidad y la mortalidad acumulada. La apariencia del estado de salud de cada animal fue monitoreada dos veces al día durante todo el experimento. El criterio utilizado para caracterizar el estado normal y anormal en la apariencia de los individuos fue el siguiente (Shu & Gill, 2002): (1) normal, ratón con ojos brillosos y alertas, tiene un pelaje uniforme y brillante, responde a los estímulos y muestra interés en su ambiente; (2) anormal, pelaje erizado, pelo opaco, poco activo, poco interesado en el ambiente que lo rodea, signos de hiperventilación cuando se lo manipula, no responde a los estímulos y estado de agitación. La morbilidad se calculó en base a la proporción relativa de animales con apariencia normal en cada grupo.

Para la evaluación de los cambios histológicos se definieron indicadores específicos de lesiones para cada órgano partiendo de su presencia o ausencia. Dichos indicadores (Tabla 3) permitieron estandarizar la rutina de observación y evaluar el grado de modificación de las estructuras. A partir de la interpretación de los indicadores observados se estableció cuáles de los animales presentaban lesiones patognómicas compatibles con salmonelosis y se tabularon sus frecuencias para el análisis estadístico. Se consideró animal con lesión completa micromorfológica patognómica a un severo proceso inflamatorio agudo, en ocasiones de tipo hemorrágico junto a la presencia de nódulos paratifoideos centros de necrosis coagulativa infiltrada por polimorfonucleares (PMN).

Tabla 3. Indicadores micromorfológicos de la enfermedad.

Órgano diana		
Yeyuno	Hígado	Bazo
Atrofia de vellosidades	Colangiohepatitis	Esplenitis aguda
Regeneración glandular	Tromboflebitis centrolobulillar	hemorrágica
Infiltración de lámina propia	Nódulos paratifoideos ¹	Nódulos paratifoideos ¹
Necrosis fibrinosa		
Vasculitis		
Nódulos paratifoideos ¹		

¹Lesión patognomónica

III.3.7. Necropsias

Se realizaron dos tipos de necropsias: programadas y no programadas. Las primeras se efectuaron en días prefijados con animales escogidos al azar (tabla 4) y al final de la experiencia con los animales que no murieron.

Tabla 4. Detalle de las necropsias programadas efectuadas al inicio del experimento.

Tiempo de experimento	Número de animales sacrificados	
	G-C	G-BAL
Día 0 (sin inóculo en ambos grupos)	2	2
Día 7 (inóculo probiótico en G-BAL)	2	2
Día 14 (probiótico + <i>Salmonella dublin</i> en G-BAL. <i>Salmonella dublin</i> en G-C)	2	2

Los animales fueron sacrificados por exanguinación para efectuar las correspondientes necropsias. Las necropsias no programadas se realizaron a todos los animales que murieron después de la inoculación del patógeno y dentro de las 12 h posteriores a la muerte. Los órganos obtenidos (yeyuno, hígado y bazo) fueron fijados en formol al 10% estabilizado.

III.3.8. Elaboración y observación de preparados histológicos

La reducción de las muestras se efectuó dentro de las 24 h del sacrificio o muerte espontánea del animal y previa deshidratación fueron montadas en tacos de parafina. Los cortes se efectuaron mediante un micrótomo tipo Minot con un grosor de 3 a 5 μm y posteriormente fueron sometidos a la coloración de hematoxilina de Mayer-eosina. La observación se efectuó con un microscopio binocular Olympus CH 40 y para la captura de imágenes se utilizó una cámara digital Olympus 4000.

III.3.9. Análisis estadístico

La diferencia en los porcentajes de morbilidad y sobrevivencia y las frecuencias de lesiones en ambos lotes se analizaron con el test de χ^2 (con corrección de Yates). El aumento y la diferencia de peso de los grupos G-C y G-BAL se compararon mediante un ANOVA. Las pruebas estadísticas se realizaron con el Programa Graphpad InStat Software version 3.01 (Graphpad InStat Software®, 1994).

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV.1. Estudio “*in vitro*” de las BAL de origen bovino

IV.1.1. Cuantificación del crecimiento

El modelo logarítmico utilizado ajustó en forma significativa ($P < 0,01$) y permitió cuantificar las cepas estudiadas (figura 1). Además, fue posible evaluar la capacidad de los microorganismos para generar biomasa. *Lactobacillus casei* DSPV 318T fue quien produjo mayor concentración microbiana por unidad de volumen.

IV.1.2. Crecimiento en bilis

Todas las cepas indígenas mostraron tolerancia a la bilis bovina siendo *L. salivarius* DSPV 315T la que presentó el mejor crecimiento en presencia de este inhibidor (Tabla 5).

IV.1.3. Tolerancia a jugos gástricos simulados (JGS)

Las cepas estudiadas mostraron una alta capacidad de sobrevivencia cuando fueron expuestas a soluciones gástricas de pH tan bajo como 3, y *L. casei* DSPV 318T fue quien mejor toleró la solución gástrica (tabla 5).

IV.1.4. Hidrofobicidad

Todas las cepas utilizadas en el ensayo mostraron una superficie celular extremadamente hidrofílica (tabla 5).

Figura 1. Curvas estándar de calibración utilizadas para cuantificar bacterias ácido lácticas indígenas. Los valores indicados representan la media aritmética.

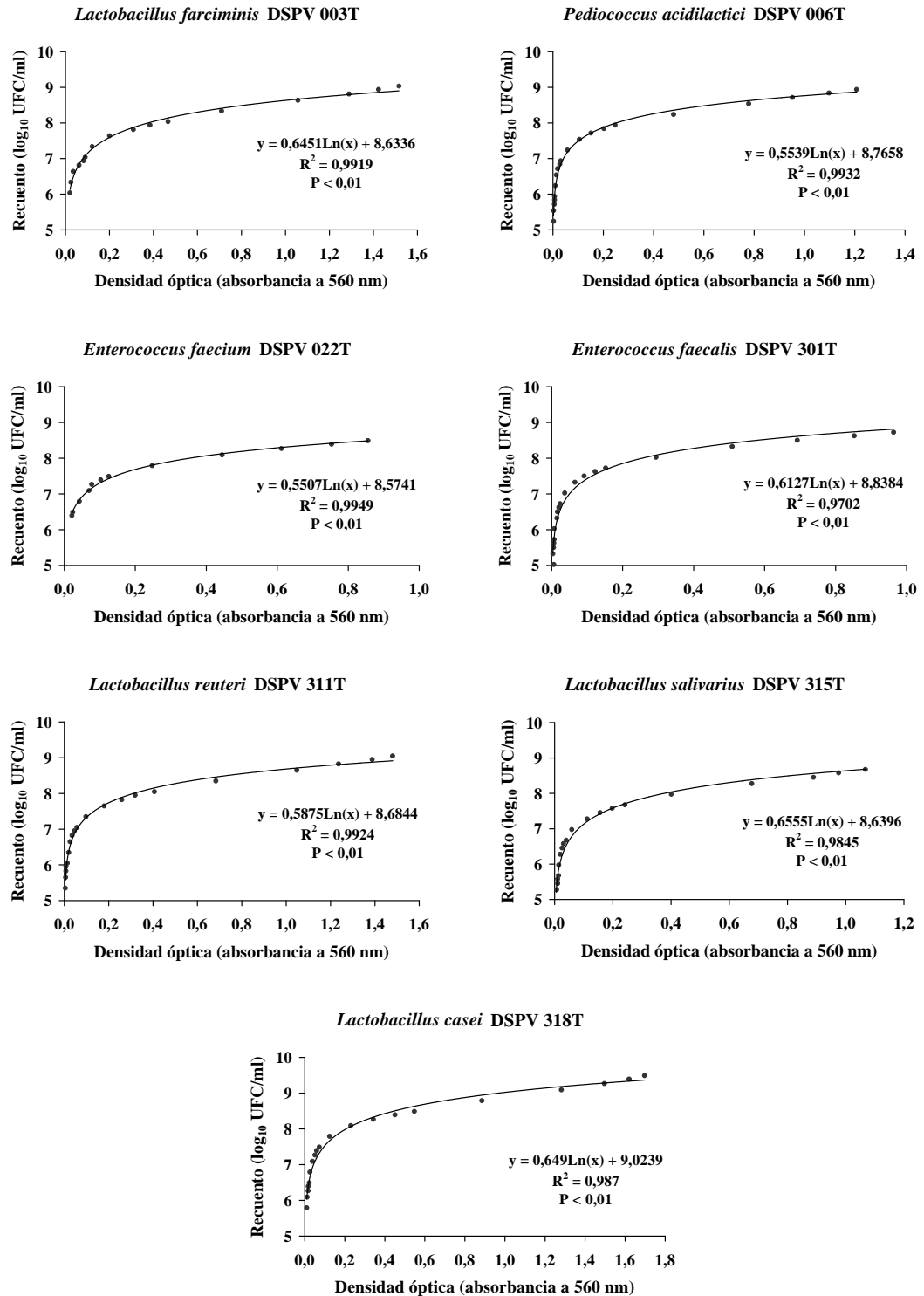


Tabla 5. Ensayos de agregación, coagregación, hidrofobicidad, tolerancia a jugos gástricos simulados y de crecimiento en bilis bovina de las bacterias ácido lácticas indígenas estudiadas.

	Coagregación ²		Crecimiento en bilis ⁴					Tolerancia a JGS ⁵	
	Agregación ¹	Hidrofobicidad ³	0,3 %	0,5 %	1,0 %	pH 6,5	pH 3,0		
<i>Lactobacillus farciminis</i> DSPV 003T	-	-	5,49 %	0,08	0,06	0,14	0,11	1,89	
<i>Pediococcus acidilactici</i> DSPV 006T	-	-	2,83 %	0,34	0,33	0,27	-0,09	1,48	
<i>Enterococcus faecium</i> DSPV 022T	-	-	14,20 %	0,07	0,00	-0,03	0,04	0,79	
<i>Enterococcus faecalis</i> DSPV 301T	-	-	11,39 %	0,07	-0,03	-0,02	0,08	0,84	
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSPV 311T	-	-	15,71 %	0,22	0,31	0,06	-0,03	1,76	
<i>Lactobacillus salivarius</i> DSPV 315T	+	-	13,83 %	0,00	-0,05	-0,05	0,10	1,42	
<i>Lactobacillus casei</i> DSPV 318T	-	-	6,89 %	0,17	0,22	0,22	0,14	0,69	

1: (-) agregación bacteriana negativa; (+) agregación bacteriana positiva.

2: (-) coagregación bacteriana negativa; (+) coagregación bacteriana positiva.

3: porcentaje de hidrofobicidad y su resultado equivalente expresado en Log₁₀ UFC/ml retenidos en la fase no acuosa.

4: Disminución del crecimiento comparado con el desarrollo estándar sin bilis (transformados a Log₁₀ UFC/ml).

5: Disminución entre los recuentos de células viables a tiempos 0 y 3 h (Log₁₀ UFC/ml).

IV.1.5. Prueba de agregación y coagregación

Sólo una cepa, *L. salivarius* DSPV 315T, fue capaz de autoagregar (tabla 5).

Tabla 6. Detección de actividad inhibitoria e interacción entre bacterias ácido lácticas indígenas.

		Cepa objetivo																	
		<i>Lactobacillus farciminis</i> DSPV 003T	<i>Pediococcus acidilactici</i> DSPV 006T	<i>Enterococcus faecium</i> DSPV 022T	<i>Enterococcus faecalis</i> DSPV 301T	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSPV 311T	<i>Lactobacillus salivarius</i> DSPV 315T	<i>Lactobacillus casei</i> DSPV 318T	<i>Lactobacillus sake</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T							
Cepa productora	ELC pH 5,8	<i>Lactobacillus farciminis</i> DSPV 003T	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		<i>Pediococcus acidilactici</i> DSPV 006T	-	■	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
		<i>Enterococcus faecium</i> DSPV 022T	-	-	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		<i>Enterococcus faecalis</i> DSPV 301T	-	-	-	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		<i>Lactobacillus reuteri</i> DSPV 311T	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		<i>Lactobacillus salivarius</i> DSPV 315T	-	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		<i>Lactobacillus casei</i> DSPV 318T	-	-	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		<i>Lactococcus lactis</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	ELC ¹ pH 6,5	<i>Lactobacillus farciminis</i> DSPV 003T	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		<i>Pediococcus acidilactici</i> DSPV 006T	-	■	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
		<i>Enterococcus faecium</i> DSPV 022T	-	-	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		<i>Enterococcus faecalis</i> DSPV 301T	-	-	-	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		<i>Lactobacillus reuteri</i> DSPV 311T	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		<i>Lactobacillus salivarius</i> DSPV 315T	-	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		<i>Lactobacillus casei</i> DSPV 318T	-	-	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		<i>Lactococcus lactis</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

¹: Extracto libre de células. Sobrenadante del cultivo.

(-) Inhibición negativa del crecimiento, (+) Inhibición positiva del crecimiento.

IV.1.6. Sustancias antimicrobianas

Pediococcus acidilactici DSPV 006T produjo una sustancia capaz de inhibir microorganismos de los géneros *Pseudomonas* y *Enterococcus*. Este hecho impide la incorporación conjunta de las cepas indígenas de los géneros *Pediococcus* y *Enterococcus* en un mismo inóculo multiespecie. Ninguna cepa fue capaz de inhibir *Escherichia coli* o *Salmonella dublin* bajo las condiciones probadas (tabla 6).

IV.2. Propiedades “*in vivo*” de BAL de origen bovino. Colonización microbiana, evolución de la microflora, comportamiento del peso y la conversión alimenticia en ratones (*Mus musculus*)

IV.2.1. Performance de crecimiento

La tabla 7 presenta el peso de los animales de ambos grupos (G-C y G-BAL) a lo largo del experimento, la conversión alimenticia (consumo de alimento del grupo en g/diferencia de peso vivo del grupo en g) cada 72 h y el CIE.

La conversión alimenticia mostró valores muy dispares en ambos grupos. Este índice se vio afectado por la variabilidad individual del aumento de peso de los ratones, lo cual provocó que ante variaciones muy pequeñas en el peso, a pesar de mantener los niveles de consumo, la conversión alcanzara valores muy elevados. No resultaron significativas ($P > 0,05$) las diferencias entre los grupos.

El CIE en ambos grupos se mantuvo entre 3,7 y 5,2 g a lo largo de toda la experiencia, siendo menor al inicio de la prueba y aumentando a medida que los ratones crecían. No existieron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los grupos.

Tabla 7. Performance de crecimiento en los ratones del grupo control (G-C) y del grupo tratado (G-BAL).

Día de experimento ¹	G-C			G-BAL		
	Peso ² (g)	Conversión alimenticia ³	CIE ⁴ (g)	Peso ² (g)	Conversión alimenticia ³	CIE ⁴ (g)
-6	20,21 ± 4,97		3,8	20,25 ± 5,40		3,7
-3	23,52 ± 5,18	4,20		23,60 ± 5,57	4,46	
1	26,84 ± 4,93		9,46	26,52 ± 5,48		6,94
5	28,30 ± 4,95	39,81		28,22 ± 5,32	8,41	
9	29,25 ± 5,35		11,75	29,49 ± 5,16		11,96
13	29,47 ± 5,68	18,70		30,06 ± 5,63	118,64	
17	29,92 ± 5,48		7,63	30,99 ± 6,45		32,02
21	30,84 ± 5,49	213,64		31,58 ± 6,23	27,24	
25	30,73 ± 5,96		64,39	31,41 ± 7,04		31,07
29	31,34 ± 7,22	24,51		33,80 ± 5,13	105,58	

¹Los valores negativos corresponden a los días previos a la administración del inóculo. Día 1: primera inoculación.

²Los valores corresponden a la media del lote ± su desviación estándar.

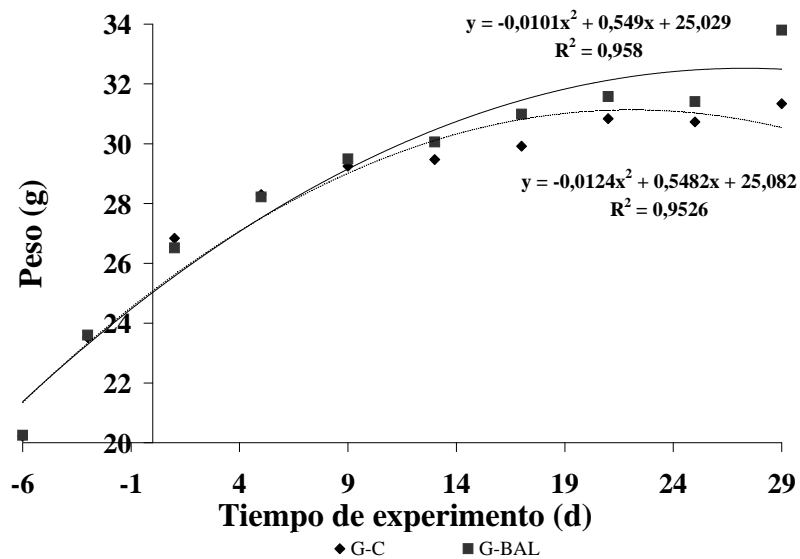
³Conversión alimenticia: consumo de alimento del grupo en g/diferencia de peso vivo del grupo en g, determinado cada 72 h. Los valores representan la media aritmética del lote.

⁴CIE: Consumo individual estimado (consumo de alimentos del grupo/número de individuos). Los valores representan la media aritmética del lote.

La figura 2 muestra la evolución de los pesos de los ratones del G-C y del G-BAL a lo largo del período de estudio. Los valores indicados para el tiempo -6 y -3 corresponden a las determinaciones de los pesos realizadas antes de comenzar a administrar el inóculo a los ratones del G-BAL. El día 1 corresponde al inicio de dicha administración. En la gráfica se puede observar que, en ambos grupos, partiendo de valores similares ($P > 0,05$), los pesos aumentaron a lo largo de la experiencia. Los

valores de las dos curvas ajustaron de manera significativa ($P < 0,05$) a la forma polinómica. El incremento de peso fue mayor en los primeros días y se fue estabilizando hacia el final del estudio.

Figura 2. Evolución de los pesos en los ratones del grupo control (G-C) y del grupo tratado (G-BAL) a lo largo del período de estudio. Los valores representan la media aritmética del lote.



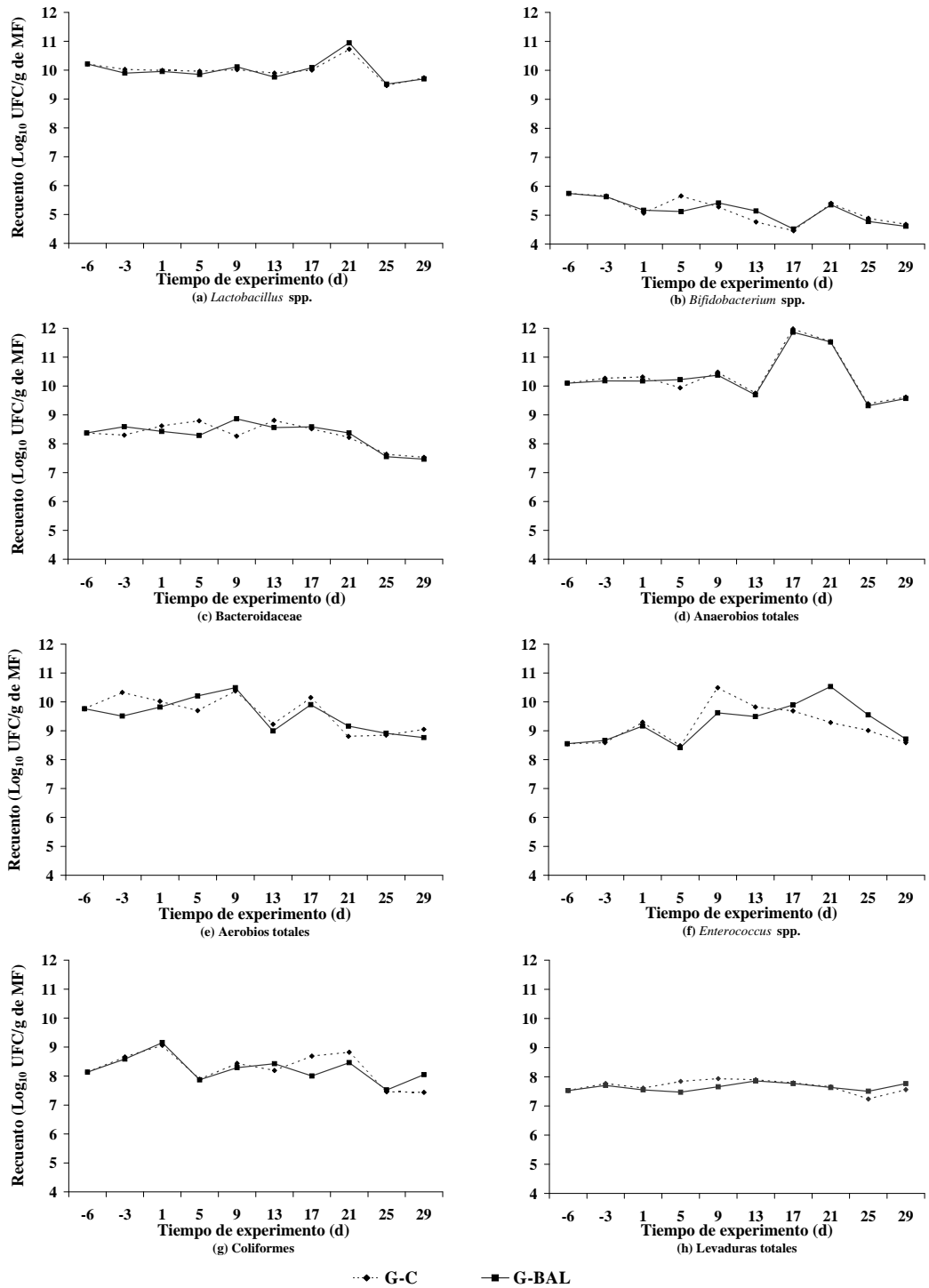
IV.2.2. Morbilidad y mortalidad

No se observaron signos de enfermedad ni muertes en los individuos de los dos lotes que formaron parte del experimento.

IV.2.3. Análisis microbiológico de las muestras fecales

La figura 3 muestra los recuentos de las distintas especies microbianas estudiadas en la materia fecal de los ratones en ambos grupos experimentales. El análisis de los resultados demostró que no existieron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los grupos experimentales para los distintos microorganismos.

Figura 3. Recuentos de los componentes de la microbiota fecal en ambos grupos experimentales (G-C y G-BAL). El inóculo fue administrado diariamente entre los días 1-3 y en días alternos entre los días 5-11 en una cantidad de 10^9 UFC por animal.



Los recuentos de microorganismos aerobios totales oscilaron entre 8,77 y 10,49 \log_{10} UFC/g, mientras que el rango para los anaerobios totales fue de 9,32 a 11,98 \log_{10} UFC/g.

Los *Lactobacillus* spp. se encontraron en valores que oscilaron entre 9,47 y 10,94 \log_{10} UFC/g y se mantuvieron estables durante toda la experiencia (Figura 3).

Los recuentos correspondientes a *Bifidobacterium* spp. disminuyeron a lo largo del experimento, oscilando entre 5,75 y 4,46 \log_{10} UFC/g.

Los *Bacteroides* esculina negativos se encontraban en mayor proporción que los esculina positivos (grupo de *Bacteroides fragilis*) durante la experiencia.

Los valores correspondientes a las levaduras oscilaron en los 7 \log_{10} UFC/g presentando una escasa variabilidad a lo largo del experimento.

Los recuentos de enterococos oscilaron entre 8,41 y 10,53 \log_{10} UFC/g en ambos grupos mientras que los valores de coliformes estuvieron entre los 7,44 y los 9,16 \log_{10} UFC/g.

A pesar de la variación representada por algunos de los valores extremos expuestos, la distribución de los recuentos a lo largo del estudio mostró la estabilidad que presentó la microbiota intestinal de los ratones (figura 3), observándose oscilaciones comprendidas en un rango de 1,5 \log_{10} UFC.

IV.2.4. Recuperación de microorganismos

Los recuentos, en placas de agar MRS con rifampicina, efectuados en el día previo al inicio del tratamiento con el inóculo mostraron la ausencia de *Lactobacillus casei* DSPV 318T en el tracto gastrointestinal y en la materia fecal de ambos grupos en estudio.

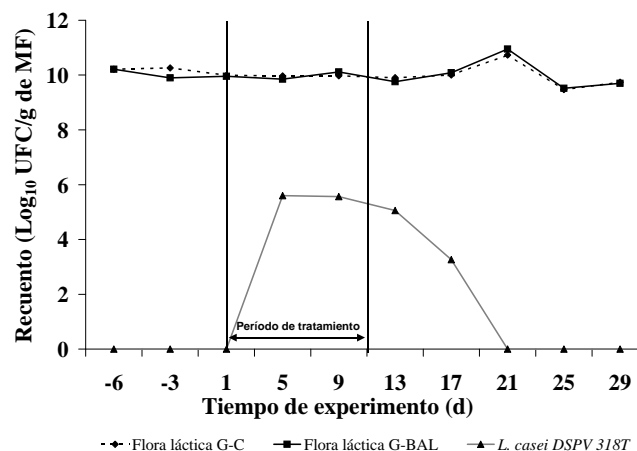
a) A partir del ID.

Al sexto día de tratamiento, *L. casei* DSPV 318T se encontró en cantidades de 6,44 \log_{10} UFC/g sobre una población de *Lactobacillus* spp. totales de 10 \log_{10} UFC/g y alcanzó un valor de 4,22 \log_{10} UFC/g 3 días después de finalizada la administración del inóculo.

b) A partir de la MF.

La figura 4 muestra la evolución de la microbiota láctica de los ratones tratados y no tratados con el inóculo de bacterias ácido lácticas y la permanencia de *L. casei* DSPV 318T en materia fecal. La figura muestra que al 4^{to} y al 8^{vo} día, del inicio de la administración de la cepa en estudio, se encontraron 5,6 y 5,56 \log_{10} UFC/g de materia fecal respectivamente. Estos valores representan la máxima concentración alcanzada por el microorganismo bajo las condiciones de administración utilizadas durante el estudio. Por otra parte, a partir del 13^{er} día se observó una disminución de la concentración del microorganismo y a los 21 días ya no fue encontrado en la MF. Es decir, que a los 11 días después de finalizado el tratamiento *L. casei* DSPV 318T no era detectable en MF.

Figura 4. Flora láctica de los ratones tratados y no tratados con el inóculo de bacterias ácido lácticas y permanencia de *L. casei* DSPV 318T en materia fecal.



IV.3. Propiedades “*in vivo*” de BAL de origen bovino. Desafío experimental frente a *Salmonella dublin* DSPV595T en ratones (*Mus musculus*)

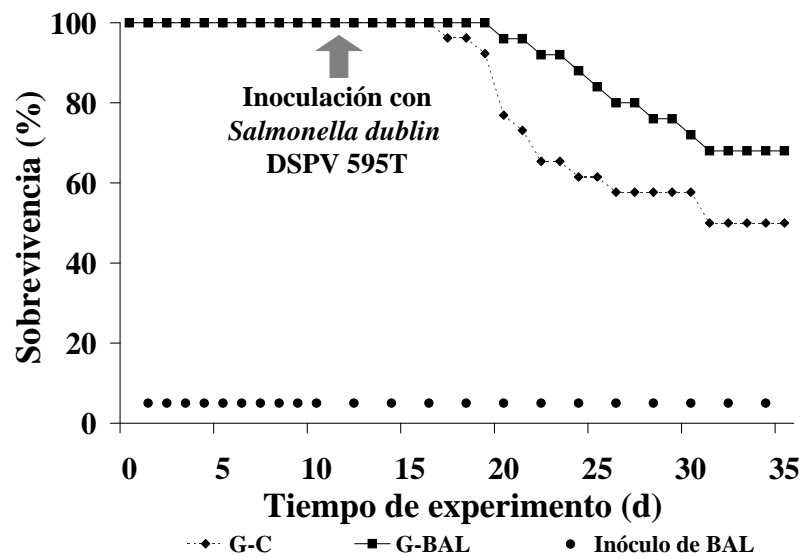
IV.3.1. Efecto del tratamiento con bacterias ácido lácticas sobre la supervivencia de los ratones

Los ratones inoculados con las bacterias ácido lácticas (G-BAL) mostraron un mayor porcentaje de supervivencia después de la infección oral con *Salmonella dublin* DSPV 595T que el grupo no inoculado ($P < 0,05$). La figura 5 muestra los porcentajes de supervivencia en ambos grupos. En dicha gráfica se observa que en el G-C la primera muerte ocurrió en el día 17 de iniciado el experimento, es decir 6 días después de administrado el patógeno. En el G-BAL las muertes comenzaron recién en el día 20 del experimento, es decir 9 días después de la inoculación con *Salmonella dublin* DSPV 595T, o sea 3 días después que el G-C.

Por otra parte, en dicha figura se aprecia una caída brusca del porcentaje de supervivencia en el G-C como consecuencia del elevado número de muertes que se produjeron entre los días 18 y 25 del experimento. En esta etapa del estudio se observó la mayor diferencia ($P < 0,01$) entre los porcentajes de supervivencia de ambos grupos, alcanzando valores del 92 % para el G-BAL y del 65,4 % para el G-C.

A partir del día 31 de la experiencia y por el término de los 4 días siguientes no se observaron muertes en ninguno de los dos grupos, alcanzando al 68 % la supervivencia del G-BAL y sólo del 50 % para el G-C.

Figura 5. Supervivencia de los ratones convencionales inoculados (G-BAL) y no inoculados (G-C) con bacterias ácido lácticas e infectados oralmente con *Salmonella dublin* DSPV 595T.



IV.3.2. Efecto del tratamiento con bacterias ácido lácticas sobre la morbilidad de los ratones

Los ratones del G-BAL mostraron, al final de la experiencia, un menor porcentaje de morbilidad acumulada después de la administración oral con *Salmonella dublin* DSPV 595T que el G-C ($P < 0,05$). La figura 6 muestra los porcentajes de morbilidad acumulada de los dos grupos en estudio.

En dicha figura se observa que 48 horas después de la administración oral de *Salmonella dublin* DSPV 595T se presentaron ratones, pertenecientes al G-C, con signos de enfermedad. En el G-BAL los primeros individuos que manifestaron signos de enfermedad lo hicieron recién a las 96 horas post-administración del patógeno.

En esa figura también se observa que entre los días 11 y 18 de iniciado el experimento se produjo un pico de morbilidad en los dos lotes en estudio, alcanzando al 64 % de los animales del G-C y al 40 % en los del G-BAL.

Entre los días 18 y 29 del estudio se produjeron la mayoría de las muertes debidas al patógeno en ambos grupos en estudio (figura 5), sin que se viera incrementado el número de animales con signos de enfermedad.

Al final de la tercera semana post-administración del patógeno se observó una diferencia significativa ($P < 0,01$) entre los porcentajes de morbilidad de ambos grupos en estudio, presentando el G-C un 85 % de morbilidad, frente al 53 % del G-BAL.

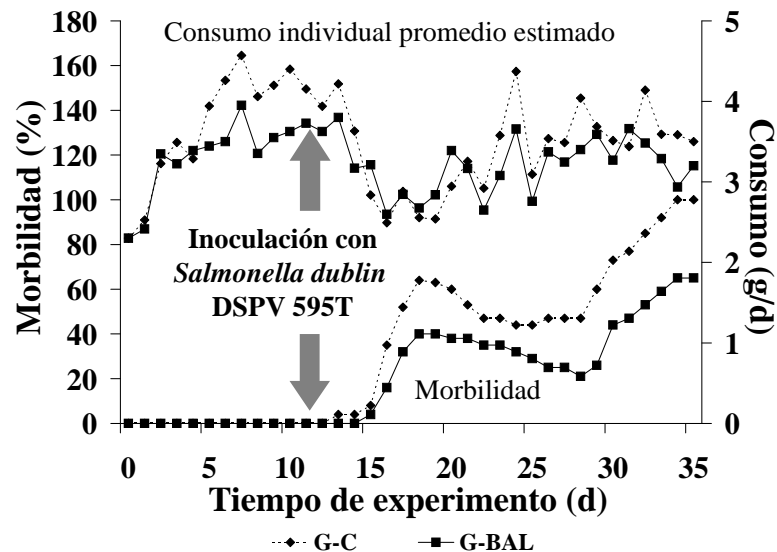
En la figura 6 se observa que a partir del día 29 se produjo un incremento de la morbilidad en ambos grupos en estudio, resultando superior en los animales del G-C, grupo que alcanzó el 100 % de morbilidad al final del estudio, frente al 65 % del G-BAL. La diferencia entre la morbilidad de ambos grupos se fue incrementando hasta el día 18, momento en que se produjo la mayor diferencia ($P < 0,01$), alcanzando un valor del 24 %.

IV.3.3. Efecto de *Salmonella dublin* DSPV 595T sobre el consumo de alimentos

El consumo de alimentos por parte de los ratones se modificó después de la administración de *Salmonella dublin* DSPV 595T. En la figura 6 se observa que a partir del día 13, es decir 48 horas después de la administración de dicho patógeno, se produjo un marcado descenso en el consumo de alimentos en ambos grupos, pero fue mayor en el G-C. Resulta evidente, además, que entre los días 16 y 22 del experimento se alcanzaron los menores valores de consumo de alimentos en coincidencia con un evidente aumento de la morbilidad. La diferencia existente, en este momento, entre la

morbilidad de los grupos no se evidencia para el consumo individual estimado. Esto puede ser debido a que esa última variable fue calculada a partir de los valores de consumo de los lotes y, por lo tanto, la disminución real del consumo individual de los animales enfermos quedó enmascarada con el consumo de los animales que aun estaban sanos.

Figura 6. Morbilidad acumulada y consumo de alimento diario promedio estimado de los ratones convencionales inoculados (G-BAL) y no inoculados (G-C) con las bacterias ácido lácticas (BAL) e infectados oralmente con *Salmonella dublin* DSPV 595T.

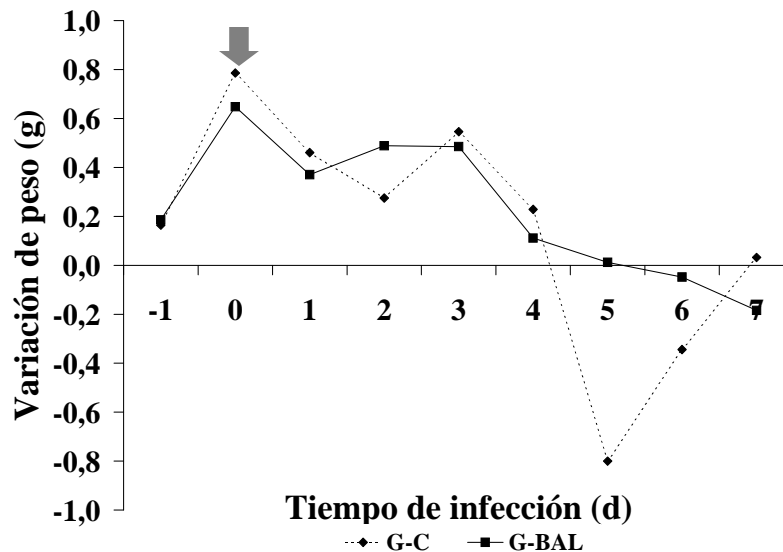


IV.3.4. Efecto de *Salmonella dublin* DSPV 595T sobre el aumento del peso de los ratones

La figura 7 muestra la evolución del peso de los ratones de los dos grupos en estudio durante los 7 días posteriores a la inoculación con el patógeno. En dicha gráfica se observa que entre los días 4 y 7 post-administración se produjo una pérdida de peso en

los animales de ambos grupos, no obstante es más pronunciada en el G-C que en los animales del G-BAL. En el día 5 la diferencia entre los pesos de ambos grupos fue significativa ($P < 0,01$). Esto coincide con la etapa de la experiencia en la que el consumo de alimentos alcanzó los valores más bajos y se produjo una escalada de la morbilidad (figura 6).

Figura 7. Variación del peso vivo promedio de los ratones convencionales, inoculados (G-BAL) y no inoculados (G-C) con las bacterias ácido lácticas (BAL) e infectados oralmente con *Salmonella dublin* DSPV 595T, durante los primeros 7 días posteriores a la inoculación del patógeno. La flecha indica la inoculación con el patógeno.

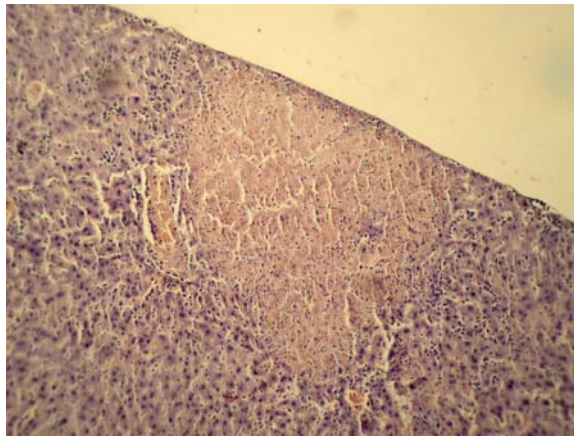


IV.3.5. Verificación de las lesiones ocasionadas por *Salmonella dublin* DSPV 595T sobre los tejidos

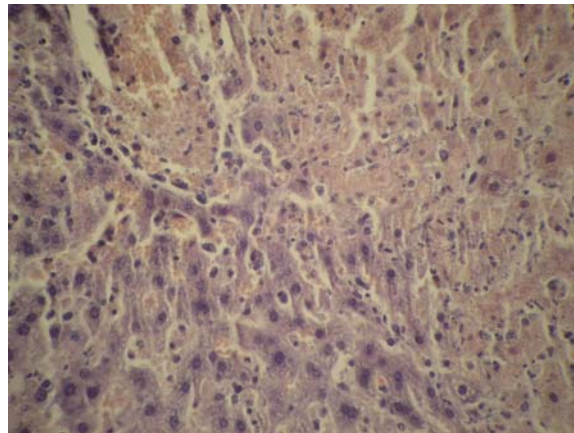
El análisis histopatológico demostró la presencia de lesiones de salmonelosis en los tejidos de los animales que murieron durante la experiencia y confirmó así la causa de la muerte de éstos. Por el contrario, no se observaron lesiones en los tejidos de los

animales que fueron sacrificados para realizar las necropsias programadas previo a la administración del patógeno. En la figura 8 se muestran lesiones típicas de salmonelosis en hígado y bazo de algunos de los animales muertos durante el transcurso del experimento y secciones histopatológicas sin lesión aparente de algunos de los animales que sobrevivieron al desafío.

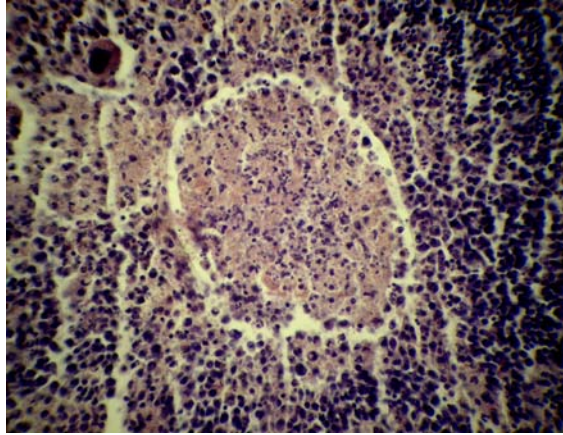
Figura 8. Secciones histopatológicas de hígado (a y b) y bazo (c) de los ratones muertos de salmonelosis. Tinción: hematoxilina-eosina. Secciones de hígado (d) y bazo (e) sin lesión aparente al final de experimento.



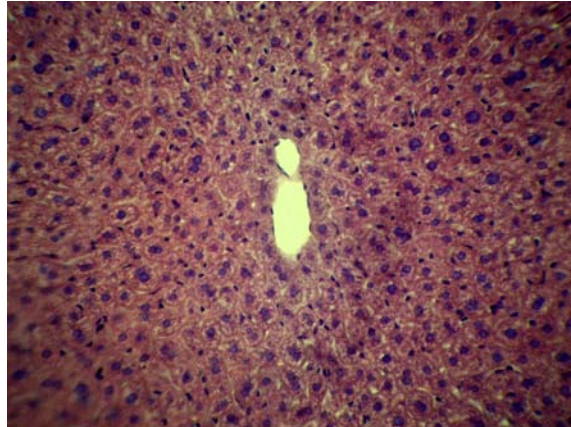
a) Nódulo paratifoideo subcapsular en hígado mostrando necrosis de coagulación focal con infiltración de polimorfonucleares (PMN). Vista panorámica. 100X.



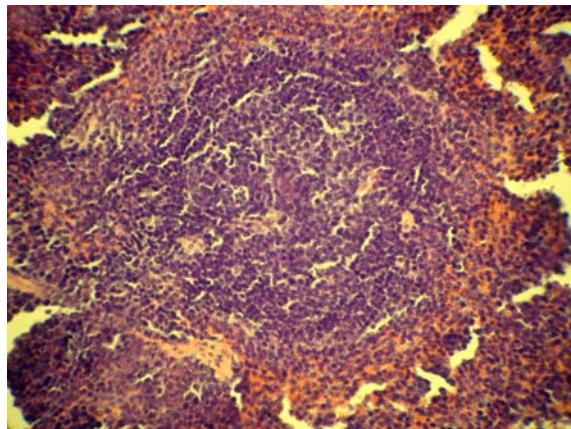
b) Detalle de la periferia del centro de necrosis de coagulación con infiltración de PMN en hígado. 400X.



c) Nódulo paratifoideo en la pulpa roja del bazo. Necrosis de coagulación con infiltración de PMN. 400X.



d) Hígado murino normal al final de experimento. 400X.



e) Bazo murino normal. 400X

IV.3.6. Necropsias programadas (inicio de experimento)

No se encontraron diferencias macroscópicas ni histopatológicas en los dos grupos estudiados. Ninguno de los animales tenía lesiones compatibles con salmonelosis.

IV.3.7. Necropsias no programadas (muerte espontánea post-inoculación con *Salmonella dublin* DSPV 595T)

Durante la necropsia, en ambos grupos experimentales, 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.

Del total de machos del G-C, un 42,8% murieron espontáneamente y todos ellos presentaban lesiones típicas de salmonelosis. En el caso de las hembras del mismo grupo, el 50% murieron espontáneamente y sólo 1 de ellas (8,3%) no presentaba lesiones patognomónicas (nódulos paratifoideos) (Tabla 8) a pesar de tener evidentes lesiones histopatológicas a nivel intestinal. Si bien no se pudo establecer la causa de la muerte del individuo que murió espontáneamente sin evidenciar lesiones típicas, resulta razonable pensar que podría estar relacionada con una presentación sobreaguda de la enfermedad. Por otra parte, los resultados muestran que la mortandad en este período no presentó diferencias entre los sexos ($P > 0,05$).

En el G-BAL, el 46,7% de los machos y el 10% de las hembras murieron espontáneamente ($P < 0,05$) y todos presentaron lesiones típicas (Tabla 8). Estos resultados muestran una clara diferencia entre los sexos cuando el inóculo fue

suministrado y está evidenciando que las hembras resistieron mejor a la agresión del patógeno. Si se compara este resultado con lo ocurrido en el G-C puede observarse que de los 4 lotes de ratones estudiados, el que mejor se comportó frente al patógeno fue el de las hembras que recibieron el inóculo.

En la tabla 8 se observan, además, diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las proporciones de las hembras muertas espontáneamente en el G-C y G-BAL.

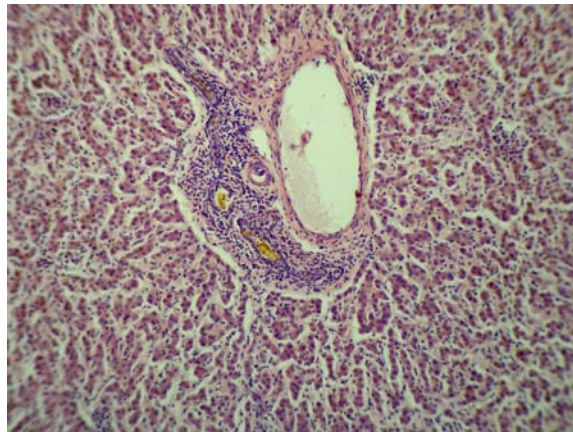
Tabla 8. Distribución por sexo de lesiones micromorfológicas patognomónicas de salmonelosis en los animales utilizados en el experimento.

Necropsias	Grupos	Con lesiones			Sin lesiones			Totales
		Machos	Hembras	Total	Machos	Hembras	Total	
Programadas (inicio experimento)	G-C	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	100,0%	100,0%	6
	G-BAL	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	100,0%	100,0%	6
Muertes espontáneas	G-C	42,8% ^a	50,0% ^a	46,2%	0,0%	8,3%	8,3%	13 ¹
	G-BAL	46,7% ^a	10,0% ^b	32,0%	0,0%	0,0%	0,0%	8 ²
Programadas (final experimento)	G-C	37,5%	20,0%	30,8	62,5%	80,0%	69,2%	13
	G-BAL	50,0%	22,2%	35,3	50,0%	77,8%	64,7%	17
Totales		20	10		15	18		63
				30			33	

Letras y números diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

En hígado se pudo observar que la mayoría de los animales presentaron colangiohepatitis mononuclear en los espacios porta con estasis canalicular e infiltración mixta intrasinusoidal (figura 9).

Figura 9. Colangiohepatitis con infiltración periportal de mononucleares y estasis biliar intracanalicular (Hígado; H-E x 40).



Los nódulos paratifoideos se ubicaron sin una localización estable en la estructura del lobulillo tradicional. Estos nódulos son el resultado del reclutamiento de los macrófagos y los PMN (figura 10). Finalmente se forman centros de necrosis de coagulación focal (figura 11) como consecuencia de la muerte de los fagocitos.

Figura 10. Formación inicial de un nódulo paratifoideo con reclutamiento de PMN y macrófagos con escasa necrosis de coagulación (Hígado; H-E x 400).

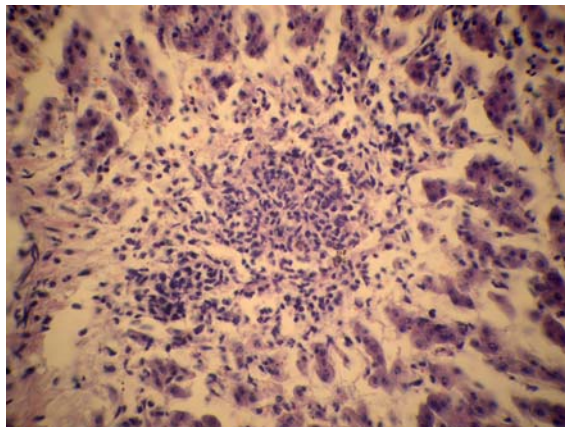
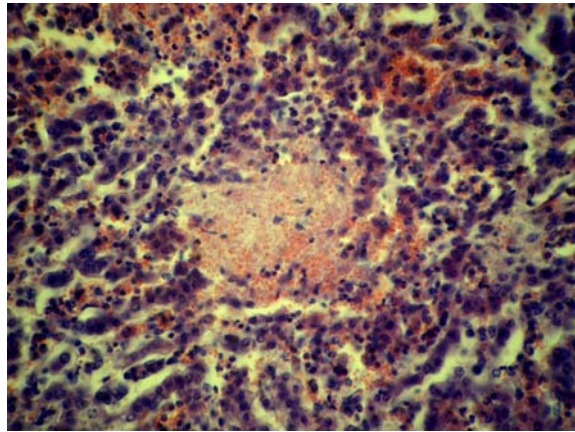


Figura 11. Nódulo paratifoideo totalmente conformado con amplia necrosis de coagulación (Hígado; H-E x 400).



En bazo, en la mayoría de los casos, se observó un severo proceso inflamatorio agudo, en ocasiones de tipo hemorrágico, con la presencia de nódulos paratifoideos (figura 12 y 13). Este proceso es consecuencia de la bacteriemia y del reclutamiento de macrófagos y PMN en la pulpa roja del órgano.

Figura 12. Nódulo paratifoideo inicial en la pulpa roja (Bazo; H-E x 400).

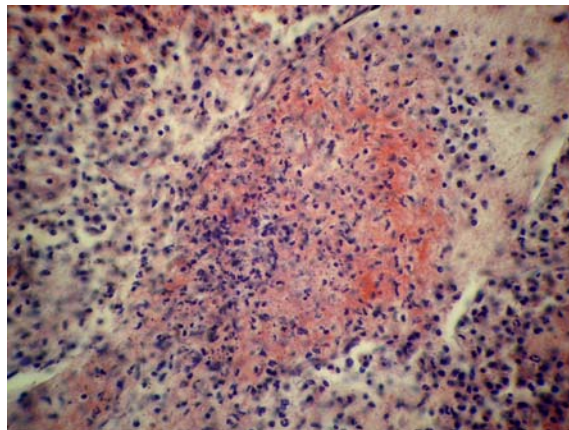
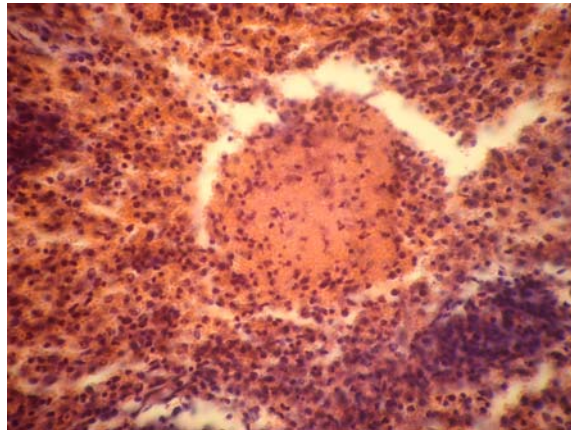
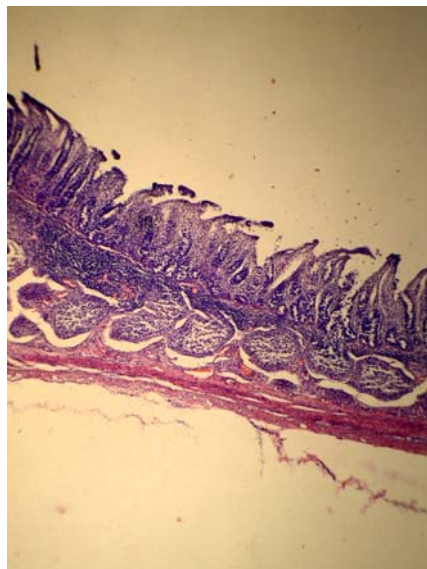


Figura 13. Nódulo paratifoideo totalmente conformado con un entorno de pulpa roja con esplenitis hemorrágica (Bazo; H-E x 400).



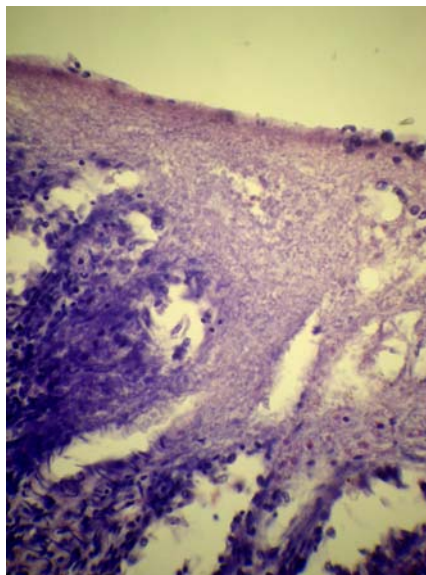
En yeyuno, en aquellos animales que murieron al principio de la etapa de muertes espontáneas, se observó una enteritis con necrosis de las glándulas y vellosidades junto a un intento regenerativo del fondo glandular (figura 14).

Figura 14. Enteritis con atrofia de las vellosidades, dilatación del quilífero central, infiltración mononuclear de la lámina propia e hiperplasia de la placa de Peyer (Yeyuno; H-E x 40).



Sin embargo, aquellos que murieron al final de la etapa de muertes espontáneas presentaban enteritis fibrinonecrótica, infiltración de la lámina propia y conservación de las vellosidades y glándulas (figura 15).

Figura 15. Enteritis fibrinonecrótica con ausencia de vellosidades y capa de fibrina con restos celulares (Yeyuno; H-E x 400).



IV.3.8. Necropsias programadas (final de experimento)

Entre los días 31 y 35 de la experiencia no se produjeron muertes espontáneas, por lo cual el día 35 se sacrificaron los 30 animales restantes (13 del G-C y 17 del G-BAL). El análisis histopatológico realizado a partir de estas necropsias mostró que el 80% de las hembras del G-C y el 77,8% de las hembras del G-BAL finalizaron el experimento sin lesiones típicas mientras que en los machos sólo el 62,5 % del G-C y el 50% del G-BAL no tenían lesiones típicas (Tabla 8).

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

V. 1. Estudio “*in vitro*” de las BAL de origen bovino

V.1.1. Cuantificación del crecimiento

Los resultados obtenidos y el modelo utilizado permitieron cuantificar las cepas estudiadas. La capacidad de crecimiento de un microorganismo es una característica que adquiere mucha importancia cuando se lo debe producir a escala industrial. Aquellos que son capaces de generar mayor cantidad de biomasa por unidad de tiempo y con bajos requerimientos nutricionales son los que reúnen ventajas competitivas frente a otros porque podrán obtenerse a un menor costo. Esta propiedad, al mismo tiempo, resulta beneficiosa al incorporarlo al animal porque le permitirá predominar sobre el resto de la microbiota indígena.

V.1.2. Tolerancia a jugos gástricos simulados (JGS) y crecimiento en bilis

La tolerancia a los ácidos es una propiedad que cualquier cepa debería poseer para sobrevivir durante el pasaje gástrico y, de esa manera, arribar al intestino en mayor número y en mejores condiciones. Por este motivo, esta prueba constituye un importante criterio de selección de las cepas probióticas (Charteris *et al.*, 1998; Salminen *et al.*, 1998a).

Los componentes del alimento y los constituyentes no ácidos de la secreción gástrica podrían tener un efecto protector en la viabilidad de las cepas durante su exposición a las condiciones ácidas del estómago, que no son tenidos en cuenta en la prueba *in vitro* realizada. Esto hace atractivo que las cepas sean sometidas a pruebas *in vivo* para evaluar su comportamiento en esas condiciones. Por otra parte, aunque la tolerancia de las cepas a los ácidos puede ser mejorada por algunos protectores naturales

que están presentes en los alimentos, resulta interesante conocer el comportamiento de las cepas en una condición extrema, es decir sin este tipo de protectores, porque la tolerancia a la misma implica una mayor capacidad de los microorganismos para sobrevivir.

La resistencia a la bilis es una característica importante que permite a los *Lactobacillus* spp sobrevivir y crecer en el tracto intestinal. Cuando se administran a los terneros cepas con baja y alta tolerancia a la bilis, la cepa resistente causa mayor incremento en el número de lactobacilli facultativos que la que posee menor tolerancia (Nousiainen & Setälä, 1998). Esta prueba es indicativa de la capacidad de las cepas para sobrevivir a la toxicidad que la bilis ejerce durante el pasaje a través del intestino delgado, e incrementa el potencial de estos microorganismos para ser incorporados en la dieta de los terneros.

Las tres cepas seleccionadas fueron resistentes a la bilis bovina y a los jugos gástricos simulados, mostrando, además, una alta capacidad de sobrevivida cuando fueron expuestas a soluciones gástricas de pH tan bajo como 3. Este comportamiento *in vitro* hace que el inóculo sea interesante porque estaría demostrando su capacidad para sobrevivir a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal. Esta propiedad resulta más importante aún si se tiene en cuenta que el efecto se observó a partir de pruebas *in vitro*, las cuales se realizaron sin contar con el efecto protector normal que brindan los propios componentes del alimento que el animal ingiere, junto con el suplemento probiótico, en condiciones *in vivo*.

V.1.3. Pruebas de hidrofobicidad, agregación y coagregación

Otra propiedad importante de los probióticos que debe ser evaluada es su capacidad para permanecer y colonizar el tracto gastrointestinal (Casas *et al.*, 1998; Salminen *et*

al., 1998a). En los pasos iniciales de la adhesión microbiana existe una interacción hidrofóbica entre la célula bacteriana y el sustrato de contacto (Kiely & Olson, 2000). De todas formas, un valor bajo de hidrofobicidad no indica que la cepa tenga menores posibilidades de adherirse al epitelio intestinal ya que los dominios hidrofílicos podrían también estar implicados en el proceso de adhesión (Savage, 1992). Los mecanismos de adhesión pueden requerir la participación de distintos constituyentes de superficie que interactúan de manera secuencial para vencer las fuerzas repulsivas (Gusils *et al.*, 2002). La capacidad de agregación es una característica que puede utilizarse para iniciar el estudio de las interacciones microbianas. Hay una asociación entre la habilidad de los lactobacilos para adherirse al epitelio intestinal, la actividad de agregación y la hidrofobicidad de su superficie (Wadstrom *et al.*, 1987).

Una de las cepas que integran el inóculo estudiado fue capaz de autoagregar, por lo tanto, a pesar de no haber existido coagregación frente a los patógenos utilizados, ese comportamiento la distingue frente a otras por su potencial actividad frente a microorganismos patógenos formadores de biofilm.

Además, a pesar de que las cepas estudiadas mostraron una superficie celular extremadamente hidrofílica, el inóculo estudiado fue capaz de colonizar el tracto intestinal de los ratones y permanecer en él sin afectar el consumo de alimentos de los animales tratados (Frizzo *et al.*, 2004b).

V.1.4. Sustancias antimicrobianas

La capacidad para producir sustancias con actividad antibacteriana es una propiedad importante de los microorganismos probióticos (Ouwehand, 1998) porque juega un rol significativo en su habilidad para competir con la microbiota residente y modificarla benéficamente.

Las propiedades antagónicas que ocurren en el intestino entre los microorganismos que lo pueblan pueden ocurrir por diversos motivos: ante el descenso del pH del lumen a causa de la producción de ácidos orgánicos de cadena corta, al competir por nutrientes específicos, al disminuir el potencia redox del ambiente intestinal y ante la producción de peróxido de hidrógeno y/o compuestos inhibitorios específicos como las bacteriocinas (Salminen *et al.*, 1998a; Dunne *et al.*, 1999). Si las BAL probióticas son metabólicamente activas durante su pasaje a través del intestino, es muy probable que se produzcan algunas de estas sustancias (Ouweland *et al.*, 1999).

Una de las bacterias integrantes del inóculo, *Pediococcus acidilactici* DSPV 006T, fue capaz de inhibir *in vitro* a microorganismos de los géneros *Pseudomonas* y *Enterococcus*. Tomando en consideración las condiciones de la prueba realizada para determinar la actividad inhibitoria (neutralización y tratamiento térmico del sobrenadante), podría descartarse el ácido láctico y el peróxido de hidrógeno como sustancias responsables de la inhibición. A pesar que la sustancia inhibidora producida por la cepa indígena podría ser similar a una bacteriocina, resulta necesario realizar otros ensayos para confirmar esta hipótesis.

V.2. Propiedades “*in vivo*” de BAL de origen bovino

V.2.1. Comportamiento del peso y la conversión alimenticia en ratones (*Mus musculus*), colonización microbiana y evolución de la microbiota

La evolución de los pesos de los ratones de ambos grupos durante el período de estudio mantuvo las características habituales para esa etapa de crecimiento y desarrollo de los animales. De acuerdo con lo observado en la figura 2, el aumento de peso fue continuo durante la primera etapa del experimento y se fue estabilizando hacia el final

de la experiencia. Este comportamiento es el habitual en el período que va desde el destete hasta que los animales alcanzan el peso de los adultos. Los aumentos de peso a intervalos semanales fueron similares a los informados por Dubos & Schaedler (1960) para ratones de cepa Swiss que también consumieron una dieta peleteada. Si bien no resultaron significativas ($P > 0,05$) las diferencias entre los pesos de los grupos a lo largo del estudio, la tendencia fue similar sólo hasta el día 10, momento a partir del cual se observó que el aumento de peso del G-BAL fue mayor que el del G-C (figura 2). Esta situación, en la cual la diferencia entre el peso de ambos grupos no pudo ser demostrada, podría estar relacionada con una dosis del inóculo escasa, un tiempo de administración insuficiente o una duración total del estudio menor al necesario para que las distintas tendencias se diferencien estadísticamente.

La microbiota intestinal indígena del ratón ha sido extensamente estudiada y es una comunidad microbiológica compleja que juega un importante rol en la nutrición y en la salud (Marcotte & Lavoie, 1996; Rolfe, 2000; Isolauri *et al.*, 2004). Es conocida como una barrera efectiva contra los microorganismos patógenos y, dentro de ella, las bacterias ácido lácticas juegan un papel importante por tener efectos benéficos sobre el hospedador (Tamura *et al.*, 2002). La colonización microbiana del tracto gastrointestinal de los ratones ocurre rápidamente luego del nacimiento.

Los anaerobios estrictos se convierten en los componentes predominantes de la flora intestinal del ratón alrededor del día 16 de vida, mientras que otras especies bacterianas alcanzan su nivel máximo mucho antes. Una vez que ellos se han establecido juegan un importante rol en la ecología intestinal, ejerciendo efectos profundos en las estructuras anatómicas del intestino del ratón, en sus funciones fisiológicas y en la microbiota. El grupo anaeróbico se mantiene en niveles extremadamente altos ($11 \log_{10}$ UFC/g de

contenido cecal) y constantes en el intestino grueso y ciego durante la vida del animal, formando parte de la flora autóctona (Lee *et al.*, 1971). El valor antes mencionado está muy próximo al promedio obtenido en esta experiencia para la población de anaerobios totales ($10,32 \log_{10}$ UFC/g), mientras que el promedio correspondiente a los recuentos de los microorganismos aerobios totales fue menor ($9,59 \log_{10}$ UFC/g). Este predominio de los anaerobios coincide con lo informado para ratones y otras especies animales (Tannock, 1977; Benno *et al.*, 1989; Tannock *et al.*, 2000; Draksler *et al.*, 2002) y es debido a las condiciones favorables (potencial redox bajo) que ofrece el intestino para el desarrollo de los mismos. Los anaerobios estrictos del intestino del ratón desempeñan un papel importante en la fisiología de este órgano y además controlan las poblaciones de otros miembros de la microflora. Ellos también parecen mantener el control de varias especies de bacterias intestinales interfiriendo en el crecimiento y la supervivencia de las mismas, en particular de los coliformes (Lee *et al.*, 1971). En ratones muy jóvenes, por ejemplo, las poblaciones de coliformes y enterococos persisten en niveles muy altos hasta aproximadamente la segunda semana de vida, pero luego caen precipitadamente cuando la población de anaerobios estrictos alcanza su máximo. Además, parecen jugar un papel importante y quizás esencial en el mantenimiento de las estructuras anatómicas y las funciones fisiológicas del intestino.

Los valores de *Bifidobacterium* spp. reportados en este estudio son inferiores a los encontrados por Yoshioka *et al.* (2005) y Kuda *et al.* (2004) pero superiores a los informados por Fukushima *et al.* (1999). Entre los componentes de la microbiota, se ha sugerido que las bifidobacterias desempeñan un importante papel en la formación de una barrera contra la colonización gastrointestinal de bacterias patógenas. Además de

las bifidobacterias, el género *Lactobacillus* spp tiene una función fundamental en el “efecto barrera” contra los patógenos (Liévin *et al.*, 2000).

En cuanto a la población de *Bacteroides* spp esculina positivos (grupo de *Bacteroides fragilis*) es de destacar que, durante toda la experiencia, los mismos se encontraron en menor cantidad que los esculina negativos, los cuales mostraron valores muy próximos a los reportados por Foo & Lee (1972), Tamura *et al.* (2002), Kuda *et al.* (2004) y Yoshioka *et al.* (2005). En los mamíferos y las aves, los microorganismos del género *Bacteroides* spp forman parte de una proporción significativa de la microflora total cultivable. *Bacteroides* spp. se encuentran en el tracto intestinal bajo, donde existe una gran población microbiana. Estos organismos crecen en partes no digeridas de alimentos, células epiteliales muertas y mucina. Además, están implicados en la degradación de polisacáridos complejos con la formación de ácidos grasos volátiles y proteína microbiana (Macy & Probst, 1979). Los hidratos de carbono utilizados por especies de *Bacteroides* para su crecimiento dentro del ciego del ratón podrían ser extraídos de componentes alimenticios que no sufrieron los procesos digestivos del hospedador y alcanzaron el intestino grueso (Tannock, 1977). El elevado número en el que se encuentran estos microorganismos sugiere que no son perjudiciales en estados normales. Sin embargo, cuando las condiciones dentro del ciego o colon no son completamente normales, los *Bacteroides* serían capaces de afectar al hospedador en una manera no beneficiosa. Por ejemplo, *Bacteroides* spp. intestinales son capaces de transferir la resistencia a antibióticos y convertir ciertos compuestos en cancerígenos (Macy & Probst, 1979). Hay pruebas clínicas y experimentales que establecen el papel de *Bacteroides* spp. como el patógeno oportunista anaerobio predominante, siendo *Bacteroides fragilis* el integrante del género que con mayor frecuencia se ha recuperado

a partir de material infeccioso y, lamentablemente, también el más resistente a agentes antimicrobianos. Las especies del género *Bacteroides* pueden contribuir de dos maneras al desarrollo de enfermedad: ellas mismas pueden estar implicadas en la enfermedad como patógenos oportunistas, o pueden desarrollar un papel más pasivo protegiendo a patógenos sensibles a los antibióticos o transfiriendo resistencia a bacterias patógenas convencionales (Macy & Probst, 1979). Teniendo en cuenta el número y la localización en relación a la superficie epitelial del intestino, Schaedler & Dubos (1962) han sugerido que *Bacteroides* spp. es parte de la flora autóctona de los roedores.

El concepto de resistencia a la colonización establece que la flora anaeróbica indígena limita la concentración de la flora potencialmente patógena (sobre todo aeróbica) en el aparato digestivo. El daño de la microbiota que proporciona resistencia a la colonización puede estar indicado por un aumento de la concentración de bacilos aerobios gram negativos (principalmente *E. coli*), cocos aerobios gram positivos (principalmente *Enterococci*) o levaduras en heces (Vollaard & Clasener, 1994).

La población de levaduras fue la que mostró mayor estabilidad a lo largo de toda la experiencia, siendo sus valores superiores a los reportados por Tannock *et al.* (2000) para humanos y a los encontrados por Foo & Lee (1972) en ratones (4-5 log₁₀ UFC/g heces). El cambio en la microbiota intestinal, debido a componentes de pared de la levadura (mananos) o a un efecto directo de la levadura viva, podría reducir bacterias patógenas y metabolitos tóxicos y, de esta forma, mejorar la salud del animal y la performance de crecimiento. Por otra parte, la suplementación con levadura viva ha demostrado ser útil para mejorar la resistencia a enfermedades y la eficiencia productiva (Cole *et al.*, 1992), lo cual demuestra la utilidad potencial que puede tener este grupo microbiano. Así, la utilización de levaduras puede cambiar potencialmente la microbiota

intestinal estimulando selectivamente el crecimiento de bacterias beneficiosas y suprimiendo el crecimiento de bacterias patógenas (van Heugten *et al.*, 2003).

Los valores encontrados para el grupo coliformes resultaron idénticos a los reportados por Dubos *et al.* (1965) y superiores a los encontrados por Foo & Lee (1972). Poco después del nacimiento, el tracto gastrointestinal de los roedores es colonizado con grandes números de bacterias aeróbicas que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* (coliformes). A partir del 12^{do} día de vida, el número de estos microorganismos disminuye y los niveles mínimos son alcanzados aproximadamente el día 21. Estos niveles se mantienen para el resto de la vida del animal a menos que los individuos sufran estrés o se administre algún antibiótico (Lee & Gemmell, 1972). Las situaciones de estrés siempre conducen a la reducción de la flora beneficiosa -bacterias ácido lácticas y bifidobacterias- y al incremento de coliformes (Schaedler & Dubos, 1962; Kociubinski, 1999). Hay una fuerte correlación entre la caída en el número de coliformes y el aumento de las bacterias anaerobias estrictas que rápidamente se transforman en los miembros dominantes de la microbiota intestinal del animal adulto.

Por otra parte, los recuentos de enterococos fueron superiores a los informados por Lee *et al.* (1971) y a los reportados por Foo & Lee (1972) y Diaz *et al.* (2004). Los enterococos son bacterias anaerobias facultativas, gram positivas y ubicuas. Pueden encontrarse en el suelo, las plantas, los productos lácteos y otros alimentos, y son parte de la microflora normal del tracto gastrointestinal así como de la materia fecal de los vertebrados (Domig *et al.*, 2003). Lee *et al.* (1971) encontraron que los enterococos estaban presentes en el día 2 (después del nacimiento), aumentaban en número a lo largo de los 10-12 días siguientes alcanzando un pico de 10^8 UFC/g y disminuyendo luego durante los 4 días siguientes a un nivel de 10^4 UFC/g para mantenerse hasta el día

32. Los valores de *Bacteroides* spp. y enterococci informados en este estudio están muy próximos entre sí, en contraposición a lo encontrado por Foo & Lee (1972) quienes hallaron un alto número de *Bacteroides* spp. junto a un bajo número de *Enterococci* en el ciego y materia fecal de los ratones.

Los valores encontrados para coliformes y enterococos se mantuvieron estables a lo largo de la experiencia, situación que difiere con lo observado por Lee *et al.* (1971), quienes reportaron un descenso de los recuentos a lo largo del tiempo mientras los anaerobios estrictos iban alcanzando sus niveles máximos.

De acuerdo con lo observado en la figura 3, los *Lactobacillus* spp. se mantuvieron estables durante toda la experiencia en valores que coinciden con lo observado por Dubos *et al.* (1965) en materia fecal y Lee *et al.* (1971) en contenido cecal. Por otra parte, el número de *Lactobacillus* spp. totales encontrados en el ID fue superior al informado para recuentos efectuados en la misma porción del tubo digestivo pero en ratones libres de patógenos específicos (Dubos *et al.*, 1965; Schaedler *et al.*, 1965; Savage *et al.*, 1968). En esos estudios *Lactobacillus* spp. mostró una menor carga en el intestino delgado que en el intestino grueso (Dubos *et al.*, 1965; Savage *et al.*, 1968).

Tomando en cuenta que los animales utilizados tenían 21 días de vida al inicio del experimento y considerando que algunos de los géneros estudiados, como *Lactobacillus* y *Bacteroides*, alcanzan su población máxima en el tubo digestivo entre los 12 y 15 días de vida (Schaedler *et al.*, 1965; Dubos *et al.*, 1965), resulta razonable pensar que la microbiota encontrada en la materia fecal durante la experiencia ya estaba establecida en el sistema digestivo y debería presentar una limitada variabilidad mientras los animales se mantuvieran sanos. El análisis de la microbiota mostró la presencia de

géneros bacterianos que forman parte de la microbiota intestinal reconocida como normal en el ratón (Marcotte & Lavoie, 1996).

La microbiota intestinal se puede considerar como un sistema metabólicamente muy activo que brinda protección frente a microorganismos patógenos y provee un importante estímulo de maduración al sistema inmune. La interferencia con alguno de los componentes de este ecosistema probablemente quiebre el equilibrio que mantienen sus integrantes y afecte las funciones del sistema (Dubos *et al.*, 1965). Una vez que las cepas probióticas se han establecido en el ambiente intestinal es importante evaluar de qué forma sus actividades metabólicas podrían afectar el ambiente intestinal a nivel local (Fernández *et al.*, 2005). Los resultados mostraron que no existió un desbalance entre los componentes microbianos; por lo tanto, es factible afirmar que el inóculo no alteró el equilibrio del ecosistema intestinal y, en particular, no ejerció efecto inhibitorio sobre los integrantes de la microbiota previamente establecida. Aunque la resistencia a la colonización pueda ser importante en la exclusión de organismos patógenos del intestino, esto puede tener un impacto negativo en la introducción de cepas probióticas. La consideración más importante para el mantenimiento de una microbiota gastrointestinal sana es resistir los disturbios que alteran la estabilidad del ecosistema. Mientras los probióticos ejercen sus efectos beneficiosos dentro del intestino, su introducción en el tracto gastrointestinal sano puede afectar la microbiota protectora ya establecida (Plant *et al.*, 2003). Los resultados muestran una interacción entre la microbiota indígena y el inóculo suministrado. La microbiota indígena del tracto gastrointestinal afectó la colonización por parte del inóculo suministrado. Si bien el inóculo no produjo cambios detectables en la microbiota murina, ésta tuvo un fuerte

impacto en la cantidad de *L. casei* DSPV 318T, integrante del inóculo, modificando su población a lo largo del estudio.

La generación de mutantes de *L. casei* DSPV 318T resistentes a rifampicina facilitó la enumeración de uno de los integrantes del inóculo y permitió diferenciarlo fácilmente de la microbiota indígena. La inoculación continua durante 3 días seguida de 4 administraciones en días alternos resultó suficiente para alojar a *L. casei* DSPV 318T en el ID y permitió la permanencia del mismo hasta 3 días después de finalizada la administración. Los niveles de *L. casei* DSPV 318T en MF se encontraban un logaritmo por debajo del valor alcanzado en el ID. Esto muestra la capacidad del sistema de inoculación en días alternos para lograr la permanencia de este microorganismo en el intestino. Esto puede estar relacionado con una mayor afinidad de *L. casei* DSPV 318T por el intestino delgado debido a su habilidad para competir con la microbiota indígena de esa porción del tubo digestivo. Si bien la carga bacteriana alcanzada en ID resulta aparentemente baja, podría ser suficiente para mantener algún efecto probiótico que debería ser estudiado. Estos resultados muestran la validez del procedimiento para mantener a *L. casei* DSPV 318T en el intestino pero se hace necesario realizar nuevas experiencias para poder determinar con precisión cuál es el intervalo máximo entre las inoculaciones que permitan mantener una carga bacteriana razonable y hasta qué día post-inoculación están presentes los microorganismos en el tracto gastrointestinal.

La cantidad de *L. casei* DSPV 318T viables encontrados en la materia fecal es el resultado de la cantidad inoculada que fue capaz de sobrevivir a las barreras biológicas, el producto de su multiplicación, la saturación de los nichos de alojamiento y la evacuación debida a la dificultad encontrada para adherirse. *Lactobacillus casei* DSPV 318T fue capaz de sobrevivir en un nicho ecológico complejo, como es el tracto

gastrointestinal de los ratones, y mantenerse viable a pesar de no estar siendo administrado en forma continua. Esta característica resulta importante para un microorganismo con potencial probiótico (Rogelj *et al.*, 2002). Por otra parte, la capacidad del microorganismo estudiado para alojarse en el ID es interesante porque en dicha región del sistema digestivo, además de desarrollarse los procesos de digestión y absorción de nutrientes, se alojan algunos órganos del sistema inmune que pueden ser estimulados como parte de su potencial actividad probiótica.

Los resultados del experimento mostraron un efecto de colonización y permanencia por parte de la bacteria en estudio. A pesar de no ser una cepa específica de la especie animal estudiada (heteróloga), en términos de ecosistemas, *L. casei* debería ser considerada alóctona o de tránsito (Tannock *et al.*, 2000).

V.2.2. Desafío experimental frente a *Salmonella dublin* DSPV595T en ratones (*Mus musculus*)

Los géneros *Lactobacillus* spp y *Pediococcus* spp son componentes habituales de la flora intestinal normal del hombre y de los animales (Raibaud, 1992; Smoragiewicz *et al.*, 1993; Garriga *et al.*, 1998; Kurzak *et al.*, 1998; Schneider *et al.*, 2004) y fueron identificados como responsables del control de las diarreas infantiles (Isolauri *et al.*, 1991), de la reducción del número de coliformes en el intestino de terneros (Ellinger *et al.*, 1978) y del control de los efectos de los gérmenes patógenos como *Salmonella* y *Escherichia coli* (Collins & Carter, 1978; Underdahl *et al.*, 1983). El inóculo estudiado, constituido por una mezcla de cepas, estuvo integrado por microorganismos de los géneros *Lactobacillus* spp y *Pediococcus* spp.

La capacidad de los microorganismos probióticos para inhibir o contrarrestar los efectos negativos de los gérmenes patógenos en animales vivos es una propiedad muy estudiada (Casas *et al.*, 1998; Salminen *et al.*, 1998a). El mayor porcentaje de sobrevivencia de los ratones inoculados con las BAL alcanzado en esta experiencia está demostrando un efecto protector de las bacterias empleadas frente al efecto patógeno de la cepa de *Salmonella dublin* utilizada. Un comportamiento similar fue observado en experiencias realizadas en ratones inoculados con *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2B20 (Moura *et al.*, 2001) y *Enterococcus faecium* (Maia *et al.*, 2001) e infectados con *Salmonella typhimurium*.

El tiempo transcurrido entre la primera muerte del G-C y la del G-BAL es un indicador del grado de protección que brindó el inóculo utilizado hasta que el efecto patógeno superó dicha barrera defensiva. En la experiencia con *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2B20 esa diferencia fue sólo de 24 horas (Moura *et al.*, 2001), cuando se utilizó *Enterococcus faecium* fue de 48 horas (Maia *et al.*, 2001) y para el inóculo de BAL empleado en este trabajo alcanzó las 72 horas. Cuando se produjo la muerte del primer individuo del G-BAL (día 20 de la experiencia), la diferencia de mortandad respecto del grupo control alcanzaba al 19%, cifra que se incrementó al 27% el día 23. Es decir, cuando se produce la segunda muerte del grupo de ratones tratados con el inóculo de BAL ya habían muerto el 35 % de los ratones no tratados. Esta diferencia entre los grupos muestra el efecto protector del inóculo.

Si bien a partir del día 20 del experimento el efecto protector de las BAL fue superado por el efecto patógeno de *Salmonella dublin* DSPV 595T (primera muerte en el G-BAL), la mortandad de los animales tratados con dicho inóculo resultó más moderada que la observada en el grupo control, en especial entre los días 18 y 25 del

experimento. Esto estaría relacionado con la persistencia del efecto protector del inóculo, el cual puede no ser suficiente para evitar las muertes pero sí para retrasar su aparición. La duración de dicho efecto representaría la disponibilidad de tiempo para aplicar un tratamiento terapéutico antes que la mortalidad se desencadene en forma brusca.

En los dos grupos estudiados (G-C y G-BAL) se produjo un importante número de muertes que pone en evidencia el poder patógeno de la cepa de *S. dublin* utilizada. La diferencia entre los valores de sobrevivencia de ambos grupos al final del experimento (18 %) fue significativa, lo cual resulta un indicador del efecto protector del inóculo estudiado frente a la *S. dublin*. Partiendo de las observaciones antes comentadas, dicho valor podría ser considerado como un nivel de base que sería mejorado si se utilizaran otros tratamientos terapéuticos específicos asociados a la administración preventiva del probiótico, en especial partiendo de la disponibilidad de tiempo brindado por el efecto protector del probiótico.

Existe una gran variabilidad en la presentación clínica de la salmonelosis en los animales debida a una combinación de diferentes factores que se relacionan con el hospedador (edad, estado inmune y otras enfermedades intercurrentes), el agente etiológico (serotipo, dosis y virulencia) y el ambiente (estrés, disponibilidad de alimentos y agua, etc.) (McDonough *et al.*, 1999). Los ratones utilizados en el experimento poseían edades homogéneas y estaban sanos al comenzar la experiencia, todos fueron sometidos a las mismas condiciones ambientales controladas, recibieron el mismo manejo y alimentación y fueron inoculados con la misma cepa patógena y con la misma dosis. En estas condiciones controladas, *S. dublin* DSPV595T fue capaz de inducir signos de enfermedad en todos los ratones del G-C, mientras que hubo ratones

del G-BAL en los que no se detectaron signos durante el experimento (figura 6). Estos individuos del G-BAL que no enfermaron, a pesar de haber estado en contacto directo con el agente etiológico, pueden haber desarrollado las defensas necesarias debido a la influencia que el inóculo tuvo sobre su sistema inmunológico. A esto se puede agregar que aquellos individuos que mostraron signos de enfermedad recién los manifestaron a las 96 horas post-administración del patógeno, es decir que comenzaron a enfermarse más tarde que los controles.

En el campo de la producción animal, la importancia de los probióticos en cuanto a su uso en la alimentación de los animales se basa en las propiedades que se les atribuyen para mejorar la eficiencia de conversión alimenticia y como promotores del crecimiento (Dilworth & Day, 1978; Miles *et al.*, 1981; Mordenti, 1986; Fuller, 1997).

Al relacionar la evolución en la ingestión de alimentos del G-C frente a la aparición de animales enfermos resultó clara la coincidencia entre el pico de morbilidad y los menores valores de consumo de alimentos. Esto estaría corroborando que la alteración de la salud, debida a la presencia del patógeno, produjo menor ingestión de alimentos. Por otra parte, el aumento del peso de los ratones resultó afectado en ambos grupos por la presencia de *S. dublin*, pero este efecto negativo fue mucho más moderado en el G-BAL y estuvo restringido sólo a los primeros días post-inoculación del patógeno. La mayor pérdida de peso evidenciada en los animales del G-C, relacionada con el padecimiento de la enfermedad, estaría provocada por una combinación de los efectos de la menor ingestión y un menor aprovechamiento de los alimentos ingeridos.

El tratamiento previo con el inóculo de bacterias ácido lácticas estudiado brindó protección a los ratones inoculados con *S. dublin* DSPV 595T, a pesar que ninguna de las cepas fue capaz de inhibirla en forma individual en los ensayos *in vitro*.

Ante el efecto protector observado en los ratones y tomando en consideración las ventajas de utilizar cepas probióticas aisladas de un animal en la misma especie (Havenaar *et al.*, 1992), para aprovechar el efecto de especificidad de hospedador (Fuller, 1997), resulta interesante realizar un estudio futuro similar en terneros. Los nuevos trabajos deberían contemplar en su diseño la búsqueda de los mecanismos mediante los cuales estos agentes bioterapéuticos logran su efecto.

V.3. Necropsias

Tomando en consideración la distribución que tuvieron estas necropsias a lo largo del tiempo (Tabla 4) y los resultados obtenidos, es posible realizar 3 consideraciones: en primer lugar, al iniciar el experimento los animales se encontraban en similares condiciones de salud; en segundo lugar, las bacterias que integraron el inóculo no perjudicaron a los individuos del G-BAL (Frizzo *et al.*, 2004a) y, por último, durante el tiempo transcurrido entre la inoculación del patógeno y la última necropsia (4 días) no se desarrollaron lesiones típicas.

Las lesiones observadas en los órganos y tejidos estudiados correspondieron a una infección por *Salmonella* spp, lo cual está confirmando que el agente patógeno utilizado actuó de forma similar a lo que ocurre en una infección natural.

El ingreso de *Salmonella* por vía oral, la proliferación en el intestino delgado y su rápida penetración en la lámina propia provoca edema, proliferación de macrófagos, reclutamiento de linfocitos y PMN con dilatación del quilífero central de las vellosidades. Esto genera una caída pronunciada de los enterocitos apicales y una reacción proliferativa en el fondo de las criptas (enteritis regenerativa). Este proceso se descompensa rápidamente, provocando una atrofia y fusión de las vellosidades. La

bacteria invade los nódulos linfáticos regionales con reclutamiento de macrófagos y PMN. Lo mismo acontece en las venas submucosas produciendo flebitis y tromboembolias. Los trastornos circulatorios llevan a una lesión irreversible apical de las vellosidades con necrosis, hemorragias y exudación de fibrina (enteritis fibrinonecrótica). La diseminación bacteriana por la vía hemolinfática provoca la etapa de septicemia o bacteriemia transitoria con compromiso de los ganglios linfáticos mesentéricos, el hígado y el bazo (Jubb *et al.*, 1988; Tizard, 1996; Robbins, 2000).

Los resultados mostraron una clara diferencia entre los sexos de los ratones para resistir al efecto de la cepa de *Salmonella* cuando el inóculo fue suministrado. De los 4 lotes de ratones estudiados, el que mejor se desempeñó frente al patógeno fue el de las hembras que recibieron el inóculo. Esto estaría relacionado con un mejor comportamiento en la resolución de la enfermedad por parte de las hembras frente a la cepa patógena en la etapa avanzada de la enfermedad y podría estar indicando que a igual dosificación las hembras aprovechan mejor los efectos benéficos del inóculo. *Salmonella dublin* es un serotipo adaptado al hospedador (Brackelsberg *et al.*, 1997) que produce portadores y causa diarrea en áreas endémicas y septicemia, neumonía, fiebre y diarreas esporádicas en áreas no endémicas (McDonough *et al.*, 1999). Los animales que finalizaron con lesiones podrían haber alcanzado el estado de portador.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

En general, las cepas estudiadas mostraron un comportamiento a las pruebas *in vitro* que las hace buenos exponentes para ser incorporados a la dieta de los terneros como un inóculo probiótico multiespecie. La producción de una sustancia antimicrobiana por parte de *Pediococcus acidilactici* DSPV 006T puede generar efectos benéficos durante el tránsito intestinal que contribuyan al balance de la microflora. La capacidad de autoagregación de *Lactobacillus salivarius* DSPV 315T junto a la gran performance de crecimiento y sobrevivencia a los jugos gástricos de *Lactobacillus casei* DSPV 318T hacen que estas 3 cepas posean ventajas competitivas frente a las otras al momento en que tengan que actuar en los animales. Las cepas pueden permanecer viables en un alto número durante el tránsito gástrico e intestinal y, de esta manera, complementar sus efectos en forma sinérgica al expresar sus propiedades probióticas.

La administración del inóculo no produjo cambios en la actividad o la apariencia de los ratones siendo esto un indicador del estado general de salud y de la ausencia de efectos adversos. La cepa de *Lactobacillus casei* DSPV 318T estudiada fue capaz de superar las barreras biológicas del tracto gastrointestinal y permaneció en el ID de los ratones por un período de tiempo más prolongado que la duración del tratamiento. El sistema de administración inicial masiva, seguido de un suministro en días alternos fue efectivo para lograr que dicho microorganismo se aloje en el intestino. El inóculo utilizado no interfirió en el normal funcionamiento de la microbiota y resultó inocuo para el hospedador.

El efecto protector quedó demostrado por el mayor porcentaje de sobrevivencia de los ratones tratados respecto de los controles, por el tiempo transcurrido entre la primera muerte del grupo control y la del grupo inoculado luego de la infección con *Salmonella*

dublin DSPV 595T y por la presencia de ratones inoculados con bacterias lácticas que no enfermaron durante el experimento.

El tratamiento con el inóculo de bacterias ácido lácticas brindó protección a los ratones inoculados con *Salmonella dublin* DSPV 595T en la etapa en la cual se produjeron las muertes espontáneas. Las hembras resultaron mejor protegidas que los machos. El estudio histopatológico permitió corroborar la inocuidad del inóculo utilizado y confirmó que las diferencias encontradas en la sobrevivencia entre lotes era debida a una resistencia distinta de los ratones frente a la cepa patógena inoculada.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, F.; ISHIBASHI, N. & SHIMAMURA, S. (1995). Effect of administration of Bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *J. Dairy Sci.* 78: 2838-2846.
- ABRAMS, G.D. & BISHOP, J.E. (1966) Effect of the normal microbial flora on the resistance of the small intestine to infection. *J. Bacteriol.* 92: 1604-1608.
- ABU-TARBOUSH, H.M.; AL-SAIADY, M.Y. & KEIR EL-DIN, A.H. (1996). Evaluation of diet containing Lactobacilli on performance, fecal coliform, and Lactobacilli of young dairy calves. *Anim. Feed Sci. Tech.* 57: 39-49.
- ALLORI, C.; AGÜERO, G.; RUIZ-HOLGADO, DE A.P.; NADER, DE O.M. & PERDIGÓN, G. (2000). Gut mucosa morphology and microbiota changes in malnourished mice after renutrition with milk and administration of *Lactobacillus casei*. *J. Food Protect.* 63: 83-90.
- BECHMAN, T.J.; CHAMBERS, J.V. & CUNNINGHAM M.D. (1977). Influence of *Lactobacillus acidophilus* on the performance of young calves. *J. Dairy Sci.* 61(Suppl. 1):74.
- BEERENS, H. (1990). An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp. *Lett. Appl. Microbiol.* 11:155-157.
- BENGMARCK, S. (1998). Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut* 42: 2-7.
- BENNO, Y.; ENDO, K.; MIZUTANI, T.; NAMBA, Y.; KOMORI, T. & MITSUOKA T. (1989). Comparison of fecal microflora of elderly persons in rural and urban areas of Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1100-1105.

- BERG, R.D. (1996). The indigenous gastrointestinal microbiota. *Trends Microbiol.* 4: 430-435.
- BHUNIA, A.K.; JOHNSON, M.C. & RAY, B. (1988). Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 261-268.
- BLUM, S.; ÁLVAREZ, S.; HALLER, D.; PÉREZ, P. & SCHIFFRIN, J. (1999). Intestinal microbiota and the interaction with immunocompetent cells. *Anton. Leeuw.* 76: 199-205.
- BOMAN, H.G. (2000) Innate immunity and the normal microflora. *Immunol. Rev.* 173: 5-16.
- BRACKELSBURG, C.A.; NOLAN, L.K. & BROWN, J. (1997). Characterization of *Salmonella dublin* and *Salmonella typhimurium* (Copenhagen) isolates from cattle. *Vet. Res. Commun.* 21: 409-420.
- BRANDZAEG, P. (1995). Molecular and cellular aspect of the secretory immunoglobulin system. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 103: 1-19.
- BRUCE, B.B.; GILLILAND, S.E.; BUSH, L.J. & STALEY, T.E. (1979). Influence of feeding cattle cells of *Lactobacillus acidophilus* on faecal flora of young dairy calves. *Oklahoma Anim. Sci. Res. Rep.* p. 207.
- CASAS, I.A.; EDENS, F.W. & DOBROGOSZ, W.J. (1998). *Lactobacillus reuteri*: an effective probiotic for poultry and other animals. En: *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, S. Salminen y A. Von Wright Ed. Nueva York, Marcel Dekker Inc., pp.475-518.

- CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L. & COLLINS, J.K. (1998). Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* 84: 759-768.
- COLE, N.A.; PURDY, C.W. & HUTCHESON, D.P. (1992). Influence of yeast culture on feeder calves and lambs. *J. Anim. Sci.* 70: 1682-1690.
- COLLINS, F.M. & CARTER, P.B. (1978). Growth of salmonellae in orally infected germfree mice. *Infect. Immun.* 21: 41-47.
- COLLINS, J.K.; THORNTON, G. & SULLIVAN, G.O. (1998). Selection of probiotic strains for human applications. *Int. Dairy J.* 8: 487-490.
- CRUYWAGEN, C.W.; JORDAAN, I. & VENTER, L. (1996). Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplementation of milk replacer on preweaning performance of calves. *J. Dairy Sci.* 79: 483-486.
- DAESCHEL, M.A. (1989). Antimicrobial substance from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* 43: 164-167.
- DE MAN, J.D.; ROGOSA, M. & SHARPE, M.E. (1960). A Medium for the cultivation of Lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23: 130-135.
- DELBECQUE, J. (1991). Ecología microbiana intestinal, bioregulación y aplicaciones prácticas. *Anales Porcícolas* 102: 32-52.
- DEMECKOVÁ, V.; KELLY, D.; COUTTS, A.G.P.; BROOKS, P.H. & CAMPBELL, A. (2002). The effect of fermented liquid feeding on the faecal microbiology and colostrum quality of farrowing sows. *Int. J. Food Microbiol.* 79: 85-97.

- DIAZ, R.L.; HOANG, L.; WANG, J.; VELA, J.L.; JENKINS, S.; ARANDA, R. & MARTÍN, M.G. (2004). Maternal adaptive immunity influences the intestinal microflora of suckling mice. *J. Nutr.* 134: 2359-2364.
- DILWORTH, B.C. & DAY, E.J. (1978). *Lactobacillus* cultures in brooder diets. *Poultry Sci.* 57: 1101-1104.
- DOMIG, K.J.; MAYER, H.K. & KNEIFEL, W. (2003). Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 1. Media for isolation and enumeration. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 147-164.
- DRAKSLER, D.; LOCASCIO, M.; GONZÁLEZ, S. & OLIVER, G. (2002) The development of faecal flora in young Creole goats. *Small Ruminant Res.* 46: 67-70.
- DUBOS, R.J & SCHAEGLER, R.W. (1960). The effect of the intestinal flora on the growth rate of mice, and on their susceptibility to experimental infections. *J. Exp. Med.* 111: 407-417.
- DUBOS, R.; SCHAEGLER, R.W.; COSTELLO, R. & HOET, P. (1965). Indigenous, normal, and autochthonous flora of the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* 122: 67-76.
- DUNNE, C.; MURPHY, L.; FLYNN, S.; O'MAHONY, L.; O'HALLORAN, S.; FEENEY, M.; MORRISSEY, D.; THORNTON, G.; FITZGERALD, G.; DALY, C.; KIELY, B.; QUIGLEY, E.M.; O'SULLIVAN, G.C.; SHANAHAN, F. & COLLINS, J.K. (1999). Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Anton. Leeuw.* 76: 279-292.

- ELLINGER, D.K.; MULLER, L.D. & GLANTZ, P.J. (1978). Influence of feeding fermented colostrum and *Lactobacillus acidophilus* on faecal flora and selected blood parameters of young dairy calves. J. Dairy Sci. 61(Suppl.1): 119-122.
- FAO/WHO (2001). Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Expert consultation report: Córdoba, Argentina: Food and agriculture organization of the United Nations and World Health Organization, 1-4 October.
- FERNÁNDEZ, M.F.; BORIS, S. & BARBÉS, C. (2005). Safety evaluation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* UO 004, a probiotic bacterium. Res. Microbiol. 156: 154-160.
- FONS, M. (1994). Resistance to colonization. En: Actes du Colloque Lactic 94, Les bacteries lactiques. Caen, Francia, 7-9.
- FOO, M.C. & LEE, A. (1972). Immunological response of mice to members of the autochthonous intestinal microflora. Infect. Immun. 6: 525-532.
- FOOKS, L.J.; FULLER, R. & GIBSON, G.R. (1999). Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. Int. Dairy J. 9: 53-61.
- FOX, S.M. (1988). Probiotics: intestinal inoculants for production animals. Vet. Med.-US 83: 806-810.
- FRIZZO, L.S.; SEQUEIRA, G.; ROSMINI, M.R.; BINNER, J. & ZEQUIN, L. (2002). Evaluación de la actividad antimicrobiana de cepas bacterianas indígenas aisladas de terneros lactantes. En actas: Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas 2002, Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario. Casilda (Argentina), pp. 59-60.

- FRIZZO, L.S.; ZBRUN, M.V.; BERTOZZI, E.; SEQUEIRA, G.; SOTO, L.; MARTÍ, L.E. & ROSMINI, M.R. (2004a). Protección de ratones inoculados con bacterias lácticas de origen bovino frente a *Salmonella dublin*. XIX Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias (PANVET). Buenos Aires (Argentina).
- FRIZZO, L.S.; ZBRUN, M.V.; BERTOZZI, E.; SEQUEIRA, G.; MARTÍ L.E.; DALLA SANTINA, R. & ROSMINI, M.R. (2004b). Colonización del tracto intestinal de ratones convencionales por *Lactobacillus casei* DSPV 318T. En actas: Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas 2004, Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario. Casilda (Argentina), pp. 58-59.
- FRIZZO, L.S.; PERALTA, C.; ZBRUN, V.; BERTOZZI, E.; SOTO, L.; MARTI, E.; DALLA SANTINA, R.; SEQUEIRA, G. & ROSMINI, M.R. (2005). Respuesta de ratones inoculados con bacterias lácticas de origen bovino a un desafío con *Salmonella dublin*. Revista FAVE-Ciencias Veterinarias 4: 41-53.
- FUKUSHIMA, Y.; KAWATA, Y.; MIZUMACHI, K.; KURISAKI, J. & MITSUOKA, T. (1999). Effect of bifidobacteria feeding on fecal flora and production of immunoglobulins in lactating mouse. Int. J. Food Microbiol. 46: 193-197.
- FULLER, R. (1989). Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66: 365-378.
- FULLER, R. (1992). History and development of probiotics. En Fuller (Ed.) Probiotics, The Scientific Basis, Londres, Chapman & Hall, pp. 1-8.
- FULLER, R. (1997). Introduction. En Fuller (Ed.) Probiotics 2: Applications and practical aspects, Londres, Chapman & Hall, pp. 1-9.
- GARDINER, G.E.; CASEY, P.G.; CASEY, G.; BRENDAN LYNCH P.; LAWLOR, P.G.; HILL, H.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. & ROSS, R.P. (2004).

- Relative ability of orally administered *Lactobacillus murinus* to predominate and persist in the porcine gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1895-1906.
- GARRIGA, M.; PASCUAL, M.; MONFORT, J.M. & HUGAS, M. (1998). Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. *J. Appl. Microbiol.* 84: 125-132.
- GELSOMINO, R.; VANCANNEYT, M.; CONDON, S.; SWINGS, J. & COGAN, T.M. (2001). Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 177-188.
- GIBSON, G.R. & ROBERFROID, M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125: 1401-1402.
- GILL, H.S.; SHU, Q.; LIN, H.; RUTHERFURD, K.J. & CROSS, M.L. (2001). Protection against translocating *Salmonella typhimurium* infection in mice by feeding the immuno-enhancing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* strain HN001. *Med. Microbiol. Immunol.* 190: 97-104.
- GILLILAND, S.E.; BRUCE, B.B.; BUSH, L.J. & STALEY, T.E. (1980). Comparison of two strains of *Lactobacillus acidophilus* as dietary adjuncts for young calves. *J. Dairy Sci.* 63: 964-972.
- GOLDIN, B.R. & GORBACH, S.L. (1992). Probiotics for humans. En Fuller (Ed.) *Probiotics, The Scientific Basis*. Londres, Chapman & Hall, pp. 355-376.
- GOTCHEVA, V.; HRISTOZOVA, E.; HRISTOZOVA, T.; GUO, M.; ROSHKOVA, Z. & ANGELOV, A. (2002). Assessment of potential probiotic properties of lactic acid bacteria and yeast strains. *Food Biotechnol.* 16: 211-225.
- GRAPHPAD INSTAT SOFTWARE.® (1994). Versión 3.1. Número de serie: 50533-353. Copyright© Graphpad.

- GUSILS, C.; BUJAZHA, M. & GONZÁLEZ, S. (2002). Preliminary studies to design a probiotic for use in swine feed. *Interciencia* 27: 409-413.
- HATCH, R.C.; THOMAS, R.O. & THAYNE, W.V. (1973). Effect of adding *Bacillus acidophilus* to milk fed to baby calves. *J. Dairy Sci.* 56(Suppl. 1): 682.
- HIGGINBOTHAM, G.E. & BATH, D.L. (1993). Evaluation of *Lactobacillus* fermentation cultures in calf feeding systems. *J. Dairy Sci.* 76: 615-620.
- HAVENAAR, R.; TEN BRINK, B. & HUIS IN 'T VELD, J.H.J. (1992). Selection of strains for probiotic use. En Fuller, R. (Ed.) *Probiotics, The Scientific Basis*. Londres, Chapman & Hall, pp. 209-224.
- HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U. & HUIS IN 'T VELD, J.H.J. (1998). Overview of gut microbiota and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 85-101.
- HUBER, J.T. (1997). Probiotics in cattle. En: *Probiotics: 2. Applications and Practical Aspects*, R. Fuller Ed. Londres, Chapman & Hall. pp. 182-185.
- HUDAULT, S.; DUCLUZEAU, R.; DUBOS, F.; RAIBAUD, P.; GHNASSIA, J.C. & GRISCELLI, C. (1976). Elimination from the digestive tract of a "gnotoxenic" child of a *Lactobacillus casei* strain, isolated from a commercial preparation: antagonistic effect of an *Escherichia coli* strain of human origin, demonstrated in "gnotoxenic" mice. *Ann. Microbiol. Inst. Pasteur* 127B: 75-82.
- HUDAULT, S.; LIÉVIN, V.; BERNET-CAMARD, M.F. & SERVIN, A.L. (1997). Antagonistic activity exerted *in vitro* and *in vivo* by *Lactobacillus casei* (Strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 513-518.

- ISOLAURI, E.; JUNTUNEN, M.; RAUTANEN, T.; SILLANAUKKEE, P. & KOIVULA, T. (1991). Human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus* GG) promotes recovery from acute diarrhoea in children. *Pediatrics* 88: 90-97.
- ISOLAURI, E.; SALMINEN, S. & OUWEHAND, A.C. (2004). Probiotics. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 18: 299-313.
- JACOBSEN, C.N.; ROSENFELDT NIELSEN, V.; HAYFORD, A.E.; MØLLER, P.L.; MICHAELSEN, K.F.; PÆRREGAARD, A.; SANDSTRÖM, B.; TVEDE, M. & JAKOBSEN, M. (1999). Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4949-4956.
- JAMES, R.E.; MCGILLIARD, M.L. & HARTMAN, D.A. (1984). Calf mortality in Virginia dairy herd improvements herds. *J. Dairy Sci.* 67: 908-918.
- JENNY, B.F.; VANDIJK, H.J. & COLLINS, J.A. (1991). Performance and fecal flora of calves fed a *Bacillus subtilis* concentrate. *J. Dairy Sci.* 74: 1968-1973.
- JOHANNSEN, S.A.; GRIFFITH, R.W.; WESLEY, I.V. & SCANES, C.G. (2004). *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* colonization of the crop in the domestic turkey: influence of probiotic and prebiotic treatment (*Lactobacillus acidophilus* and lactose). *Avian Dis.* 48: 279-286.
- JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C. & PALMER, N. (1988). *Patología de los animales domésticos*. 3e. Montevideo, Hemisferio Sur.
- KIELY, L.J. & OLSON, N.F. (2000). The physicochemical surface characteristics of *Lactobacillus casei*. *Food Microbiol.* 17: 277-291.

- KLAENHAMMER, T.R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70: 337-349.
- KMET, V.; CALLEGARL, M.L.; BOTTAZZI, V. & MORELLI, L. (1995). Aggregation-promoting factor in pig intestinal *Lactobacillus* strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 21: 351-353.
- KMET, V. & LUCCHINI, F. (1997). Aggregation-promoting factor in human vaginal *Lactobacillus* strains. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 19: 111-114.
- KOCIUBINSKI, G. (1999). Bacterias ácidolácticas y bifidobacterias: aptitudes para la elaboración de Probióticos intestinales. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata.
- KONTULA, P. (1999). *In vitro* and *in vivo* characterization of potential probiotic lactic acid bacteria and prebiotic carbohydrates. *Finnish J. Dairy Sci.* 54: 1-142.
- KUDA, T.; IWAI, A. & YANO, T. (2004). Effect of red pepper *Capsicum annuum* var. *conoides* and garlic *Allium sativum* on plasma lipid levels and cecal microflora in mice fed beef tallow. *Food Chem. Toxicol.* 42: 1695-1700.
- KURZAK, P.; EHRMANN, M.A. & VOGEL, R. (1998). Diversity of lactic acid bacteria associated with ducks. *Syst. Appl. Microbiol.* 21: 588-592.
- KURZAK, P. (2000). Development of pathogen suppressive poultry feed supplements containing lactic acid bacteria from ducks. Ph.D. thesis. Technische Universität München.
- LEE, A.; GORDON, J.; LEE, C. & DUBOS, R. (1971). The mouse intestinal microflora with emphasis on the strict anaerobes. *J. Exp. Med.* 133: 339-352.

- LEE, A. & GEMMELL, E. (1972). Changes in the mouse intestinal microflora during weaning: role of volatile fatty acids. *Infect. Immun.* 5: 1-7.
- LIÉVIN, V.; PEIVER, I.; HUDAULT, S.; ROCHAT, F.; BRASSART, D.; NEESER, J.R. & SERVIN, A.L. (2000). *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 47: 646-652.
- LILLY, D.M. & STILLWELL, R.H. (1965). Probiotics growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147: 747-748.
- LLOYD, A.B.; CUMMING, R.B. & KENT, R.D. (1977). Prevention of *Salmonella typhimurium* infection in poultry by pretreatment of chickens and poults with intestinal extracts. *Aust. Vet. J.* 53: 82-87.
- MACY, J.M. & PROBST, I. (1979). The biology of gastrointestinal *Bacteroides*. *Annu. Rev. Microbiol.* 33: 561-594.
- MAIA, O.B.; DUARTE, R.; SILVA, A.M.; CARA, D.C.; NICOLI, J.R. (2001). Evaluation of the components of a commercial probiotic in gnotobiotic mice experimentally challenged with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *typhimurium*. *Vet. Microbiol.* 79: 183-189.
- MARCOTTE, H. & LAVOIE, M.C. (1996). No apparent influence of immunoglobulins on indigenous oral and intestinal microbiota of mice. *Infect. Immun.* 64: 4694-4699.
- MARTEAU, P.; MINEKUS, M.; HAVENAAR, R. & HUIS IN 'T VELD, J.H.J. (1997). Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *J. Dairy Sci.* 80: 1031-1037.

- MCDONOUGH, P.L.; FOGELMAN, D.; SHIN, S.J.; BRUNNER, M.A. & LEIN, D.H. (1999). *Salmonella enterica* serotype Dublin infection: an emerging infectious disease for the northeastern United States. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2418-2427.
- MCEWEN, S.A. & FEDORKA-CRAY, P.J. (2002). Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin. Infect. Dis.* 34(Suppl 3): S93-S106.
- MEYER, P.M.; VAZ PIRES, A.; VAGADLO, A.R.; CORREIA DE SIMAS, J.M. & SUSIN, I. (2001). Adição de probiótico ao leite integral ou sucedâneo e desempenho de bezerros da raça holandesa. *Scientia Agricola* 58: 215-221.
- MILERMAN, D.; ALTMAN, G. & ESHDAT, Y. (1980). Screening of bacteria isolates for mannose-specific lectin activity by agglutination of yeast. *J. Clin. Microbiol.* 11: 328-332.
- MILES, R.D.; ARAFA, A.S.; HARMS, R.H.; CARLSON, C.W.; RIED, B.L. & CRAWFORD, J.S. (1981). Effects of a living non-freeze dried *Lactobacillus acidophilus* culture on performance, egg quality and gut microflora in commercial layers. *Poultry Sci.* 60: 993-1004.
- MILES, R.D. (1993). Manipulation of the microflora of the gastrointestinal tract: natural ways to prevent colonization by pathogens. En: *Biotechnology in the feed industry*. Alltech Technical Publications. pp. 133-150.
- MORDENTI, A. (1986). Probiotics and new aspects of grow promoters in pig production. *Informatore Zootecnico* 32: 69-72.
- MOURA, L.N.; NEUMANN, E.; VIEIRA, L.Q. & NICOLI, J.R. (2001). Protection by *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2B20 against experimental oral infection with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *typhimurium* in gnotobiotic and conventional mice. *Braz. J. Microbiol.* 32: 66-69.

- MULDER, R.W.; HAVENAAR, R. & HUIS IN 'T VELD, J.H.J. (1997). Intervention strategies: the use of probiotics and competitive exclusion microbiotas against contamination with pathogens in pigs and poultry. En Probiotics 2. Application and Practical Aspects, R. Fuller Ed. Londres, Chapman & Hall, pp. 187-207.
- NOUSIAINEN, J. & SETÄLÄ, J. (1998). Lactic acid bacteria as animal probiotics. En: Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects, S. Salminen y A. Von Wright Ed. Nueva York, Marcel Dekker Inc., pp. 437-473.
- NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL) (1996). Guide of the care and use of laboratory animals. Washington D.C., National Academy Press.
- OUWEHAND, A.C. (1998). Antimicrobial component from lactic acid bacteria. En: Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects, S. Salminen y A. Von Wright Ed. Nueva York, Marcel Dekker Inc., pp.139-159.
- OUWEHAND, A.C.; KIRJAVAINEN, P.V.; SHORTT, C. & SALMINEN, S. (1999). Probiotics: mechanisms and established effects. Int. Dairy J. 9: 43-52.
- OYOFO, B.A.; DELOACH, J.R.; CORRIER, D.E.; NORMAN, J.O.; ZIPRIN, R.L. & MOLLENHAUER, H.H. (1989). Effect of carbohydrates on *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chickens. Avian Dis. 33: 531-534.
- PARKER, R.B. (1974). Probiotics, the other half of antibiotic story. Anim. Nutr. Health 29: 4-8.
- PASCUAL, M.; GARRIGA, M. & MONFORT, J.M. (1996). Los probióticos en la alimentación animal. Eurocarne 44, 91-96.
- PERDIGÓN, G.; FULLER, R. & RAYA, R. (2001). Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. Curr. Issues Intest. Microbiol. 2: 27-42.

- PERDIGÓN, G.; MALDONADO-GALDEANO, C.; VALDÉZ, J.C. & MEDICI, M. (2002). Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56: S21-S26.
- PLANT, L.; LAM, C.; CONWAY, P.L. & O'RIORDAN, K. (2003). Gastrointestinal microbial community shifts observed following oral administration of a *Lactobacillus fermentum* strain to mice. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43: 133-140.
- PLUMMER, S.F.; GARAIOVA, I.; SARVOTHAM, T.; COTTRELL, S.L.; LE SCOUILLER, S.; WEAVER, M.A.; TANG, J.; DEE, P. & HUNTER, J. (2005). Effects of probiotics on the composition of the intestinal microbiota following antibiotic therapy. *In. J. Antimicrob. Ag.* 26: 69-74.
- POLLMAN, D.S.; DANIELSON, D.M. & PEO, E.R. (1980). Effects of microbial feed additives on performance of starter and growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 51: 577-581.
- RAIBAUD, P. (1992). Bacterial interactions in the gut. En: Fuller R. *Probiotics Scientific Basis*, Londres, Chapman & Hall, pp. 9-28.
- REID, G. (1999). The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3763-3766.
- REID, G. & FRIENDSHIP, R. (2002). Alternatives to antibiotic use: probiotics for the gut. *Anim. Biotechnol.* 13: 97-112.
- REMIGER, A.; EIJSINK, V.G.H.; EHRMANN, M.A.; SLETTEN, K.; NES, I.F. & VOGEL, R.F. (1999). Purification and partial amino acid sequence of plantaricin 1.25 α and 1.25 β two bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* TMW 1.25. *J. Appl. Microbiol.* 86: 1053-1058.

- RENIERO, R.; COCCONCELLI, P.; BOTTAZZI, V. & MORELLI, L. (1992). High frequency of conjugation in *Lactobacillus* mediated by an aggregation-promoting factor. *J. Gen. Microbiol.* 138: 763-768.
- ROBBINS (2000). *Patología funcional y estructural*. 6e. Madrid, McGraw Hill-Interamericana.
- ROGELJ, I.; MATIJAS, B.B.; MAJHENIC, A.C. & STOJKOVIC, S. (2002). The survival and persistence of *Lactobacillus acidophilus* LF221 in different ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* 76: 83-91.
- ROLFE, R.D. (2000). The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J. Nutr.* 130: 396S-402S.
- ROSMINI, M.R.; SEQUEIRA, G.J.; GUERRERO-LEGARRETA, I.; MARTÍ, L.E.; DALLA-SANTINA, R.; FRIZZO, L. & BONAZZA, J.C. (2004). Producción de probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 3: 187-197.
- ROSS, R.; GALVIN, M.; MCAULIFFE, O.; MORGAN, S.; RYAN, M.; TWOMEY, D.; MEANEY, W. & HILL, C. (1999). Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Anton. Leeuw.* 76: 337-346.
- ROTIMI, V.O. & DUERDEN, B.I. (1981). The development of the bacterial microbiota in normal neonates. *J. Med. Microbiol.* 14: 51-62.
- SAARELLA, M.; MOGENSEN, G.; FONDEN, R.; MÄTTÖ, J. & MAITILA-SANDHOLM, T. (2000). Probiotic bacteria: safety functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84: 197-215.

- SALMINEN, S.; DEIGHTON, M.A.; BENNO, Y. & GORBACH, S.L. (1998a). Lactic acid bacteria in health and disease. En: Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspect. S. Salminen & A. Von Wright. pp. 211-253.
- SALMINEN, S.; BOULEY, C.; BOUTRON-RUAULT, M.; CUMMINGS, J.; FRANCK, A.; GIBSON, G.; ISOLAURI, E.; MOREAU, M.; ROBERFROID, M. & ROULAND, I. (1998b). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Brit. J. Nutr.* 80: S147-S171.
- SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.; BENNO, Y. & LEE, Y.K. (1999). Probiotics: how should they be defined? *Trends Food Sci. Tech.* 10: 107-110.
- SALMINEN, S. & ISOLAURI, E. (2006). Intestinal colonization, microbiota, and probiotics. *J. Pediatr.* 149: S115-S120.
- SAVAGE, D.C.; DUBOS, R. & SCHAEDLER, R.W. (1968). The gastrointestinal epithelium and its autochthonous bacterial flora. *J. Exp. Med.* 127: 67-76.
- SAVAGE, D.C. (1984). Adherence of the normal flora. En: Attachment of organisms to the Gut Mucosa, Boedeker, E. (Ed.), Boca Raton, CRC Press, pp. 3-11.
- SAVAGE, D.C. (1986). Gastrointestinal microbiota in mammalian nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* 6: 155-178.
- SAVAGE, D.C. (1992). Growth phase, cellular hydrophobicity, and adhesion *in vitro* of lactobacilli colonizing the keratinizing gastric epithelium in the mouse. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1992-1995.
- SCHAEDLER, R.W. & DUBOS, R. (1962). The fecal flora of various strains of mice. Its bearing on their susceptibility to endotoxin. *J. Exp. Med.* 115: 1149-1159.

- SCHAEDLER, R.W.; DUBOS, R. & COSTELLO, R. (1965). The development of the bacterial flora in the gastrointestinal tract of mice. *J. Exp. Med.* 122: 59-66.
- SCHILLINGER, U. & LUCKE, F.K. (1989). Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1901-1906.
- SCHNEIDER, R.; ROSMINI, M.R.; HERMANN, M. & VOGEL, R. (2004). Identificación de bacterias lácticas componentes de la microbiota típica de los terneros criados en condiciones artificiales. *FAVE-Ciencias Veterinarias* 3: 7-15.
- SHU, Q. & GILL, H.S. (2002). Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20™) against *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 34: 59-64.
- SILVA, A.M.; BAMBIRRA, E.A.; OLIVEIRA, A.L.; SOUZA, P.P.; GOMES, D.A.; VIEIRA, E.C. & NICOLI, J.R. (1999). Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with *Salmonella enteritidis* subsp. *typhimurium* in conventional and gnotobiotic mice. *J. Appl. Microbiol.* 86: 331-336.
- SLOMIANY, B.L.; SAROSIEK, Y. & SLOMIANY, A. (1987). Gastric mucus a the mucosal barrier. *Digest. Dis. Sci.* 5: 125-145.
- SMITH, J.L. & PALUMBO, S.A. (1981). Microorganisms as food additives. *J. Food Protect.* 44: 936-955.
- SMORAGIEWICZ, W.; BIELEKA, M.; BABUCHOWSKI, A. & DUBEAU, H. (1993). Les Probiotiques. *Can. J. Microbiol.* 39: 1089-1095.
- STATGRAPHIC PLUS SOFTWARE® (1997). Statgraphic Plus para windows versión 3.0. Número de serie: 3872170. Copyright© Statistical Graphics Corp.
- STAVRIC, S.; GLEESON, T.M. & BLANCHFIELD, B. (1991). Effect of avian intestinal microflora possessing adhering and hydrophobic properties on

- competitive exclusion of *Salmonella typhimurium* from chicks. J. Appl. Bacteriol. 12: 414-421.
- SULLIVAN, Å.; BARKHOLT, L. & NORD, C.E. (2003). *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus* F19 prevent antibiotic-associated ecological disturbances of *Bacteroides fragilis* in the intestine. J. Antimicrob. Chemoth. 52: 308-311.
- SUMMANEN, P.; BARON, E. J.; CITRON, D. M.; STRONG, C.; WEXLER, H. & FINEGOLD, S.M. (1993). Wadsworth anaerobic bacteriology manual, 5th ed. Star Publishing Company, Belmont. Calif.
- TAMURA, M.; HIRAYAMA, K.; ITOH, K.; SUZUKI, H. & SHINOHARA, K. (2002). Effects of soy protein-isoflavone diet on plasma isoflavone and intestinal microflora in adult mice. Nutr. Res. 22: 705-713.
- TANNOCK, G.W. (1977) Characteristics of *Bacteroides* isolates from the cecum of conventional mice. Appl. Environ. Microbiol. 33: 745-750.
- TANNOCK, G.W. (1995). Microecology of the gastrointestinal tract in relation to lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 5: 1059-1070.
- TANNOCK, G.W.; MUNRO, K.; HARMSSEN, H.J.M.; WELLING, G.W.; SMART, J. & GOPAL, P.K. (2000). Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2578-2588.
- TEUBER, M.; PERRETEN, V. & WIRSCHING, F. (1996). Antibiotikumresistente Bakterien: eine neue Dimension in der Lebensmittelmikrobiologie. Lebensmitteltechnologie. 29: 182-199.

- TIMMERMAN, H.M.; KONING, C.J.M.; MULDER, L.; ROMBOUTS, F.M. & BEYNEN, A.C. (2004). Monostrain, multistrain and multispecies probiotics -a comparison of functionality and efficacy. *Int. J. Food Microbiol.* 96: 219-233.
- TIZARD, I.R. (1996). *Inmunología Veterinaria*. México, McGraw Hill-Interamericana.
- UNDERDAHL, N.R.; TORRES-MEDINA, A. & DOSTER, A.R. (1983). Effect of *Streptococcus faecium* C-68 in control of *Escherichia coli*-induced diarrhea in gnotobiotic pigs. *Am. J. Vet. Res.* 43: 2227-2232.
- VAN HEUGTEN, E.; FUNDERBURKE, D.W. & DORTON, K.L. (2003). Growth performance, nutrient digestibility, and fecal microflora in weanling pigs fed live yeast. *J. Anim. Sci.* 81: 1004-1012.
- VAUGHAN, E.E.; HILIG, H.G.H.; ZOETENDAL, E.G.; SATOKARI, R.; COLLINS, J.K.; AKKERMANS, A.D.L. & DE VOS, W.M. (1999). Molecular approaches to study probiotic bacteria. *Trends Food Sci. Tech.* 10: 400-404.
- VITIÑI, E.; ÁLVAREZ, S.; MEDINA, M.; MEDICI, M.; DE BUDEGUER, M. & PERDIGÓN, G. (2000). Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria. *Biocell* 24. 223-232.
- VOLLAARD, E.J. & CLASENER, H.A.L. (1994). Colonization Resistance. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 38: 409-414.
- WADSTROM, T.; ANDERSON, K.; SYDOW, M.; AXELSSON, L.; LINDGREN, S. & GULLMAR, B. (1987). Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. *J. Appl. Bacteriol.* 62: 513-520.
- WALKER, D.K. & GILLILAND, S.E. (1993). Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* 76: 956-961.

- YOSHIOKA, Y.; KUDO, S.; NISHIMURA, H.; YAJIMA, T.; KISHIHARA, K.; SAITO, K.; SUZUKI, T.; SUZUKI, Y.; KUROIWA, S. & YOSHIKAI, Y. (2005). Oral administration of bovine colostrum stimulates intestinal intraepithelial lymphocytes to polarize Th1-type in mice. *Int. Immunopharmacol.* 5: 581-590.
- ZIEMER, CH.J. & GIBSON, G.R. (1998). An overview of probiotics, prebiotics and symbiotics in the functional food concepts: perspectives and future strategies. *Int. Dairy J.* 8: 473-479.