



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

DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA

**Desarrollo de un inóculo de bacterias lácticas indígenas para
mejorar el estado sanitario de los terneros lactantes criados
artificialmente**

AUTOR: M. Sc. Vet. Laureano Sebastián FRIZZO

DIRECTOR: Dr. Marcelo Raúl ROSMINI

CODIRECTORA: Dra. Gabriela del Valle PERDIGÓN

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

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Universidad Nacional del Litoral

Santa Fe, Marzo de 2010

Dedico este trabajo a mis dos amores, Natalia y Sofía por darme la fuerza y el coraje necesario en mi diario caminar y a mis padres Gloria y Domingo, responsables de mi pasar por esta tierra y a quienes agradezco el haberme inculcado el don de la perseverancia.

La enfermedad es, usualmente, el resultado de negociaciones inconclusas a favor de la simbiosis, es el pasar la línea de una parte u otra, un error biológico en la interpretación de las fronteras. Lewis Thomas.

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 la Dra. Gabriela PERDIGÓN, por su apoyo en el diseño de los ensayos y su mirada crítica y constructiva de las actividades realizadas; y por darme una mano siempre que la solicité.

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, por fomentar la formación de posgrado y por todo el apoyo incondicional que me brindara para la realización de este trabajo de tesis.

A la Comunidad Universitaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.

A la Universidad Nacional del Litoral por brindar apoyo económico a través de los proyectos CAI+D y posibilitar así la realización de este trabajo de investigación.

Al Med. Vet. Roberto RODRÍGUEZ ARMESTO, por sus sabias recomendaciones.

A la memoria del Med. Vet. Carlos PERALTA, por su colaboración desinteresada y su irremplazable apoyo en el estudio histopatológico.

A la memoria de la Bioq. María OCHOTECO, por su contribución en los estudios hematológicos y bioquímicos.

Al Laboratorio de Investigaciones Histológicas Aplicadas, especialmente la M Sc. Natalia SALVETTI y al Dr. Hugo ORTEGA por su invaluable colaboración en el estudio inmunohistoquímico.

Al Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio (CEBB) por ceder gentilmente sus instalaciones, equipos y utensilios.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por premiarme con una Beca de Doctorado que fue fuente del sostenimiento familiar durante mis estudios.

Al Grupo funcional Crianza Artificial de Terneros (CAT), por su contribución indispensable en la crianza de los animales.

A mi compañera de trabajo Lorena SOTO, por su aguante y por estar firme al timón cuando más lo necesitaba.

A Ezequiel BERTOZZI, Virginia ZBRUN, Hilda HENZENN, Elizabeht AVATANEO, Alejandra RASPINI, Andres POITEVIN, Nadia AGÜERO y María MAYR, 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 GENERAL

	Página
ABREVIATURAS UTILIZADAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La utilización de los antibióticos y su resistencia en la producción animal	2
1.2. La microbiota intestinal	3
1.3. Los probióticos como herramienta alternativa a los antibióticos	7
1.4. Mecanismos de acción de la microbiota probiótica	14
1.5. Evaluación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de las capacidades probióticas microbianas orientadas al diseño de inóculos probióticos multiespecie	16
2. OBJETIVOS	26
2.1. Hipótesis	27
2.2. Objetivo general	27
2.3. Objetivos específicos	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1. Efecto de la suplementación con tres bacterias ácido lácticas de origen bovino sobre la translocación bacteriana, la toxicidad oral aguda, la colonización intestinal, la performance de crecimiento y el estado sanitario	30
3.1.1. Animales e instalaciones	30
3.1.2. Composición de los alimentos	30
3.1.3. Microorganismos	30
3.1.4. Selección de mutantes resistentes a rifampicina	31
3.1.5. Diseño del experimento	31

3.1.6. Preparación y administración del inóculo	32
3.1.7. Análisis coproparasitológico de las muestras fecales	33
3.1.8. Perfil bioquímico sanguíneo y leucograma	33
3.1.9. Necropsias	34
3.1.10. Recuperación del inóculo desde distintos sectores del intestino de los terneros	34
3.1.11. Prueba de translocación	35
3.1.12. Análisis estadístico	35
3.2. Influencia del inóculo de BAL y el suero de queso sobre la performance de crecimiento y el estado sanitario de los terneros	35
3.2.1. Animales e instalaciones	35
3.2.2. Microorganismos	36
3.2.3. Diseño del experimento	36
3.2.4. Análisis coproparasitológico de las muestras fecales	37
3.2.5. Perfil bioquímico sanguíneo	37
3.2.6. Ingestión de calostro	38
3.2.7. Preparación y administración del inóculo	38
3.2.8. Composición de los alimentos	38
3.2.9. Análisis estadístico	39
3.3. Incorporación de bacterias ácido lácticas y lactosa a la dieta de terneros jóvenes y su efecto sobre la performance de crecimiento y el balance microbiano intestinal	39
3.3.1. Animales e instalaciones	39
3.3.2. Ingestión de calostro	40
3.3.3. Microorganismos	40
3.3.4. Diseño del experimento	40
3.3.5. Preparación del inóculo	41
3.3.6. Composición de los alimentos	41

3.3.7. Pruebas microbiológicas	42
3.3.8. Necropsias	42
3.3.9. Procesamiento de las muestras para la técnicas histológica	43
3.3.10. Técnica de inmunohistoquímica	43
3.3.11. Análisis de los resultados obtenidos con inmunohistoquímica	44
3.3.12. Análisis estadístico	45
3.4. Incorporación de bacterias ácido lácticas y lactosa a la dieta de terneros jóvenes y su efecto sobre la colonización intestinal de <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T y la invasión a los órganos internos de terneros alimentados con sustituto lácteo	45
3.4.1. Animales e instalaciones	45
3.4.2. Microorganismos	46
3.4.3. Selección de mutantes resistentes a antibióticos	47
3.4.4. Preparación y administración del inóculo de BAL	47
3.4.5. Inoculación del patógeno	48
3.4.6. Perfil bioquímico sanguíneo y leucograma	48
3.4.7. Temperatura corporal	49
3.4.8. Diseño del experimento	49
3.4.9. Detección de <i>Salmonella dublin</i> en sangre	55
3.4.10. Detección de <i>Salmonella dublin</i> en materia fecal	55
3.4.11. Necropsias	55
3.4.12. Recuperación del inóculo de BAL y recuento de <i>Lactobacillus</i> y coliformes en materia fecal	56
3.4.13. Recuperación del inóculo de BAL y de <i>Salmonella dublin</i> desde distintos sectores del intestino de los terneros	56
3.4.14. Prueba de translocación bacteriana	57
3.4.15. Detección de <i>Salmonella dublin</i> en órganos y fluidos del medio interno	57
3.4.16. Procesamiento de las muestras y ensayo histopatológico	58

3.4.17. Composición de los alimentos	58
3.4.18. Análisis estadístico	58
4. RESULTADOS	59
4.1. Efecto de la suplementación con tres bacterias ácido lácticas de origen bovino sobre la translocación bacteriana, la toxicidad oral aguda, la colonización intestinal, la performance de crecimiento y el estado sanitario	60
4.1.1. Recuperación de la flora láctica y del inóculo a nivel intestinal	60
4.1.2. Estudio de translocación	61
4.1.3. Efecto del tratamiento sobre la performance de crecimiento de los animales	62
4.1.4. Efecto del tratamiento sobre la frecuencia de diarreas, el índice de consistencia fecal y la tasa de mortalidad	64
4.1.5. Perfil bioquímico sanguíneo, leucograma e índice de peso esplénico ..	65
4.2. Influencia del inóculo de BAL y el suero de queso sobre la performance de crecimiento y el estado sanitario de los terneros	67
4.2.1. Efecto del tratamiento sobre la performance de crecimiento de los animales	67
4.2.2. Efecto del tratamiento sobre la frecuencia de diarreas, el índice de consistencia fecal, la carga parasitaria y la tasa de mortalidad	69
4.2.3. Perfil bioquímico sanguíneo	70
4.3. Incorporación de bacterias ácido lácticas y lactosa a la dieta de terneros jóvenes y su efecto sobre la performance de crecimiento y el balance microbiano intestinal	71
4.3.1. Efecto del tratamiento sobre la performance de crecimiento de los animales	71
4.3.2. Efecto del tratamiento sobre la frecuencia de diarreas, el índice de consistencia fecal y la tasa de mortalidad	75
4.3.3. Efecto del tratamiento sobre las poblaciones microbianas de coliformes y <i>Lactobacillus</i>	75

4.3.4. Recuperación de la flora láctica a nivel intestinal del yeyuno	76
4.3.5. Índice de peso esplénico	77
4.3.6. Estudio inmunohistoquímico	77
4.3.6.1. Marcación de IgA en yeyuno	77
4.3.6.2. Marcación de linfocitos B en nódulos linfáticos	78
4.4. Incorporación de bacterias ácido lácticas y lactosa a la dieta de terneros jóvenes y su efecto sobre la colonización intestinal de <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T y la invasión a los órganos internos en terneros alimentados con sustituto lácteo	79
4.4.1. Efecto del tratamiento sobre el peso de los animales antes de la infección con el patógeno	79
4.4.2. Efecto del tratamiento sobre el consumo de agua de los animales antes y durante la infección con el patógeno	80
4.4.3. Efecto del tratamiento sobre la temperatura de los animales antes y durante la infección con el patógeno	81
4.4.3.1. Temperatura rectal	81
4.4.3.2. Correlación entre la temperatura rectal y timpánica	81
4.4.4. Índice de consistencia fecal y frecuencia de diarreas en terneros antes y durante la infección con el patógeno	82
4.4.5. Indicadores clínicos del estado de salud en terneros antes y durante la infección con el patógeno	83
4.4.6. Efecto del tratamiento sobre las poblaciones microbianas fecales de coliformes y <i>Lactobacillus</i> en terneros jóvenes antes de la infección con <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T	84
4.4.7. Detección de <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T en materia fecal	86
4.4.8. Detección de <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T en sangre	86
4.4.9. Efecto del tratamiento sobre las poblaciones microbianas de coliformes, <i>Lactobacillus</i> , <i>Salmonella</i> y del inóculo experimental en distintos sectores del tracto intestinal de terneros jóvenes infectados con	

<i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T	87
4.4.10. Translocación de poblaciones microbianas en terneros jóvenes infectados con <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T	88
4.4.11. Relación entre las poblaciones microbianas presentes en los distintos sectores intestinales y en el medio interno	90
4.4.12. Índice de peso esplénico en terneros jóvenes infectados con <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T	91
4.4.13. Índice de lesiones microscópicas y macroscópicas en terneros jóvenes infectados con <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T	92
4.4.14. Parámetros sanguíneos en terneros jóvenes infectados con <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T	97
4.4.14.1. Serie eritrocítica	97
4.4.14.2. Serie leucocítica	98
4.4.15. Niveles de enzimas hepáticas en terneros jóvenes infectados con <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T	100
4.4.16. Niveles de bilirrubina en terneros jóvenes infectados con <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T	101
4.4.17. Niveles de fibrinógeno y proteínas totales en terneros jóvenes infectados con <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T	102
4.4.18. Niveles de urea y creatinina en terneros jóvenes infectados con <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T	103
4.4.19. Niveles de haptoglobina en terneros jóvenes infectados con <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T	103
5. DISCUSIÓN	105
5.1. Efecto de la suplementación con tres bacterias ácido lácticas de origen bovino sobre la translocación bacteriana, la toxicidad oral aguda, la colonización intestinal, la performance de crecimiento y el estado sanitario	106
5.2. Influencia del inóculo de BAL y el suero de queso sobre la performance de crecimiento y el estado sanitario de los terneros	113

5.3. Incorporación de bacterias ácido lácticas y lactosa a la dieta de terneros jóvenes y su efecto sobre la performance de crecimiento y el balance microbiano intestinal	119
5.4. Incorporación de bacterias ácido lácticas y lactosa a la dieta de terneros jóvenes y su efecto sobre la colonización intestinal de <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T y la invasión a los órganos internos de terneros alimentados con sustituto lácteo	124
6. CONCLUSIONES	134
7. BIBLIOGRAFÍA	139

ABREVIATURAS UTILIZADAS*

5'-Nt	5 nucleotidasa
AIHQM	Área inmunohistoquímicamente marcada
ALT	alaninoaminotransferasa
ANOVA	Análisis de la variancia
AST	Aspartatoaminotransferasa
BAL	Bacterias ácido lácticas
BBA	Agar sangre brucella
BD	Bilirrubina directa
BHI	Del inglés "Brain heart infusión" (Infusión cerebro corazón)
BT	Bilirrubina total
CA	Conversión alimenticia
CAC	Consumo de alimento concentrado
Cag	Consumo de agua
CD	Cluster de diferenciación
CTA	Consumo total de alimentos
DAB	Diaminobencidina
DSPV	Departamento de Salud Pública Veterinaria
FA	Fenilalanina
FAIc	Fosfatasa alcalina
G-BAL	Grupo inoculado con BAL
G-BAL-L	Grupo inoculado con BAL y lactosa
G-C	Grupo control
GGT	gamaglutamil-transpeptidasa
GPV	Ganancia de peso vivo
H	Altura
ICF	Índice de consistencia fecal
IgA	Inmunoglobulina A
ILMacro	Índice de lesiones macroscópicas
ILMicro	Índice de lesiones microscópicas
IPE	Índice de peso esplénico
KF	Medio KF para enterococos

LAMVAB	Del inglés “ <i>Lactobacillus</i> Anaerobic MRS with Vancomycin and Bromocresol green”
LAMVAB_{rif}	LAMVAB suplementado con rifampicina
LIA	Lisina descarboxilasa
MRS	Medio de Man, Rogosa y Sharpe para lactobacilos
MRS_{rif}	MRS suplementado con rifampicina
MS	Materia seca
NL	Nódulo linfático
NPT	Nódulo paratifoideo
P₀L₀	Grupo sin probiótico y sin lactosa
P₀L₁	Grupo sin probiótico+lactosa en nivel 1 (100 g/d)
P₀L₂	Grupo sin probiótico+lactosa en nivel 2 (200 g/d)
P₁L₀	Grupo con probiótico y sin lactosa
P₁L₁	Grupo con probiótico+lactosa en nivel 1 (100 g/d)
P₁L₂	Grupo con probiótico+lactosa en nivel 2 (200 g/d)
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMN	Polimorfonucleares
PT	Perímetro torácico
PT	Proteínas totales
PV	Peso vivo
SIM	Sulfhídrico, indol, motilidad
SLA	Sin lesión aparente
SNC	Suero normal de cabra
TND	Total de nutrientes digestibles
TSI	Del inglés “triple sugar iron” (hierro tres azúcares)
UFC	Unidad formadora de colonia
VIC	Válvula ileocecal
VRBL	Medio Violeta rojo y bilis lactosa para coliformes
XLD	Medio xilosa lisina deoxicolato
XLD_{nov nal}	XLD suplementado con novobiocina y ácido nalidíxico

* No se incorporaron las utilizadas por el Sistema Internacional de Unidades (SI).

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Productos probióticos para terneros jóvenes encontrados en el mercado	19
Tabla 2. Infectividad de bacterias ácido lácticas y levaduras	21
Tabla 3. Detalle de los anticuerpos primarios utilizados en la técnica de inmunohistoquímica	44
Tabla 4. Indicadores de la intensidad del nivel de deshidratación	50
Tabla 5. Indicadores de la intensidad de las lesiones macroscópicas utilizados para la elaboración del índice de lesiones macrocópicas (ILMacro) en los órganos diana estudiados	51
Tabla 6. Indicadores de la intensidad de las lesiones microscópicas utilizados para la elaboración del índice de lesiones macrocópicas (ILMicro) en los órganos diana estudiados	51
Tabla 7. Indicadores de la intensidad de las lesiones microscópicas utilizados para la elaboración del índice de lesiones macrocópicas (ILMicro) en los órganos no diana estudiados	53
Tabla 8. Translocación bacteriana en diferentes tejidos después de la administración del inóculo probiótico en el grupo control (G-C) y en el grupo inoculado (G-BAL)	61
Tabla 9. Performance de crecimiento de terneros suplementados (G-BAL) y no suplementados (G-C) con el inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis de 10^9 UFC/kg PV durante 35 d	63
Tabla 10. Índice de consistencia fecal, análisis coproparasitológico y frecuencia de diarreas en terneros suplementados (G-BAL) y no suplementados (G-C) con el inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis de 10^9 UFC/kg PV durante 35 d	64
Tabla 11. Performance de crecimiento de terneros alimentados con suero de queso y suplementados (G-BAL) y no suplementados (G-C) con el inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis de 10^9 UFC/kg PV	

durante 35 d	67
Tabla 12. Índice de consistencia fecal, análisis coproparasitológico y frecuencia de diarreas en terneros alimentados con suero de queso y suplementados (G-BAL) y no suplementados (G-C) con el inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis de 10^9 UFC/kg PV durante 35 d ...	69
Tabla 13. Parámetros bioquímicos sanguíneos en terneros alimentados con suero de queso y suplementados (G-BAL) y no suplementados (G-C) con el inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis de 10^9 UFC/kg PV durante 35 d	70
Tabla 14. Performance de crecimiento de terneros suplementados con lactosa a tres niveles (L_0 , L_1 y L_2) y suplementados con probióticos a 2 niveles (P_0 y P_1)	72
Tabla 15. Índice de consistencia fecal de terneros suplementados con lactosa a tres niveles (L_0 , L_1 y L_2) y suplementados con probióticos a 2 niveles (P_0 y P_1)	74
Tabla 16. Detección de <i>Salmonella dublin</i> en materia fecal de terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T	86
Tabla 17. Translocación de <i>Salmonella dublin</i> en sangre de terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T	86
Tabla 18. Translocación de <i>Salmonella dublin</i> en órganos y fluidos corporales de terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg	

PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e 90
infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. La ventana crítica del desarrollo inmunológico	8
Figura 2. Respuesta inmune a un microorganismo patógeno que ingresa al cuerpo de un organismo superior	15
Figura 3. El ecosistema gastrointestinal y el complejo sistema inmune de mucosas	16
Figura 4. Recuperación de la flora láctica desde la microbiota intestinal de los terneros suplementados (G-BAL) y no suplementados (G-C) con el inóculo de bacterias ácido lácticas	60
Figura 5. Translocación bacteriana en diferentes tejidos después de la administración del inóculo probiotico en el grupo control (G-C) y en el grupo inoculado (G-BAL)	62
Figura 6. Parámetros bioquímicos sanguíneos en terneros suplementados (G-BAL) y no suplementados (G-C) con el inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis de 10^9 UFC/kg PV durante 35 d	65
Figura 7. Parámetros sanguíneos en terneros suplementados (G-BAL) y no suplementados (G-C) con el inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis de 10^9 UFC/kg PV durante 35 d	65
Figura 8. Índice de peso esplénico en terneros suplementados (G-BAL) y no suplementados (G-C) con el inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis de 10^9 UFC/kg PV durante 35 d	66
Figura 9. Recuentos en las poblaciones de coliformes y <i>Lactobacillus</i> y relación <i>Lactobacillus</i> /coliformes y <i>Lactobacillus</i> -coliformes en la materia fecal de los terneros suplementados con lactosa a tres niveles (L_0 , L_1 y L_2) y suplementados con probióticos a 2 niveles (P_0 y P_1) ...	75
Figura 10. Recuperación de la flora láctica desde el yeyuno de los terneros suplementados con lactosa a tres niveles (L_0 , L_1 y L_2) y suplementados con probióticos a 2 niveles (P_0 y P_1)	76

- Figura 11.** Índice de peso esplénico de terneros suplementados con lactosa a tres niveles (L_0 , L_1 y L_2) y suplementados con probióticos a 2 niveles (P_0 y P_1) 77
- Figura 12.** Inmunomarcación de IgA en el yeyuno de terneros suplementados con lactosa a tres niveles (L_0 , L_1 y L_2) y suplementados con probióticos a 2 niveles (P_0 y P_1) 77
- Figura 13.** Inmunomarcación de linfocitos B en nódulos linfáticos de terneros suplementados con lactosa a tres niveles (L_0 , L_1 y L_2) y suplementados con probióticos a 2 niveles (P_0 y P_1) 79
- Figura 14.** Peso vivo de los terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) previo a la infección con *Salmonella dublin* DSPV 595T 80
- Figura 15.** Consumo de agua de los terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) previo y durante la infección con *Salmonella dublin* DSPV 595T 80
- Figura 16.** Temperatura rectal de los terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) previo y durante la infección con *Salmonella dublin* DSPV 595T 81
- Figura 17.** Correlación entre la temperatura rectal y timpánica de los terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g

- de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) previo y durante la infección con *Salmonella dublin* DSPV 595T 82
- Figura 18.** Índice de consistencia fecal y frecuencia de diarreas en terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/Kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T 82
- Figura 19.** Indicadores clínicos del estado de salud en terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T 83
- Figura 20.** Recuentos en las poblaciones de coliformes y *Lactobacillus* y relación *Lactobacillus*/coliformes y *Lactobacillus*-coliformes en la materia fecal de terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T 85
- Figura 21.** Recuentos en las poblaciones de coliformes, *Lactobacillus*, *Salmonella* e inóculo experimental en distintos sectores del tracto intestinal de terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T 87
- Figura 22.** Relación *Lactobacillus*/coliformes y *Lactobacillus*-coliformes en

- distintos sectores del tracto intestinal de terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T 88
- Figura 23.** Translocación bacteriana en terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/Kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T 89
- Figura 24.** Relación entre las poblaciones microbianas presentes en los distintos sectores intestinales y en el medio interno de terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T 90
- Figura 25.** Índice de peso esplénico en terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T 91
- Figura 26.** Índice de lesiones microscópicas (ILMicro) y macroscópicas (ILMacro) en terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 92

595T	
Figura 27. Lesiones microscópicas en el hígado y el bazo de terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T	94
Figura 28. Lesiones microscópicas en el íleon de terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T	95
Figura 29. Lesiones microscópicas en la válvula ileocecal de terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T	96
Figura 30. Parámetros sanguíneos (serie eritrocítica) en terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T	98
Figura 31. Parámetros sanguíneos (serie leucocítica) en terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con <i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T	99

- Figura 32.** Niveles de enzimas hepáticas en terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T 100
- Figura 33.** Niveles de bilirrubina en terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T 101
- Figura 34.** Niveles de fibrinógeno y proteínas totales en terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T 102
- Figura 35.** Niveles de urea y creatinina en terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T 103
- Figura 36.** Niveles de haptoglobina en terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T 104

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un inóculo de bacterias ácido lácticas indígenas con capacidad probiótica que sea capaz de mejorar el estado sanitario de los terneros criados en forma artificial durante las primeras cuatro semanas de vida y les brinde protección frente a las bacterias patógenas productoras de diarrea. Para ello se evaluó la capacidad de un inóculo de BAL integrado por 3 cepas lácticas de origen bovino: *Lactobacillus casei* DSPV 318T, *Lactobacillus salivarius* DSPV 315T y *Pediococcus acidilactici* DSPV 006T para mejorar los índices de conversión y el aumento de peso diario de los animales suplementados con un probiótico en la etapa de crianza artificial. Además, se evaluó el potencial del inóculo de BAL junto a suero de queso y lactosa para disminuir la incidencia de diarreas, o paliar sus efectos adversos, en los animales en la etapa de crianza artificial. También se estudió la capacidad del inóculo de BAL para brindar protección frente a *Salmonella dublin* DSPV 595T.

A través de 4 estudios *in vivo* se evaluó la capacidad de colonización intestinal y translocación al medio interno. Se estudió la toxicidad oral aguda, la performance de crecimiento y el estado sanitario en un modelo de crianza estándar y en 2 modelos que generaron estrés nutricional (incorporación de suero de queso y lactosa). Posteriormente, se utilizó un modelo de enfermedad (salmonelosis) en el cual se evaluó el efecto del inóculo sobre la colonización intestinal de *Salmonella dublin* DSPV 595T y la invasión a los órganos internos de terneros jóvenes alimentados con sustituto lácteo.

El inóculo utilizado fue capaz de superar las barreras biológicas del tracto gastrointestinal, alojarse y permanecer en el intestino de los terneros sin translocar a los órganos del medio interno. La administración del inóculo no produjo efectos adversos sobre el estado de salud general, el crecimiento y el desarrollo de los animales del experimento, lo cual demostró la inexistencia de toxicidad oral aguda. La ausencia de diarrea y la sobrevivencia normal de los individuos, junto a la ausencia de translocación al medio interno por parte de los microorganismos utilizados, sugieren que las cepas utilizadas no son patogénicas y son seguras para ser utilizadas como aditivo alimentario en la dieta de los terneros.

Cuando el inóculo microbiano se puso a prueba en el modelo de estrés nutricional, los microorganismos que integraron el inóculo demostraron su accionar benéfico y podrían utilizarse para prevenir algunos tipos de diarrea de origen nutricional. Estos

microorganismos modificaron, de alguna manera, los patrones del flujo de nutrientes en el intestino, lo cual tuvo efectos benéficos sobre la utilización del alimento por parte de los animales. Los terneros inoculados habrían utilizado mejor la lactosa y las proteínas del suero de queso, lo cual se manifestó con una mejor performance de crecimiento. El inóculo estudiado favoreció el consumo precoz de alimento concentrado e, indirectamente, podría estimular el crecimiento temprano de los preestómagos, permitiendo un destete anticipado de los animales. Esto tiene una fuerte relevancia sobre los costos de producción y la sustentabilidad del sistema de crianza. Esta observación justifica el empleo del inóculo junto al suero de queso y la lactosa durante la crianza de los terneros jóvenes. La utilización del inóculo mejoró la performance de crecimiento de los terneros, contribuyó positivamente sobre el estado sanitario al disminuir el índice de consistencia fecal y fue capaz de mantener una carga microbiana estable de *Lactobacillus* spp. La lactosa mantuvo estable los recuentos de esta población microbiana en una etapa crítica del desarrollo de los animales.

En cuanto al ensayo *in vivo* frente a *Salmonella*, la administración del inóculo probiótico no fue totalmente eficiente para contrarrestar la infección de *Salmonella dublin* para la concentración administrada. Aunque el inóculo probiótico no interferiría en el mecanismo de ingreso del patógeno al medio interno, el porcentaje de lesiones completas presentes en toda la serie de necropsias ha sido siempre menor en los grupos tratados y especialmente en el grupo de probióticos más lactosa. La aparición de las lesiones, al momento de realizar las necropsias, se mostró claramente diferenciada; mientras que en el grupo control surgen a las pocas horas de la infección y son constantes; en los animales inoculados con el probiótico son más tardías e inconstantes y, además, son de menor intensidad en el grupo de probiótico más lactosa. Así, el inóculo probiótico estaría demostrando capacidad para modificar la respuesta de los individuos ante la agresión del patógeno, a pesar de la alta dosis de *Salmonella* recibida.

Todo esto demuestra que el inóculo puede ser incorporado en la dieta de los terneros como un inóculo probiótico multiespecie para mejorar condiciones productivas y sanitarias.

Palabras clave: Bacterias ácido lácticas - diarreas - probiótico multiespecies - *Salmonella dublin* - Terneros jóvenes.

ABSTRACT

The purpose of this study was to develop an inoculum of indigenous lactic acid bacteria (LAB) with probiotic capacity that is capable of improving the health status of calves bred artificially for the first four weeks of life and provide them with protection against pathogenic bacteria producing diarrhea. The ability of an inoculum composed by 3 LAB strains of bovine origin, *Lactobacillus casei* DSPV 318T, *Lactobacillus salivarius* DSPV 315T and *Pediococcus acidilactici* DSPV 006T, to improve feed efficiency and daily weight gain of animals supplemented with a probiotic in the process of intensive rearing were assessed. In addition, the inoculum of LAB with whey and lactose to reduce the incidence of diarrhea, or mitigate its adverse effects in animals at the stage of artificial rearing were evaluated. Moreover, the ability of the inoculum of LAB to provide protection against *Salmonella dublin* DSPV 595T were studied.

Four *in vivo* studies were carried out. The ability of intestinal colonization and translocation to the internal environment was evaluated. We studied the acute oral toxicity, the growth performance and health status in standard model and in two models of nutritional stress (addition of whey and lactose). Subsequently, we used a model of disease (salmonellosis) in which the effect of inoculum on the intestinal colonization of *Salmonella dublin* DSPV 595T and the invasion of the internal organs of calves fed milk replacer were studied.

The inoculum used was able to overcome the biological barriers of the gastrointestinal tract, stay and remain in the intestine of calves without translocate to internal organs. The administration of the inoculum did not produce adverse effects on general health status, growth and development of the animals in the experiment, which showed no acute oral toxicity. The absence of diarrhea and normal survival of individuals, together with the absence of translocation of the used microorganisms to the internal environment suggest that these strains are safe and not pathogenic for use as feed additive in the diet of calves.

When the microbial inoculum was tested in the model of nutritional stress, microbial inoculum demonstrated a beneficial action and could be used to prevent some types of diarrhea of nutritional origin. These microorganisms modified, in some way, the patterns of nutrient flux in the intestine, which had beneficial effects on the utilization of feed by animals. Inoculated calves used lactose and whey proteins in more adequated

form, which is expressed in high growth performance. The inoculum studied favored early starter intake and, indirectly, may stimulate the ruminant growth, allowing an early weaning of the animals. This has a strong importance on production costs and sustainability of the rearing system. This observation justifies the use of inoculum with the whey and lactose during the rearing of calves. The use of inoculum improved the growth performance of calves, contributed positively on health status by reducing the fecal consistency index and was able to maintain a stable microbial load of *Lactobacillus* spp. Lactose remained stable counts of this microbial population in a critical stage of development of animals.

With regard to the challenge *in vivo* against *Salmonella*, the administration of the probiotic inoculum was not totally effective to counteract the infection of *Salmonella dublin* to the concentration administered. Although the probiotic inoculum does not interfere in the mechanism of pathogen entry to the internal environment, the percentage of lesions present throughout the full range of necropsies has always been lower in the treated groups and especially in the probiotic group plus lactose. The appearance of lesions, at the time of the necropsies, was clearly differentiated; while in the control group emerge within hours of infection and are constant in the animals inoculated with the probiotic were more delayed and variable, and moreover, are less intense in the probiotic group plus lactose. Thus, the probiotic inoculum is demonstrating the capacity to modify the response of individuals to the pathogen attack, despite the high dose of *Salmonella* received.

All this shows that the inoculum can be incorporated into the diet of calves as a multispecies probiotic inoculum to improve performance and sanitary conditions.

Key words: lactic acid bacteria - diarrhea - multispecies probiotic - *Salmonella dublin* - young calves.

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

Publicaciones:

Frizzo, L.S.; Soto, L.P.; Bertozzi, E.; Sequeira, G.; Martí, L.E. y 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: 69-80.

Frizzo, L.S.; Bertozzi, E.; Soto, L.P.; Zbrun; M.V.; Sequeira, G.; Dalla Santina, R.; Rodríguez Armesto, R. y Rosmini, M.R. (2008) *The effect of supplementation with three lactic acid bacteria from bovine origin on growth performance and health status of young calves*. J. Anim. Vet. Adv. 7: 400-408.

Frizzo, L.S.; Bertozzi, E.; Soto, L.P.; Sequeira, G.; Rodríguez Armesto, R. y Rosmini, M.R. (2010a) *Studies on translocation, acute oral toxicity and intestinal colonization of potentially probiotic lactic acid bacteria administered during calf rearing*. Livest. Sci. 128: 28-35.

Frizzo, L.S.; Soto, L.P.; Zbrun, M.V.; Bertozzi, E.; Sequeira, G.; Rodríguez Armesto, R. y Rosmini, M.R. (2010b) *Lactic acid bacteria to improve growth performance in young calves fed milk replacer and spray dried whey powder*. Anim. Feed Sci. Tech. En prensa.

Frizzo, L.S., Soto, L.P., Zbrun, M.V., Bertozzi, E., Sequeira, G., Rodríguez Armesto, R. y Rosmini, M.R. (2010c) *Effect of lactic acid bacteria and lactose on growth performance and intestinal microbial balance of artificially reared calves*. Livest. Sci. Enviado.

Frizzo, L.S., Soto, L.P., Bertozzi, E., Zbrun, M.V., Signorini, M.L., Sequeira, G., Rodríguez Armesto, R. y Rosmini, M.R. (2010d) *Intestinal populations of Lactobacilli and coliforms after in vivo Salmonella dublin challenge and their relationship with microbial translocation in calves supplemented with lactic acid bacteria and lactose*. Vet. Microbiol. Enviado.

Frizzo, L.S., Zbrun, M.V., Soto, L.P., Bertozzi, E., Sequeira, G., Rodríguez Armesto, R. y Rosmini, M.R. (2010e) *Pathogen translocation and histopathological lesions in*

experimental model of Salmonella dublin infection in calves supplemented with lactic acid bacteria and lactose. Vet. Pathol. Enviado.

Frizzo, L.S., Zbrun, M.V., Soto, L.P., Bertozzi, E., Sequeira, G., Rodríguez Armesto, R. y Rosmini, M.R. (2010f) *Haptoglobin as a marker of ability of lactic acid bacteria and lactose to interfere against Salmonella dublin infection in hyper acute model in young calves.* Res. Vet. Sci. Enviado.

Presentaciones en Jornadas, Congresos y Simposios:

Frizzo L., Soto L., Bertozzi E., Zbrun V., Sequeira G., Perdigón G. y Rosmini M.R. (2004) Evaluación de la capacidad de translocación y colonización intestinal de bacterias ácido lácticas administradas a terneros lactantes. XVII Congreso Latinoamericano de Microbiología y X Congreso Argentino de Microbiología, Buenos Aires, 17 al 21 de octubre.

Frizzo L.S., Bertozzi E., Zbrun V., Soto L., Sequeira G., Martí, L.E., Dalla Santina R., Rodríguez Armesto R., Perdigón G. y Rosmini M.R. (2004) Suplementación de terneros lactantes con bacterias ácido lácticas y suero de queso como estrategia profiláctica y refuerzo nutricional. Simposio Internacional de Biotecnología, Aplicaciones en Alimentos, Salud y Medio Ambiente. II Simposio Argentino-Italiano de Bacterias Lácticas, San Miguel de Tucumán, 2 al 5 de noviembre. p. 93.

Frizzo L.S., Bertozzi E., Zbrun V., Soto L., Sequeira G., Martí, L.E., Peralta C., Rodríguez Armesto R., Perdigón G. y Rosmini M.R. (2004) Efectos de un inóculo de bacterias ácido lácticas sobre la ganancia de peso e incidencia de diarreas en terneros lactantes. Simposio Internacional de Biotecnología, Aplicaciones en Alimentos, Salud y Medio Ambiente. II Simposio Argentino-Italiano de Bacterias Lácticas, San Miguel de Tucumán, 2 al 5 de noviembre. p. 94.

Frizzo, L.S. (2005) Utilización de probióticos en terneros lactantes como estrategia de prevención en producción primaria. XXIV Jornadas de Actualización en Medicina Veterinaria. La Falda, 17 y 18 de septiembre.

Frizzo, L.S.; Soto, L.P.; Bertozzi, E.; Mayr, M.; Bonazza, J.C.; Sequeira, G.; Martí, L.E.; Rodríguez Armesto, R. y Rosmini, M.R. (2006) Modificación en la población de *Lactobacillus* y *Coliformes* en la materia fecal de terneros suplementados con

- bacterias lácticas y lactosa. II Simposio Internacional de Bacterias Lácticas. Primer encuentro Red BAL Argentina, San Miguel de Tucumán, 11 al 13 de octubre. p. 168.
- Frizzo, L.S.; Soto, L.P.; Bertozzi, E.; Mayr, M.; Bonazza, J.C.; Poppino, F.; Sequeira, G.; Martí, L.E.; Rodríguez Armesto, R. y Rosmini, M.R. (2006) Mejoras en performance de crecimiento de terneros lactantes suplementados con bacterias lácticas y lactosa. 29^{no} Congreso Argentino de Producción Animal. Mar del Plata, 18 al 20 de octubre. p. 391-392.
- Frizzo, L. (2007) Bacterias lácticas en la dieta de los terneros para evitar diarreas y mejorar la eficiencia de crecimiento. Exposición Oral. Taller Bacterias lácticas probióticas: nuevas tendencias y aplicaciones. Actividad organizada por la Subcomisión de Bacterias Lácticas (Red BAL), de la Asociación Argentina de Microbiología. XI Congreso Argentino de Microbiología. Córdoba, 10 al 12 de octubre.
- Henzenn, H.; Bertozzi, E. y Frizzo, L.S. (2007) Puesta a punto de un modelo experimental de salmonelosis bovina destinado a medir el nivel de protección de probióticos. XI Encuentro Jóvenes Investigadores. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, 10 y 11 de octubre.
- Henzenn, H., Frizzo, L.S., Bertozzi, E., Soto, L.P., Dalla Santina, R., Sequeira, G.J., Rosmini, M.R. (2008) Modificación de los parámetros bioquímicos y hematológicos en un modelo experimental de salmonelosis destinado a medir el nivel de protección de probióticos. IX Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas 2008. Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad Nacional de Rosario. Casilda, 6 de agosto.
- Frizzo, L.S.; Soto, L.P.; Henzenn, H.I.; Bertozzi, E.; Raspini, A.; Dalla Santina, R.O.; Rosmini, M.R. (2008) Estudio de translocación de bacterias ácido lácticas administradas a terneros jóvenes infectados con *Salmonella dublin*. X Congreso y XXVIII Reunión de la Sociedad de Biología de Rosario. Universidad Nacional de Rosario. Rosario, 3 al 5 de diciembre.
- Frizzo, L.S.; Soto, L.P.; Salvetti, N.R.; Zbrun, M.V.; Sequeira, G.J.; Ortega, H.H. y Rosmini, M.R. (2009) Immunostimulative effect of lactic acid bacteria of bovine origin in intestinal tract of calves. III Simposio Internacional de Bacterias Lácticas y Segundo Encuentro de la Red Argentina de Bacterias Lácticas (Red-BAL). San Miguel de Tucumán, 15 al 17 de septiembre. p. 73

Frizzo, L.S.; Soto, L.P.; Zbrun, M.V.; Bertozzi, E.; Sequeira, G. y Rosmini M.R. (2009)
Response of young calves inoculated with lactic acid bacteria and challenged with
Salmonella. III Simposio Internacional de Bacterias Lácticas y Segundo Encuentro
de la Red Argentina de Bacterias Lácticas (Red-BAL). San Miguel de Tucumán, 15
al 17 de septiembre. p. 74.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. 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 los animales domésticos (McEwen y Fedorka-Cray, 2002). El uso continuo de estos productos, a veces en forma indiscriminada, produjo la aparición de cepas bacterianas resistentes, proceso que se vio potenciado por la transmisión de dicha resistencia entre las bacterias, incluso de diferente género y especie (Saarella y col., 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 y Fedorka-Cray, 2002).

Las terapias con antibióticos, en especial las administradas por vía oral, aunque controlan los microorganismos patógenos también afectan a muchos gérmenes benéficos produciendo trastornos en el equilibrio de la microbiota gastrointestinal (Salminen y col., 1998a). Muchos de estos antibióticos o sus residuos pueden quedar en los tejidos animales destinados al consumo humano. Además, 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 y 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 y col., 1984; Fuller, 1992; Mulder y col., 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 y 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.

1.2. 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 y Duerden, 1981; Delbecque, 1991; Salminen y col., 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 y 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 y Schaedler, 1960; Abrams y 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 y col., 2003; Plummer y col., 2005; Salminen e 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 y col., 1999; Soto y col., 2010). 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 y 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 y 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 y col., 1999), degradación de componentes alimenticios y producción de ácidos grasos de cadena corta y sus derivados tales como acetatos, propionatos y butiratos (Fooks y col., 1999; Vaughan y col., 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 y col., 1998b; Vaughan y col., 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 y col., 1996; Ziemer y Gibson, 1998; Fooks y col., 1999). Cerca del 90% de la microbiota intestinal que coloniza el tubo digestivo es permanente, mientras que sólo el 10% restante es transitoria (Pascual y col., 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 y col., 1996).

Con relación a la especie animal, en los pollos, el microorganismo dominante en el intestino y el ciego es *Lactobacillus salivarius* (Pascual y col., 1996; Garriga y col., 1998), mientras que en los patos predominan cinco géneros diferentes: *Lactobacillus* spp, *Streptococcus* spp, *Pediococcus* spp, *Enterococcus* spp y *Weissella* spp (Kurzak y col., 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 y col., 2004). Con excepción de *L. farciminis*, estos microorganismos han sido reportados en otras especies animales (Pascual y col., 1996; Kurzak y col., 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 y col., 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 $5,6 \cdot 10^4$ UFC/g cuando las muestras son obtenidas mediante el lavado de la superficie de la mucosa, y $1,1 \cdot 10^5$ 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 y col., 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 estamos ante una situación de eubiosis mientras que 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 y col., 1998; Holzapfel y col., 1998; Vaughan y col., 1999; Allori y col., 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 y col., 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 y col., 2004).

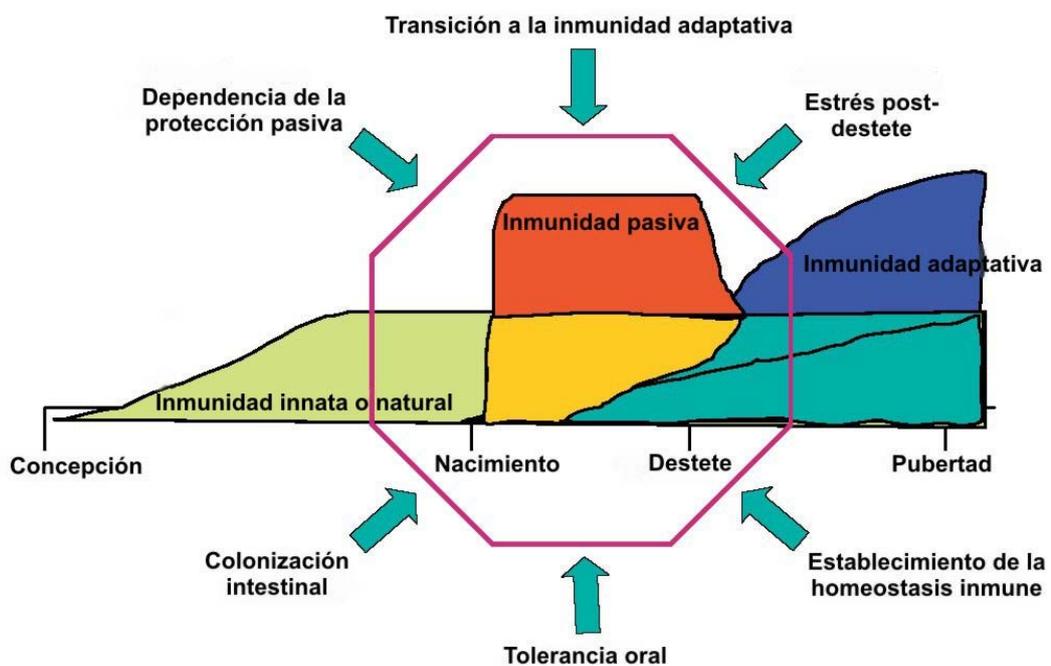
1.3. Los probióticos como herramienta alternativa a los antibióticos

Más allá de los cambios o evolución del concepto “probiótico”, los primeros conocimientos con base científica surgieron de los estudios que realizó Metchnikoff (1903 y 1906) 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 y 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 y col. 1992). Por otro lado, se ha propuesto que en la acción probiótica contribuyen dos mecanismos: aquellos no

mediados por la microbiota (Salminen y col., 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 y col., 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).

Cuando los animales se desarrollan en sistemas de producción 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 y col., 1998). Por el contrario, en las crianzas 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 y col., 2004). Además, ello ocurre en un momento del desarrollo donde muchas cosas impactan sobre el sistema inmune (Figura 1).

Figura 1: La ventana crítica del desarrollo inmunológico. El octágono centra la atención sobre el período durante el cual muchos eventos impactan sobre el desarrollo.



Tomado desde Butler y col. (2006).

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). Es reconocida la importancia de utilizar las cepas probióticas aisladas de un animal en la misma especie (Gilliland y col., 1980) y en especial que sean aisladas del mismo lugar donde el microorganismo estaba actuando en el hospedador (sitio específico del tracto gastrointestinal) (Havenaar y col., 1992). Esto permite aprovechar el efecto conocido como de especificidad de hospedador (“host-specific effect”) (Fuller, 1997).

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 y col., 2004). Además, las propiedades terapéuticas y preventivas de las preparaciones probióticas debidas a las altas concentraciones bacterianas juegan un rol esencial en la normalización del metabolismo de las proteínas, los lípidos y los minerales en el organismo (Novik y col., 2006).

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.

El beneficio terapéutico de los antibióticos posiblemente disminuya con el uso prolongado. Para resolver estos problemas se ha sugerido la utilización de probióticos (Abu-Tarboush y col., 1996). La tendencia a una crianza natural, sin exposición a químicos, pesticidas y herbicidas es una buena razón que incrementa el interés de los probióticos en los establecimientos ganaderos (Reid y Friendship, 2002).

Los numerosos trabajos que refieren a la utilización de los probióticos identifican claramente dos áreas principales del conocimiento en las cuales producirían sus contribuciones: 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 y col., 1976; Smoragiewicz y col., 1993; Bengmarck, 1998; Perdigón y col., 2001, 2002). Los lactobacilos son componentes habituales de la microbiota intestinal normal del hombre y de los animales (Raibaud, 1992; Smoragiewicz y col., 1993; Schneider y col., 2004) y fueron identificados como responsables del control de las diarreas infantiles (Isolauri y col., 1991), de la reducción del índice de diarreas en terneros (Abu-Tarboush y col., 1996), de la reducción del número de coliformes en el intestino de terneros (Bruce y col., 1979; Ellinger y col.,

1980) y del control de los efectos de los gérmenes patógenos como *Salmonella* sp. (Collins y Carter, 1978; Hudault y col., 1997; Gill y col., 2001) y *Escherichia coli* (Hudault y col., 1976; Shu y Gill, 2002). Se ha demostrado que algunas bacterias ácido lácticas son capaces de inhibir a patógenos intestinales *in vitro* (Hudault y col., 1997) y de proteger *in vivo* a ratones convencionales y gnotobióticos inoculados con *Salmonella enteritidis* subsp. typhimurium (Maia y col., 2001; Moura y col., 2001). Estos dos patógenos son los agentes etiológicos bacterianos más frecuentes en las diarreas de los terneros en las primeras semanas de vida (Rodríguez Armesto y col., 1996a y 1996b). Es muy importante prevenir las diarreas patogénicas y no patogénicas en la crianza de los terneros, pues, cuando estos se enferman en este período, decrece su crecimiento, afecta la productividad de las etapas posteriores de crianza y puede incluso ocurrir la muerte (Ishihara y col., 2001). El uso de los probióticos está dirigido a prevenir enfermedades e incrementar la productividad (Fuller, 1992).

Los probióticos han sido usados terapéuticamente en humanos 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 la alimentación de los animales de granja, se basa en las propiedades que se les atribuye para mejorar la eficiencia de conversión alimenticia y como promotores del crecimiento (Mordenti, 1986). Algunos estudios reportan mejoras en la performance de crecimiento de los terneros (Bechman y col., 1977; Gilliland y col., 1980; Schwab y col., 1980; Abe y col., 1995; Cruywagen y col., 1996; Meyer y col., 2001; Timmerman y col., 2005) 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 y col., 1973; Morrill y col., 1977; Ellinger y col., 1980; Jenny y col., 1991; Higginbotham y Bath, 1993; Abu-Tarboush y col., 1996; Oropeza Aguilar y col., 1998; Gonçalves y col., 2000) 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, es debido al balance entre la presencia de bacterias patógenas y no patógenas

que colonizan el intestino (Fox, 1988). El efecto probiótico no sólo se produce por una competencia por los sitios de adhesión a la pared intestinal, sino porque se crea un ambiente adverso para las bacterias patógenas debido a las sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias ácido lácticas (BAL) como los ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo y también la producción de sustancias de naturaleza proteica llamadas bacteriocinas (Klaenhammer, 1988; Frizzo y col., 2006). Las bacteriocinas tienen la capacidad de inhibir otras especies bacterianas, pero no a las cepas productoras de las mismas. 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 patógeno (Miles, 1993). Esta situación afecta directamente el rendimiento de los animales de granja (Kurzak y col., 1998).

La colonización competitiva por parte de los microorganismos benéficos como *Lactobacillus* sp. y *Streptococcus* sp., para ayudar a proteger al animal frente a los patógenos antes mencionados, ocurre a muy temprana edad (Fox, 1988). Ese efecto protector 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” y “exclusión competitiva” (Fuller, 1992). Para prevenir enfermedades, es muy importante que las cepas probióticas tengan la habilidad de inhibir el crecimiento de patógenos (Reid y Friendship, 2002).

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 y col., 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 y col., 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 y col., 1980).

El suero de queso es un subproducto altamente nutritivo derivado de la industria quesera que puede ser utilizado en alimentación animal en diversas formas, tales como, suero líquido, suero condensado, suero desecado, o como productos secos derivados del suero. El suero desecado es utilizado comúnmente en sustitutos lácteos por su alto contenido en lactosa, el carbohidrato de elección para terneros jóvenes (Schingoethe, 1976). La lactosa es un carbohidrato que puede ser digerido por estos terneros (Cruywagen y col., 1996) y por otras crías jóvenes de mamíferos. Además, la lactosa, considerada por algunos autores como un prebiótico, ha sido utilizada junto a las BAL para evitar la colonización de *Salmonella typhimurium* en el buche de aves (Johannsen y col., 2004) y se ha sugerido que promueve el crecimiento de bacterias que fermentan la lactosa y que compiten con *S. typhimurium* por los sitios de colonización en el intestino (Oyoyo y col., 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 y col., 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 y col., 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 y 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 y Gorbach, 1992).

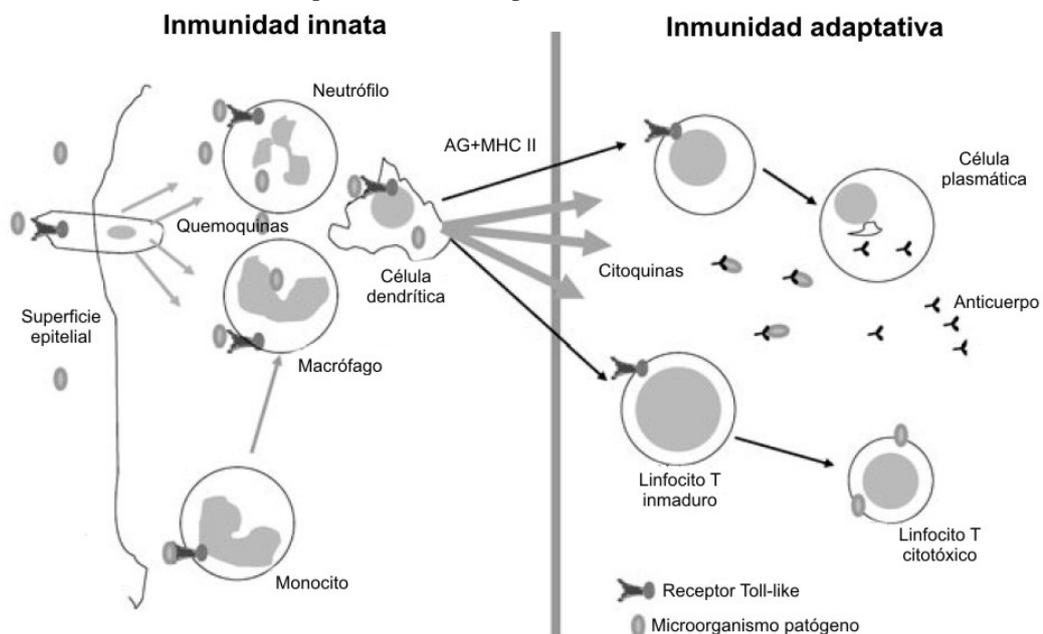
1.4. Mecanismos de acción de la microbiota probiótica

La composición y el metabolismo de la microbiota intestinal afectan el desarrollo de los animales de granja de diferentes formas, en especial a los animales jóvenes que están sometidos al estrés ambiental (Kurzak y col., 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 y col., 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 y col., 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 y col., 1991). Una vez ingresado el patógeno se desarrolla la respuesta inmune (Figura 2).

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 y 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 y col., 1992; Dunne y col., 1999; Remiger y col., 1999; Ross y col., 1999; Frizzo y col., 2006). 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 y Setälä, 1998).

Figura 2: Respuesta inmune a un microorganismo patógeno que ingresa al cuerpo de un organismo superior. Los microorganismos patógenos pasan a través de la capa epitelial, sus ligandos específicos se unen al correspondiente receptor Toll-like (RTL), con la consiguiente activación de las células epiteliales. Esto resulta en la producción de quemoquinas que atraen al lugar a los neutrófilos y macrófagos, quienes eliminan los microorganismos invasores. Si los microorganismos son numerosos activan los RTL en macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, lo que promueve la eliminación de microorganismos. El antígeno microbiano junto con moléculas MHC II y el grupo de las citoquinas son transferidos a través de las células dendríticas activan a los linfocitos T y B que controlan el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa Th1/Th2.

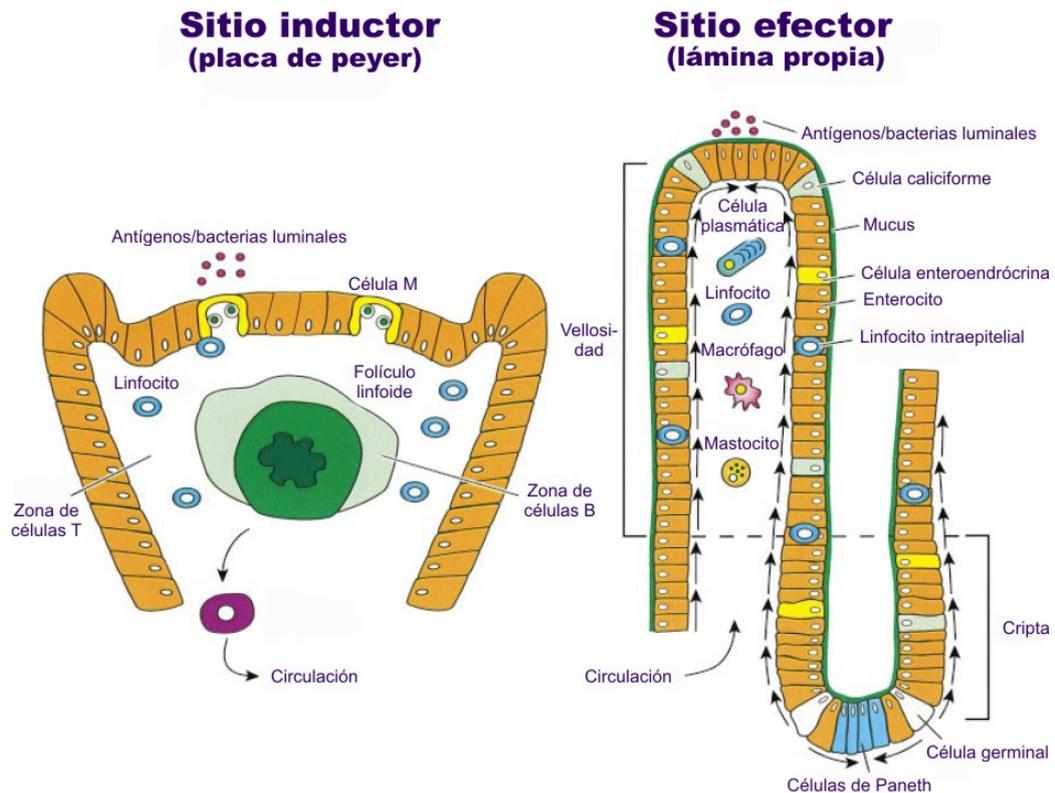


Tomado desde Lebedev y Ponyakina (2006).

El tejido linfoide asociado al intestino hace del tracto gastrointestinal el órgano inmune más grande del cuerpo (Collins y col., 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 y col., 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 y col., 2000) activando los sitios inductores (Figura 3).

Figura 3: En el ecosistema gastrointestinal se produce una rápida renovación de las células madre epiteliales de población que se diferencian en varios tipos de células epiteliales intestinales (las células caliciformes, las células enteroendócrinas, los enterocitos, las células de Paneth y las células M). Estas células epiteliales sirven como una barrera entre el contenido luminal (antígenos de los alimentos y la microbiota residente) y el complejo sistema inmune de mucosas. Este sistema inmune de mucosas puede ser funcional y físicamente dividido en sitio inductor (placas de Peyer) y sitio efector (lámina propia). Los antígenos son tomados por las células M, próximo a la placas de Peyer, lo que lleva a la activación de linfocitos antígeno-específicos. Posteriormente, los linfocitos activados migran a los nódulos linfáticos mesentéricos y, eventualmente, volver a entrar en la circulación a través del conducto torácico. Las células efectoras que migran expresan receptores específicos que las guían para entrar al sitio efector intestinales tales como la lámina propia.



Tomado desde McCracken y Lorenz (2006).

1.5. Evaluación *in vitro* e *in vivo* 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 y col., 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 y col., 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 y Gibson, 1998; Ouwehand y col., 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 y col., 1997).

Las cepas probióticas pueden ser seleccionadas teniendo en cuenta su condición de habitante intestinal normal (Gusils y col., 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 y col., 2004), ya que la funcionalidad de un inóculo probiótico multicepa puede ser más efectiva y consistente que la de un monocepa (Timmerman y col., 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.

Actualmente existen en el mercado una importante diversidad y cantidad de cepas que se ofrecen para ser incorporadas en la dieta de los animales domésticos (Council Directive 70/524/EEC, 1988; European Commission, 2003; Soto y col., 2009). Dentro de ellas se encuentra una amplia variedad para su utilización en terneros jóvenes (Tabla 1).

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 y Setälä, 1998). Los microorganismos ingeridos están expuestos, durante su tránsito gastrointestinal, a factores estresantes que comprometen su supervivencia (Marteau y col., 1997). Esto determina la necesidad de contar con métodos *in vitro* confiables que permitan seleccionar cepas prediciendo su supervivencia en el tubo digestivo (Jacobsen y col., 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 y col., 2002). Este efecto estresante sobre las cepas de *Lactobacillus* es complejo porque la concentración de bilis y el tiempo de residencia varían 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.

Tabla 1: Productos probióticos para terneros jóvenes encontrados en el mercado

Nombre del producto	Microorganismo	Especie	Cepa
Adjulant 2000 [®]	Bacteria	<i>Streptococcus infantarius</i>	CNCM I-841
		<i>Lactobacillus plantarum</i>	CNCM I-840
Bioplus 2B [®]	Bacteria	<i>Bacillus licheniformis</i>	DSM 5749
		<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 5750
Bonvital [®]	Bacteria	<i>Enterococcus faecium</i>	DSM 7134
		<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	DSM 7133
Cylactin LBC [®]	Bacteria	<i>Enterococcus faecium</i>	NCIMB 10415
Fecinor plus [®]	Bacteria	<i>Enterococcus faecium</i>	CECT 4515
		<i>Lactobacillus casei</i>	NCIMB 30096
Gardion [®]	Bacteria	<i>Enterococcus faecium</i>	NCIMB 30098
		<i>Enterococcus faecium</i>	NCIMB 11181
Lactiferm [®]	Bacteria	<i>Enterococcus faecium</i>	DSM 5464
Microferm [®]	Bacteria	<i>Enterococcus faecium</i>	DSM 3520
Mirimil-Biomin [®]	Bacteria	<i>Enterococcus faecium</i>	DSM 3530
Mirimill [®]	Bacteria	<i>Enterococcus faecium</i>	NCIMB 10415
		<i>Enterococcus faecium</i>	DSM 10663
Oralin [®]	Bacteria	<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 14893
		<i>Bacillus cereus</i>	CIP 5832
Paciflor [®]	Bacteria	<i>Enterococcus faecium</i>	SF 101
		<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LA 101
Provita protect [®]	Bacteria	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LA 107
		<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NCIB 40112
Toyocerin [®]	Bacteria	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i>	CNCM I-1012
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS 493 94

(Tomado desde Council Directive 70/524/EEC, 1988; European Commission, 2003; Soto y col., 2009)

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 y col., 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). Aunque 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.

La seguridad de las cepas probióticas ha sido cuestionada en algunos trabajos, en donde demuestran la presencia de algunos de los géneros microbianos más utilizados, en lesiones de pacientes humanos (Tabla 2). En general se destaca la necesaria inmunodeficiencia de los pacientes para que la infección tenga lugar. De todas maneras, es necesario realizar ensayos en donde se estudie la capacidad de las cepas probióticas para invadir el medio interno.

La pared intestinal intacta constituye una barrera sólida contra la penetración de los microbios en el organismo, lo que no impide que un cierto número de bacterias pasen del tubo digestivo a los órganos y a la sangre (Metchnikoff, 1906). La translocación bacteriana es el pasaje de las bacterias indígenas viables desde el tracto gastrointestinal hacia los sitios extraintestinales, tales como los nódulos linfáticos mesentéricos, el hígado, el bazo y la sangre periférica. Una parte de los microbios obtenidos atraviesan la pared intestinal y vienen a hospedarse, sea en los nódulos linfáticos vecinos, sea en los pulmones, el hígado o el bazo. Algunas veces esos microbios pueden ser encontrados en la linfa o en la sangre (Metchnikoff, 1906). Tres mecanismos principales promueven la translocación bacteriana: sobrecrecimiento bacteriano intestinal, deficiencias en las

defensas inmune del hospedador e incremento de la permeabilidad o daño de la barrera mucosa intestinal (Berg, 1995).

Tabla 2: Infectividad de bacterias ácido lácticas y levaduras.

Cepa	Aislado desde	Frecuencia
Lb spp., Sc spp. (eF)	Endocarditis	
Bb spp., Lb spp. (eF)	Abscesos abdominales	<0,6%
<i>L. casei</i> (LGG)	Cultivos sanguíneos	0,24%
<i>L. rhamnosus</i> , <i>casei</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. acidophilus</i> (kP)	Infecciones*	
<i>Ec</i> spp.	Endocarditis	2%
<i>L. casei</i>	Neumonía y sepsis*	
<i>Saccharomyces boulardii</i> (algunas veces identificado como <i>S. cerevisiae</i>)	Fungemia	1,6%
<i>L. rhamnosus</i> (indistinguible de LGG)	Abscesos hepáticos	un caso

Bb, *Bifidobacterium*; L, *Lactobacillus*; Sc, *Streptococcus*; Ec, *Enterococcus*; eF, integrante de la flora intestinal endógena; nP, no probiótico.

*Sujetos inmunodeficientes.

(tomado desde Vrese y Schrezenmeir, 2002).

Se ha discutido mucho la cuestión sobre si esta penetración de los microbios se efectúa a través de la pared intestinal intacta o si no es posible sino a favor de alguna lesión, por mínima que sea. Es extremadamente difícil resolver este problema de un modo preciso. Se sabe que la pared del tubo digestivo puede ser fácilmente lesionada por el menor rozamiento y que aún las sondas más blandas, introducidas en el estómago con las mayores precauciones, pueden producir lesiones suficientes como para dejar penetrar los microbios a la sangre. En la vida corriente, la pared del tubo digestivo suministra a menudo ocasiones para esto. La frecuente presencia de los microbios en los nódulos linfáticos de los animales sanos suministra de ello una prueba suficiente (Metchnikoff, 1906). El tracto gastrointestinal de un animal joven es fisiológicamente

inmaduro en su estado de desarrollo al momento del nacimiento, comparado con el adulto (Lee y col., 2000) y esta situación podría facilitar el traspaso de microorganismos desde el tracto gastrointestinal hacia el medio interno, particularmente en los jóvenes rumiantes puesto que su sistema digestivo sufre una transición fisiológica de mono a policavitario. Es así como la translocación puede ser utilizada como parámetro para evaluar un candidato probiótico pues resulta interesante conocer la habilidad del mismo para translocar como criterio de seguridad (Trevisi y col., 2007). Esto hace de la translocación bacteriana una característica no deseada cuando se administra un inóculo microbiano vivo. A pesar de ello, no hay muchos reportes donde se verifique el nivel de seguridad de las cepas utilizadas, mediante ensayos de translocación, antes de ser suministradas en los terneros y la incidencia y consecuencias que ella generaría en los animales.

Aunque algunas cepas han mostrado efectos benéficos administrándolas en forma terapéutica, la incorporación de microorganismos junto al alimento, a manera de profilaxis, desde el nacimiento permite incorporar y establecer las cepas seleccionadas junto a la microbiota de los terneros. Esta colonización temprana de las bacterias benéficas en el ecosistema intestinal permitiría su acción en situaciones fisiológicas y esto coloca al ternero en una posición ventajosa ante la invasión de algún patógeno (Frizzo y col., 2006).

El efecto positivo de los probióticos sobre la performance de crecimiento de los terneros se puede ver más fácilmente cuando el estado de salud de los mismos está comprometido (Timmerman y col., 2005). Es por ello que podría ser ventajoso medir la efectividad de los probióticos cuando los animales están en estado de estrés.

El suero de queso es un subproducto altamente nutritivo derivado de la industria quesera y puede ser utilizado en alimentación animal en diversas formas, tales como, suero líquido, suero condensado, suero desecado, o como productos secos derivados del suero. El crecimiento de los terneros ha mejorado cuando fueron alimentados con sustitutos lácteos que contenían hasta el 89% de suero de queso. Las proteínas del suero de queso se caracterizan por tener una excelente calidad en comparación con otras que se encuentran en la naturaleza. El suero desecado es utilizado comúnmente en sustitutos lácteos por su alto contenido en lactosa, el carbohidrato de elección para terneros jóvenes (Schingoethe, 1976).

La lactosa puede ser digerida por los terneros (Cruywagen y col., 1996) y por otras crías jóvenes de mamíferos. El aprovechamiento de cualquier disacárido o polisacárido que no sea lactosa se encuentra muy limitado en el ternero joven, pues, a excepción de la lactasa, todas las otras enzimas que hidrolizan a los carbohidratos presentan una actividad relativamente baja en el tracto digestivo del recién nacido (Davis y Drackley, 2001).

La incorporación de lactosa en la dieta de los terneros tomo relevancia cuando se comenzaron a formular los sustitutos lácteos comerciales. La cantidad en que debía suministrarse siempre fue motivo de mucha discusión a tal punto que no está claro cuanta lactosa es capaz de tolerar un ternero joven sin que se produzcan efectos indeseables en su crecimiento y en su estado sanitario. Se sabe que el suministro de lactosa genera diarrea a los terneros a las pocas horas de su administración y que cuando el carbohidrato se retira de la dieta los animales vuelven al estado inicial. Cualquier factor luminal o seroso que afecta a los sistemas de transporte también afecta al movimiento de los electrolitos y el agua. Además de los mecanismos específicos implicados en el movimiento de agua en el intestino, la diarrea osmótica también puede ser inducida cuando un compuesto no absorbible alcanza el lumen intestinal y mantiene un gradiente osmótico entre el lumen intestinal y la sangre. Un caso típico de la diarrea osmótica que es inducida por la malabsorción de la lactosa en el caso de deficiencia de lactasa (Heyman y Ménard, 2002). Los terneros más jóvenes son más susceptibles a la diarrea debido a la lactosa incorporada aunque, paradójicamente, la actividad lactasa disminuye a lo largo de la vida del ternero joven. La actividad de la microbiota intestinal puede explicar, al menos en parte, este comportamiento en el cual la lactosa incorporada es mejor utilizada cuando los animales aumentan su edad. Es indudable que este carbohidrato produce un cambio en los integrantes de la microbiota favoreciendo el crecimiento de bacterias lácticas y disminuyendo el pH intestinal. Es probable que estos dos factores mejoren el aprovechamiento de la lactosa a nivel intestinal y bajo estas condiciones se podrían utilizar mayores cantidades de lactosa la cual, a su vez, retroalimentaría el sistema favoreciendo el mantenimiento de poblaciones bacterianas benéficas que se adaptan mejor a condiciones más bajas de pH. El hecho de que las bacterias que integran el inóculo, utilizado en los ensayos, tengan la capacidad de crecer satisfactoriamente en la leche, cuya única fuente de carbohidratos es la lactosa, hace

interesante la utilización de este disacárido a los fines de establecer estos microorganismos de manera adecuada a nivel intestinal. Por otra parte, el empleo de altas cantidades de lactosa en el alimento puede desbalancear la dieta y producir casos de diarreas por efecto osmótico (Quigley, 1998). Por lo tanto, el inóculo podría colaborar en este sentido haciendo más eficiente la utilización de este carbohidrato y evitando ese trastorno gastrointestinal. Este conocimiento puede ser utilizado entonces para generar un modelo en donde una incorporación adecuada de lactosa genere diarrea en los terneros en experimentación. Bajo esta situación de estrés nutricional generada es donde sería más conveniente verificar el efecto benéfico del inóculo experimental.

Así como es importante el diseño de modelos experimentales de estrés nutricional también sería provechoso llevar esa situación de estrés al extremo empleando el desafío experimental con patógenos primarios productores de diarrea. *Salmonella* sp. y *Escherichia coli* son los agentes etiológicos bacterianos más frecuentes en las diarreas de los terneros en las primeras semanas de vida (Rodríguez Armesto y col., 1996a y 1996b). En el caso de *Salmonella* sp., el incremento de la frecuencia de su aislamiento demuestra que el sistema productivo actual es favorable para su desarrollo, especialmente cuando existen deficiencias de higiene durante la crianza artificial (Odeón, 2001).

Las enfermedades gastrointestinales están ocasionadas generalmente por desbalances que se producen en el complejo ecosistema que habita el tracto gastrointestinal de los animales de granja. La salmonelosis de los bovinos es una enfermedad ampliamente distribuida por todo el mundo. Las infecciones con *Salmonella dublin* son importantes por su impacto sobre la economía de la granja y la salud pública (Roberts, 1989). *S. dublin* es un serotipo adaptado al hospedador (Brackelsberg y col., 1997), que produce portadores y causa diarrea en áreas endémicas y septicemia, neumonía, fiebre y diarreas esporádicas en áreas no endémicas (McDonough y col., 1999).

Existe una gran variabilidad en la presentación clínica de la salmonelosis en los animales y es 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 debido al ambiente, disponibilidad de alimentos y agua, etc.) (McDonough y col., 1999).

Aunque en el mercado Argentino existen algunos productos comerciales destinados a la alimentación animal que son ofrecidos como benéficos por sus propiedades probióticas, no se han podido encontrar en el comercio, o referenciados por la bibliografía, inóculos de BAL provenientes de flora autóctona aislados de terneros pertenecientes a establecimientos agropecuarios nacionales. Además, son pocos los ensayos realizados en el país (encontrados en la literatura científica) en donde se ha evaluado la utilización de bacterias probióticas en terneros jóvenes (Monti y Tarabla, 1999; Abdala y col., 2001) y, aunque hubo resultados alentadores en ganancia de peso (en uno de ellos) no se enfoca en estos trabajos la importancia tanto de la viabilidad de las cepas otorgadas como de las encontradas en materia fecal o en regiones intestinales.

Se ha realizado el aislamiento e identificación de las bacterias lácticas que componen la microflora indígena de los animales en los establecimientos productores de leche (Schneider y col., 2004). Se ha demostrado la capacidad de algunos de estos microorganismos para producir sustancias inhibitoras del desarrollo de gérmenes (Frizzo y col., 2006) y pudo verificarse su inocuidad y capacidad para colonizar y permanecer en el tracto gastrointestinal de animales de laboratorio (Frizzo y col., 2007), protegiéndolos frente a *S. dublin* (Frizzo y col., 2005).

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 de los terneros jóvenes, especialmente en condiciones de crianza artificial o sometidos a estrés productivo.

2. OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

La utilización de bacterias ácido lácticas indígenas, aisladas a partir de distintas regiones anatómicas de terneros jóvenes, puede constituir una alternativa a la administración de antibióticos en la dieta de terneros criados intensivamente. Estos microorganismos podrían formar parte de suplementos alimenticios no medicamentosos con capacidad probiótica y, de esa forma, contribuir a mejorar las condiciones sanitarias y de producción de las explotaciones lecheras regionales. Una mejora de las condiciones sanitarias asegurará 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.

2.2. Objetivo general

Desarrollar un inóculo de bacterias ácido lácticas indígenas con capacidad probiótica que sea capaz de mejorar el estado sanitario de los terneros criados en forma artificial durante las primeras cuatro semanas de vida y les brinde protección frente a las bacterias patógenas productoras de diarrea.

2.3. Objetivos específicos

1. Evaluar la capacidad del inóculo de BAL seleccionado para mejorar los índices de conversión y aumento de peso diario de los animales inoculados y suplementados con un probiótico en la etapa de crianza artificial.

2. Evaluar el potencial del inóculo BAL junto a suero de queso y lactosa para disminuir la incidencia de diarreas, o paliar sus efectos adversos, en los animales en la etapa de crianza artificial.
3. Analizar los posibles mecanismos mediante los cuales el inóculo produciría sus efectos en los animales.
4. Evaluar la capacidad del inóculo de BAL indígenas con capacidad probiótica para brindar protección frente a las bacterias patógenas productoras de diarrea.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Efecto de la suplementación con tres bacterias ácido lácticas de origen bovino sobre la translocación bacteriana, la toxicidad oral aguda, la colonización intestinal, la performance de crecimiento y el estado sanitario.

3.1.1. Animales e instalaciones

El trabajo se realizó en el sector destinado a la Crianza Artificial de Terneros correspondiente a la FCV-UNL. Se utilizaron 36 terneros Holstein (*Bos taurus*) con una edad promedio de 10 días de vida. La crianza artificial se realizó “en estaca” y sobre piso cubierto por pasto natural. Cada animal estaba sujeto por una cadena a su comedero individual y dispuso de una superficie de terreno limitada por la longitud de la cadena (3 m). Cada semana los animales con su estaca fueron trasladados a una nueva superficie, de iguales características, libre de deyecciones. Todos los animales fueron alimentados con concentrado comercial *ad libitum* a lo largo del experimento y con sustituto lácteo (4 l/d) y agua, racionados directamente en el comedero 2 veces al día. El sustituto lácteo fue reconstituido al 11% de materia seca (MS) y suministrado a los terneros, a las 6:00 h y a las 18:00 h, a una temperatura de aproximadamente 38 °C. El cuidado de los animales se realizó teniendo en cuenta la Guía para el cuidado y uso de animales en investigación y enseñanza (FASS, 1998).

3.1.2. Composición de los alimentos

Todos los alimentos que fueron utilizados en la crianza de los animales no habían sido suplementados con antibióticos. El sustituto lácteo contenía un 21% de proteína, un 40% de lactosa y su extracto etéreo era del 16%. El alimento concentrado peleteado comercial fue formulado con los siguientes ingredientes: maíz molido, pellet de soja, afrechillo de trigo, fosfato bicálcico, cloruro de sodio y un núcleo vitamínico-mineral. El mismo contenía 90% MS, 18% de proteína, 2,9 Mcal/kg MS, 80% de TND, 5% de fibra, 1,2% de calcio y 0,8% de fósforo.

3.1.3. Microorganismos

Se utilizaron 3 cepas lácticas de origen bovino: *Lactobacillus casei* DSPV 318T, *Lactobacillus salivarius* DSPV 315T y *Pediococcus acidilactici* DSPV 006T. Estos

microorganismos fueron identificados utilizando técnicas de biología molecular (Schneider y col., 2004) y se conservaron a -80 °C en medio MRS con 35% de glicerol. Su número de acceso al Genbank es: FJ787305, FJ787306 y FJ787307, respectivamente. 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.

3.1.4. Selección de mutantes resistentes a rifampicina

Las cepas integrantes del inóculo se hicieron resistentes a la rifampicina para poder rastrear el inóculo durante el ensayo *in vivo*. Las cepas 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 y col., 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. Las cepas resistentes a rifampicina se propagaron en caldo MRS durante 24 h a 37°C. Se compararon los parámetros fisiológicos y bioquímicos de las cepas original y la resistente a rifampicina para asegurar que la única diferencia entre ambas era dicha resistencia. El cultivo de cada una de las cepas resistentes a rifampicina fue conservado a -80 °C en caldo MRS con 35% de glicerol. Las cepas resistentes obtenidas se incorporaron al inóculo probiótico en reemplazo de la cepa original.

3.1.5. Diseño del experimento

Los animales se dividieron en dos grupos experimentales homogéneos en su peso, grupo control (G-C) y grupo inoculado (G-BAL), de 18 animales cada uno. Se determinó diariamente el consumo de agua y la frecuencia de diarreas, realizando un análisis macroscópico de las heces y asignando valores de 1 a 4 de acuerdo a las particularidades de la materia fecal. La evaluación de dichas características se realizó en base a los siguientes parámetros de consistencia fecal y de acuerdo con los scores propuestos por Meyer y col. (2001): 1-Normal: heces firmes, pero no duras; su forma original se distorsiona levemente cuando cae y se asienta en el suelo; 2-Blanda, no

presenta forma, al caer se deposita en montículos y se dispersa levemente; 3-Fluida: se dispersa rápidamente en láminas de 6 mm de profundidad; 4-Acuosa: consistencia líquida. Se consideró “animal con diarrea”, aquel que tenía escore 4. Como indicador de la intensidad y la duración de las deposiciones se utilizó el índice de consistencia fecal (ICF), empleado por Meyer y col. (2001). Cuanto mayor es este índice más intenso y duradero fue el reblandecimiento de las heces.

$$\text{ICF} = \frac{[(dE1 \times 1) + (dE2 \times 2) + (dE3 \times 3) + (dE4 \times 4)]}{T_d \times 4} \times 100$$

donde dE1, dE2, dE3 y dE4 representan el número de días con consistencia fecal de escore 1, 2, 3 y 4 respectivamente y T_d representa el total de días del experimento (T_d = 35). Tomando la fórmula como base, fue calculado el ICF semanal (T_d = 7).

Los datos de peso vivo (PV), altura (H) y perímetro torácico (PT) se registraron en forma semanal. El consumo de agua (C_{ag}) y alimentos se determinó en forma diaria. El consumo de alimentos (CTA) fue calculado en base al consumo de sustituto lácteo y alimento concentrado peleteado comercial (CAC). La ganancia de peso vivo (GPV) fue obtenida por diferencia entre pesos en el período de tiempo correspondiente. La conversión alimenticia (CA) fue calculada relacionando el CTA (kg) y la GPV (kg). Semanalmente se tomaron muestras de sangre para evaluar el perfil bioquímico sanguíneo y el estado inmunológico general y muestras de materia fecal para efectuar el análisis coproparasitológico. Se realizaron necropsias programadas una vez por semana durante todo el ensayo.

3.1.6. Preparación y administración del inóculo

Las bacterias se multiplicaron en caldo MRS durante 18-20 h a 37 °C. Se determinó la densidad óptica a 560 nm de los cultivos para construir una curva de calibración con la cual se calculó la concentración bacteriana (Frizzo y col., 2006). Los cultivos se centrifugaron a 3000g durante 10 min y se resuspendieron en solución de NaCl. Posteriormente se mezclaron las tres cepas y se enrasó hasta alcanzar el volumen final. Las cepas resistentes a rifampicina integraron el inóculo probiótico, el cual estaba formado por una dosis de 40 ml de una suspensión de los tres microorganismos antes mencionados, en una solución de NaCl 0,15M. Se dosificó con al menos 10⁹ UFC/kg peso vivo (1 dosis diaria). Este inóculo fue administrado a los terneros del G-BAL

incorporado junto al sustituto lácteo durante los 35 días que duró el experimento. El G-C fue inoculado de la misma forma pero con 40 ml de la solución de NaCl 0,15M, que sirvió de placebo.

3.1.7. Análisis coproparasitológico de las muestras fecales

Con el fin de poder evaluar la posible influencia de la carga parasitaria sobre el estado de salud de los animales, se realizaron análisis coproparasitológico en forma semanal. Las muestras fecales, obtenidas directamente desde el recto de todos los terneros, fueron analizadas microscópicamente para determinar el número de huevos de parásitos por gramo de heces mediante el método de recuento de McMaster modificado por Roberts y O'Sullivan (1950).

3.1.8. Perfil bioquímico sanguíneo y leucograma

Las muestras de sangre (15 ml) fueron tomadas cada 7 d desde la vena yugular utilizando jeringas con agujas hipodérmicas. A una parte de la muestra (10 ml) se le incorporó heparina sódica como anticoagulante (Matsuzaki y col., 1997). Una porción de esta sangre fue utilizada para realizar el leucograma, en cámara de Neubauer, y el recuento diferencial (fórmula leucocitaria) se efectuó en un microscopio Zeiss a partir de frotis coloreados con Giemsa. Otra porción se centrifugó para obtener el plasma, el cual fue almacenado a -80°C hasta el momento de realizar las siguientes determinaciones: uremia, colesterolemia y glucemia. El resto de la muestra de sangre (5 ml) fue procesada sin anticoagulante, con la misma frecuencia, para la determinación de proteínas séricas totales. Una vez formado el coágulo, se utilizó un procedimiento similar al descrito anteriormente para obtener y almacenar el suero sanguíneo. Las proteínas séricas y la urea se valoraron con un espectrofotómetro y reactivos Wiener Lab., mediante las técnicas de biuret (540 nm) y ureasa (570 nm) respectivamente. El colesterol total se determinó mediante un método enzimático (colesterol-oxidasa/peroxidasa, 505 nm) con reactivos de Wiener Lab. La determinación de glucosa se realizó con reactivos Wiener Lab., empleando un método enzimático (505 nm).

3.1.9. Necropsias

Cada 7 d se realizó la necropsia programada de un animal en cada grupo experimental. Las necropsias se realizaron a las 22 h después de la última administración del probiótico. Los animales fueron insensibilizados mediante una droga eutanásica (Euthanyle®, Brouwer S.A.) administrada en condiciones de asepsia. Los animales fueron desangrados y se siguieron las técnicas convencionales de necropsia (Rodríguez Armesto, 2004). Se recogieron los siguientes órganos: hígado, bazo, nódulo linfático mesentérico, nódulo linfático ileocecal, intestino delgado (duodeno, yeyuno) e intestino grueso (ciego) en esta secuencia utilizando instrumental estéril en cada tejido para minimizar la posibilidad de contaminación bacteriana entre muestras (Lee y col., 2000). El peso del bazo fue determinado y junto con el peso vivo se calculó el índice de peso esplénico (IPE) de la siguiente manera:

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

3.1.10. Recuperación del inóculo desde distintos sectores del intestino de los terneros

El intestino delgado (duodeno y yeyuno) y el intestino grueso (ciego) de los terneros fue obtenido en condiciones asépticas y se hicieron diluciones decimales en solución de Ringer ¼ del raspado de la mucosa para facilitar los recuentos de los lactobacilos totales y de aquellos que formaban parte del inóculo. Para determinar la colonización del tracto intestinal de los terneros por el inóculo utilizado se realizaron recuentos de colonias viables (UFC) recuperadas en el raspado de la mucosa. La presencia de las cepas que integran el inóculo microbiano en el tracto intestinal fue interpretado como colonización por esas bacterias (Lee y col., 2000). A partir de las diluciones seriadas de cada muestra se sembraron, por triplicado, placas de agar MRS para contar la flora láctica total y placas de agar MRS_{rif} para recuperar solamente el inóculo utilizado. Las placas de Petri se incubaron a 37 °C durante 48 h en condiciones anaeróbicas y posteriormente se contaron las colonias características.

3.1.11. Prueba de translocación

Trozos de hígado, bazo y nódulos linfáticos mesentérico e ileocecal íntegros obtenidos en condiciones asépticas fueron homogeneizados con un stomacher (Seward biomaster®) en solución Ringer ¼. Para medir la translocación al medio interno el homogeneizado fue sembrado en los siguientes medios: MRS_{rif} (inóculo suministrado), MRS (Lactobacilli), VRBL (coliformes), KF (enterococos) y BBA suplementado con vitamina K₁ (1 µg/ml) y hemina (5 µg/ml) (aerobios totales).

3.1.12. Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA para determinar si existían diferencias significativas entre las variables del G-C y del G-BAL estudiadas (recuentos microbianos, PV, H, PT, CA, CTA, CAC, GPV, Cag, ICF total y semanal, índice de peso esplénico, leucograma, recuento de huevos de parásitos y concentración de glucosa, colesterol, urea y proteínas séricas totales). Los resultados se expresaron como la media aritmética y sus desvíos estándares. Los eventos de diarrea y la translocación microbiana se analizaron mediante el test de chi cuadrado. Las pruebas estadísticas se realizaron con el Programa Statistix para windows versión 1.0.

3.2. Influencia del inóculo de BAL y el suero de queso sobre la performance de crecimiento y el estado sanitario de los terneros.

3.2.1. Animales e instalaciones

El trabajo se realizó en el sector destinado a la Crianza Artificial de Terneros correspondiente a la FCV-UNL. Se utilizaron 16 terneros machos lactantes (*Bos taurus*) con una edad promedio de 10 d de vida. La crianza artificial se realizó “en estaca” y sobre piso cubierto por pasto natural. Cada animal estaba sujeto por una cadena a su comedero individual y dispuso de una superficie de terreno limitada por la longitud de la cadena (3 m). Cada semana los animales con su estaca fueron trasladados a una nueva superficie, de iguales características, libre de deyecciones. Todos los animales fueron alimentados con concentrado peleteado comercial suministrado ad libitum a lo largo del experimento y con sustituto lácteo (4 l/d) y agua, racionados directamente en el comedero 2 veces al día. El sustituto lácteo fue reconstituido al 11% MS y entregado a

los terneros, a las 6:00 h y a las 18:00 h, a una temperatura de aproximadamente 38 °C. El suero de queso desecado se suministró junto al sustituto lácteo en cantidades de 200 g/d. Los terneros permanecieron en experimentación durante un período de 35 d. El cuidado de los animales se realizó teniendo en cuenta la Guía para el cuidado y uso de animales en investigación y enseñanza (FASS, 1998).

3.2.2. Microorganismos

Se utilizaron 3 cepas lácticas de origen bovino: *Lactobacillus casei* DSPV 318T, *Lactobacillus salivarius* DSPV 315T y *Pediococcus acidilactici* DSPV 006T. Estos microorganismos fueron identificados utilizando técnicas de biología molecular (Schneider y col., 2004) y se conservaron a -80 °C en medio MRS con 35% de glicerol. Su número de acceso al Genbank es: FJ787305, FJ787306 y FJ787307, respectivamente. 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.

3.2.3. Diseño del experimento

El lote de 16 animales fue dividido en 2 grupos experimentales homogéneos en su peso con 8 ejemplares cada uno. Un grupo fue suplementado con BAL (G-BAL) y el otro fue utilizado como control (G-C). Se determinó diariamente el consumo de agua (Cag) y la frecuencia de diarreas, realizando un análisis macroscópico de las heces y asignando valores de 1 a 4 de acuerdo a las características de la materia fecal. La evaluación de dichas características se realizó en base a los siguientes parámetros de consistencia fecal y de acuerdo con los escores propuestos por Meyer y col. (2001): 1-Normal: heces firmes, pero no duras; su forma original se distorsiona levemente cuando cae y se asienta en el suelo; 2-Blanda, no presenta forma, al caer se deposita en montículos y se dispersa levemente; 3-Fluida: se dispersa rápidamente en láminas de 6 mm de profundidad; 4-Acuosa: consistencia líquida. Se consideró “animal con diarrea”, aquel que tenía escore 4. Los animales con diarrea permanecieron en ayunas por 24 h y se les proporcionó oralmente 1 litro de una solución electrolítica hidratante (glucosa 0,623%; cloruro de sodio 1,065%; carbonato de sodio 0,2685%; cloruro de potasio 0,1935%) 2 veces por día. La dieta líquida fue reintroducida después de este período. No se realizaron tratamientos con antibióticos. Por otra parte, como indicador de la

intensidad y la duración de las deposiciones se utilizó el índice de consistencia fecal (ICF), empleado por Meyer y col. (2001). Los datos de peso vivo (PV), altura (H) y perímetro torácico (PT) se registraron en forma semanal. El Cag y alimentos se determinaron en forma diaria. El consumo total de alimentos (CTA) fue calculado en base al consumo de sustituto lácteo, lactosa y alimento concentrado peleteado comercial (CAC). La ganancia de peso vivo (GPV) fue obtenida por diferencia entre los pesos en el período de tiempo correspondiente. La conversión alimenticia (CA) fue calculada relacionando el CTA (kg) y la GPV (kg). Semanalmente se tomaron muestras de sangre para evaluar el perfil bioquímico sanguíneo y muestras de materia fecal para efectuar el análisis coproparasitológico.

3.2.4. Análisis coproparasitológico de las muestras fecales

Con el fin de poder evaluar la posible influencia de la carga parasitaria sobre el estado de salud de los animales y el posible efecto del inóculo sobre dichos parásitos, se realizaron análisis coproparasitológicos en forma semanal. Las muestras fecales se obtuvieron directamente desde el recto de todos los terneros y fueron analizadas microscópicamente para determinar el número de huevos de parásitos, relacionados al complejo de gastroenteritis verminosa, por gramo de heces. Se utilizó el método de recuento de McMaster modificado por Roberts y O'Sullivan (1950).

3.2.5. Perfil bioquímico sanguíneo

Las muestras de sangre (15 ml) fueron tomadas cada 7 d, desde la vena yugular, utilizando jeringas con agujas hipodérmicas. A una parte de la muestra (10 ml) se le incorporó heparina sódica como anticoagulante (Matsuzaki y col., 1997). El plasma obtenido por centrifugación fue almacenado a -80 °C hasta el momento de realizar las siguientes determinaciones: uremia, colesterolemia y glucemia. El resto de la muestra de sangre (5 ml) fue procesada sin anticoagulante, con la misma frecuencia, para la determinación de proteínas totales. Una vez formado el coágulo, se utilizó un procedimiento similar al descrito anteriormente para obtener y almacenar el suero sanguíneo. Las proteínas séricas y la urea se valoraron con un espectrofotómetro y reactivos Wiener lab, mediante las técnicas de biuret (540 nm) y ureasa (570 nm) respectivamente. El colesterol total se determinó mediante un método enzimático

(colecsterol-oxidasa/peroxidasa, 505 nm) con reactivos de Wiener Lab. La determinación de glucosa se realizó con reactivos Wiener lab, empleando un método enzimático (505 nm).

3.2.6. Ingestión de calostro

Para verificar el nivel de ingestión del calostro por parte de los animales, se extrajeron muestras de sangre, de cada ternero, siguiendo la metodología descrita anteriormente. Las muestras fueron obtenidas antes de iniciar el experimento y se determinó el nivel de proteínas séricas totales procesando los sueros con un refractómetro de Goldberg (Quigley, 2001).

3.2.7. Preparación y administración del inóculo

Las bacterias se multiplicaron en caldo MRS durante 18-20 h a 37 °C. Se determinó la densidad óptica de los cultivos a 560 nm y se calculó la concentración bacteriana utilizando una curva de calibración (Frizzo y col., 2006). Los cultivos se centrifugaron a 3000g durante 10 min y se resuspendieron en solución de NaCl. Posteriormente se mezclaron las tres cepas y se completó hasta alcanzar el volumen final. El inóculo probiótico estaba formado por una dosis de 40 ml de una suspensión de los tres microorganismos antes mencionados, en una solución de NaCl 0,15M. Se dosificó con al menos 10^9 UFC/kg peso vivo (1 dosis diaria). Este inóculo fue administrado a los terneros del G-BAL incorporado junto al sustituto lácteo durante los 35 días que duró el experimento. El G-C fue inoculado de la misma forma pero con 40 ml de la solución de NaCl 0,15M, que sirvió de placebo.

3.2.8. Composición de los alimentos

Todos los alimentos que fueron utilizados en la crianza de los animales no estaban suplementados con antibióticos. El sustituto lácteo contenía un 21% de proteína, un 40% de lactosa y su extracto etéreo era del 16%. El suero de queso contenía un 5% de proteína, un 70% de lactosa y un 4% de grasa. El concentrado comercial fue formulado con los siguientes ingredientes: maíz molido, pellet de soja, afrechillo de trigo, fosfato bicálcico, cloruro de sodio y un núcleo vitamínico-mineral. El mismo contenía 90%

MS, 18% de proteína, 2,9 Mcal kg/MS, 80% de TND, 5% de fibra, 1,2% de calcio y 0,8% de fósforo.

3.2.9. Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA para determinar si existían diferencias significativas entre las variables estudiadas (PV, H, PT, CA, CTA, CAC, GPV, Cag, ICF total y semanal, recuento de huevos de parásitos y concentración de glucosa, colesterol, urea y proteínas séricas totales) del G-C y G-BAL. Los resultados se expresaron como la media aritmética y su desvío estándar. Los eventos de diarrea se analizaron mediante el test de chi cuadrado con corrección de Yates. Las pruebas estadísticas se realizaron con el Programa Statistix para windows versión 1.0.

3.3. Incorporación de bacterias ácido lácticas y lactosa a la dieta de terneros jóvenes y su efecto sobre la performance de crecimiento y el balance microbiano intestinal.

3.3.1. Animales e instalaciones

El trabajo se realizó en el sector destinado a la Crianza Artificial de Terneros correspondiente a la FCV-UNL. Se utilizaron 24 terneros machos lactantes (*Bos taurus*) con una edad promedio de 10 d de vida. La crianza artificial se realizó “en estaca” y sobre piso cubierto por pasto natural. Cada animal estaba sujeto por una cadena a su comedero individual y dispuso de una superficie de terreno limitada por la longitud de la cadena (3m). Cada semana los animales con su estaca fueron trasladados a una nueva superficie, de características similares, libre de eyecciones. Todos los animales fueron alimentados con concentrado peleteado comercial suministrado *ad libitum* a lo largo del experimento y con sustituto lácteo (4 l/d) y agua, racionados directamente en el comedero 2 veces al día. El sustituto lácteo fue reconstituido al 11% MS y entregado a los terneros, a las 6:00 h y 18:00 h, a una temperatura de aproximadamente 38 °C. La lactosa se preparó y suministró junto al sustituto lácteo. Los terneros permanecieron en experimentación durante un período de 35 d. El cuidado de los animales se realizó teniendo en cuenta la Guía para el cuidado y uso de animales de investigación y enseñanza (FASS, 1998).

3.3.2. Ingestión de calostro

Para verificar el nivel de ingestión del calostro por parte de los animales, se extrajeron muestras de sangre (5 ml), de cada ternero antes de iniciar el experimento. La misma fue procesada sin anticoagulante y se determinó el nivel de proteínas séricas totales procesando los sueros con un refractómetro de Goldberg (Quigley, 2001).

3.3.3. Microorganismos

Se utilizaron 3 cepas lácticas de origen bovino: *Lactobacillus casei* DSPV 318T, *Lactobacillus salivarius* DSPV 315T y *Pediococcus acidilactici* DSPV 006T. Estos microorganismos fueron identificados utilizando técnicas de biología molecular (Schneider y col., 2004) y se conservaron a -80 °C en medio MRS con 35% de glicerol. Su número de acceso al Genbank es: FJ787305, FJ787306 y FJ787307, respectivamente. 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.

3.3.4. Diseño del experimento

Se utilizó un diseño factorial conformando bloques completos al azar. Fueron construidos 4 bloques con 6 individuos cada uno, en donde se distribuyeron al azar los 6 tratamientos propuestos (sin probiótico y sin lactosa, P₀L₀; sin probiótico+lactosa en nivel 1, P₀L₁; sin probiótico+lactosa en nivel 2, P₀L₂; con probiótico y sin lactosa, P₁L₀; con probiótico+lactosa en nivel 1, P₁L₁; con probiótico+lactosa en nivel 2, P₁L₂). El inóculo probiótico fue administrado a cada ternero del grupo experimental en donde el factor probiótico estaba a nivel 1 (P₁), una vez al día, junto al sustituto lácteo suministrado por la tarde, durante los 35 d de experimento. En aquellos grupos en donde el factor probiótico estaba a nivel 0 (P₀) los terneros fueron inoculados de la misma forma pero con 40 ml de una solución de NaCl 0,15M, que sirvió de placebo. La lactosa fue administrada a cada ternero del grupo experimental en donde el factor lactosa estaba a nivel 1 (L₁ = 100 g/d) y a nivel 2 (L₂ = 200 g/d). Se determinó diariamente el consumo de agua (CA) y la frecuencia de diarreas, realizando un análisis macroscópico de las heces y asignando valores desde 1 (normal) a 4 (acuosa) de acuerdo a las características de la materia fecal. Esta evaluación se realizó en base a los parámetros de consistencia

fecal de acuerdo con los escores propuestos por Meyer y col. (2001): 1-Normal: heces firmes, pero no duras; su forma original se distorsiona levemente cuando cae y se asienta en el suelo; 2-Blanda, no presenta forma, al caer se deposita en montículos y se dispersa levemente; 3-Fluida: se dispersa rápidamente en láminas de 6 mm de profundidad; 4-Acuosa: consistencia líquida. Se consideró “animal con diarrea”, aquel que tenía escore 4. Los animales con diarrea permanecieron en ayunas por 24 h y se les proporcionó oralmente 1 l de una solución electrolítica hidratante (glucosa 0,623%; cloruro de sodio 1,065%; carbonato de sodio 0,2685%; cloruro de potasio 0,1935%) 2 veces por día. La dieta líquida fue reintroducida después de este período. No se realizaron tratamientos con antibióticos. Por otra parte, como indicador de la intensidad y la duración de las deposiciones se utilizó el índice de consistencia fecal (ICF), empleado por Meyer y col. (2001). Los datos de peso vivo (PV), altura (H) y perímetro torácico (PT) se registraron en forma semanal. El consumo de agua (Cag) y alimentos se determinó en forma diaria. El consumo de alimentos (CTA) fue calculado en base al consumo de sustituto lácteo, lactosa y alimento concentrado peleteado comercial (CAC). La ganancia de peso vivo (GPV) fue obtenida por diferencia entre los pesos en el período de tiempo correspondiente. La conversión alimenticia (CA) fue calculada relacionando el CTA (kg) y la GPV (kg).

3.3.5. Preparación del inóculo

Las bacterias se multiplicaron en caldo MRS durante 18-20 h a 37 °C. Se determinó la densidad óptica de los cultivos a 560 nm y se calculó la concentración bacteriana utilizando una curva de calibración (Frizzo y col., 2006). Los cultivos se centrifugaron a 3000g durante 10 min y se resuspendieron en solución de NaCl. Posteriormente se mezclaron las tres cepas y se completó hasta alcanzar el volumen final. El inóculo probiótico estaba formado por una dosis de 40 ml de una suspensión de los tres microorganismos antes mencionados, en una solución de NaCl 0,15M. Se dosificó con al menos 10^9 UFC/kg peso vivo (1 dosis diaria).

3.3.6. Composición de los alimentos

Todos los alimentos que fueron utilizados en la crianza de los animales no estaban suplementados con antibióticos. El sustituto lácteo contenía un 21% de proteína, un

40% de lactosa y su extracto etéreo era del 16%. La lactosa contenía 99,5% de lactosa (Milkaut, S.A.). El concentrado comercial fue formulado con los siguientes ingredientes: maíz molido, pellet de soja, afrechillo de trigo, fosfato bicálcico, cloruro de sodio y un núcleo vitamínico-mineral. El mismo contenía 90% MS, 18% de proteína, 2,9 Mcal/kg MS, 80% de TND, 5% de fibra, 1,2% de calcio y 0,8% de fósforo.

3.3.7. Pruebas microbiológicas

Las muestras fecales, obtenidas semanalmente de 3 terneros por cada grupo experimental fueron pesadas en condiciones de esterilidad y diluidas 1/100 en solución Ringer $\frac{1}{4}$. Posteriormente se homogeneizaron mediante movimiento en un agitador magnético. Para determinar la carga microbiana, diluciones seriadas de las muestras se sembraron en medios selectivos; LAMVAB para *Lactobacillus* spp. (Timmerman y col., 2005) y VRBL para coliformes (Demecková y col., 2002). Las placas de Petri con LAMVAB se incubaron a 37 °C durante 48 h en condiciones anaeróbicas y aquellas con VRBL fueron incubadas a la misma temperatura durante 24 h. Posteriormente se contaron las colonias características y se calcularon las UFC/g de materia fecal para cada grupo bacteriano.

3.3.8. Necropsias

Al final del ensayo se realizaron las necropsias programadas de dos animales en cada grupo experimental (12 animales totales). Las necropsias se realizaron a las 22 h después de la última administración del probiótico. Los animales fueron insensibilizados mediante una droga eutanásica (Euthanyle®, Brouwer S.A.) administrada en condiciones de asepsia. Los animales fueron desangrados y se siguieron las técnicas convencionales de necropsia (Rodríguez Armesto, 2004). Se recogieron los siguientes órganos: hígado, bazo, nódulo linfático mesentérico, nódulo linfático ileocecal, intestino delgado (duodeno, yeyuno) e intestino grueso (ciego) en esta secuencia utilizando instrumental estéril en cada tejido para minimizar la posibilidad de contaminación bacteriana entre muestras (Lee y col., 2000). El peso del bazo fue determinado y junto con el peso vivo se calculó el índice de peso esplénico (IPE).

3.3.9. Procesamiento de las muestras para la técnica histológica

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

3.3.10. Técnica de inmunohistoquímica

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

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

- 8- Incubación con anticuerpo primario: según se detalla en la tabla 3 durante 16 h a 4°C (toda la noche en heladera). Para los controles de especificidad se sustituyó el anticuerpo primario por SNC.
- 9- Después de la incubación con el anticuerpo primario la cámara se retiró de la heladera y se dejó a temperatura ambiente durante 10 min.
- 10- Dos lavados consecutivos con PBS, 5 min cada uno.
- 11- Incubación con el anticuerpo secundario biotinilado preabsorbido (cabra anti-ratón) diluido 1:50, durante 30 min a temperatura ambiente.
- 12- Dos lavados consecutivos con PBS, 5 min cada uno.
- 13- Incubación con complejo streptavidina-peroxidasa lista para usar, durante 30 min a temperatura ambiente.
- 14- Dos lavados consecutivos con PBS, 5 min cada uno.
- 15- Revelado de la reacción con diaminobencidina (DAB), utilizando la solución comercial de Dako. Los cortes se observaron al microscopio para controlar el tiempo óptimo en cada prueba y de ese modo estandarizarlo.
- 16- Lavados con agua destilada, 2 de 5 min cada uno. Luego se realizó la coloración de contraste con hematoxilina activada (Biopur), deshidratación y montaje con Bálsamo natural de Canadá (Canadax, Biopur) y cubreobjetos apropiados.

Tabla 3: Detalle de los anticuerpos primarios utilizados en la técnica de inmunohistoquímica.

Proteína diana	Anticuerpo	Dilución	Características especiales de la técnica de IHQ.
Inmunoglobulina A	Anti bovine/ovine IgA Clon 842F9 Serotec	1:150	Técnica descrita en la página
CD79	Anti human CD79 α cy Clon HM57 Dako	1:200	Técnica descrita en la página

3.3.11. Análisis de los resultados obtenidos con inmunohistoquímica

Las imágenes generadas con un microscopio Olympus CH2, fueron digitalizadas mediante una cámara SONY CCD-IRIS conectada a una PC de escritorio. La evaluación de los preparados se realizó con el analizador digital de imágenes Image Pro-Plus 3.0. La evaluación de la técnica de inmunohistoquímica se efectuó mediante un análisis de segmentación de colores en los tonos e intensidades correspondientes a las áreas de reactividad del cromógeno utilizado, concordante con lo observado en los

controles positivos. El área inmunohistoquímicamente marcada (AIHQM) se evaluó como un porcentaje del área total evaluada a través de la segmentación de colores, extrayendo los objetos de determinado color (marrón). La coloración marrón fue seleccionada con una sensibilidad de 4 (máximo 5) y luego se aplicó una máscara para la separación permanente de los colores. Se realizó un histograma para determinar el porcentaje del área marcada (Salveti y col., 2004).

3.3.12. Análisis estadístico

Las variables estudiadas (PV, H, PT, CA, CTA, CAC, GPV, Cag, ICF total y semanal y proteínas séricas totales) fueron analizadas utilizando el ANOVA mediante el modelo lineal general (Abu-Tarboush y col., 1996) del Programa SPSS para Windows ver. 11.0.1 y empleando el siguiente modelo lineal:

$$Y_{ijkl} = \mu + B_h + P_i + L_j + T_k + (PL)_{ij} + (LT)_{ik} + (PT)_{ik} + (PLT)_{ijk} + E_{ijkl}$$

donde μ = media general, Y_{ijkl} = l ésima observación en el i ésimo tratamiento probiótico del j ésimo tratamiento lactosa durante el k ésimo período de tiempo.

P_i = efecto del probiótico ($i = 0; 1$); L_j = efecto de la lactosa ($j = 0; 1; 2$); T_k = efecto del período de tiempo ($k = 0-5$); $(PLT)_{ijk}$ = interacción triple entre el factor probiótico, lactosa y período de tiempo; y E_{ijkl} = error experimental.

Los resultados se expresaron como la media aritmética y su desvío estándar. Se evaluó el efecto de los factores probiótico, lactosa y la interacción entre ambos. Las diferencias entre las medias fueron evaluadas utilizando el test de Tukey. Los eventos de diarrea se analizaron mediante el test de chi cuadrado con corrección de Yates.

3.4. Incorporación de bacterias ácido lácticas y lactosa a la dieta de terneros jóvenes y su efecto sobre la colonización intestinal de *Salmonella dublin* DSPV 595T y la invasión a los órganos internos de terneros alimentados con sustituto lácteo.

3.4.1. Animales e instalaciones

El trabajo se realizó en el sector destinado a la Crianza Artificial de Terneros correspondiente a la Facultad de Ciencias Veterinarias. Se utilizaron 15 terneros Holstein (*Bos taurus*) con una edad promedio de 5 d de vida. La crianza artificial se

realizó “en jaula” y sobre piso cubierto por pasto natural. Cada animal estaba alojado en una jaula metálica de 1 m de ancho por 2 m de largo. Cada semana los animales fueron trasladados junto a sus jaulas a una nueva superficie, de iguales características, libre de deyecciones. Todos los animales fueron alimentados con concentrado comercial sin medicamentos suministrado *ad libitum* a lo largo del experimento y con sustituto lácteo (4 l/d) y agua, racionados directamente en el comedero 2 veces al día. El sustituto lácteo fue reconstituido al 11% MS y entregado a los terneros, a las 6:00 y a las 18:00 h, a una temperatura de aproximadamente 38 °C. La lactosa desecada se suministró junto al sustituto lácteo en cantidades de 50 g en cada administración. Los terneros permanecieron en experimentación durante un período de 15 d. El cuidado de los animales se realizó teniendo en cuenta la Guía para el cuidado y uso de animales en investigación y enseñanza (FASS, 1998). El protocolo utilizado fue aprobado previamente por el Comité Asesor en Ética y Seguridad (FCV-UNL).

3.4.2. Microorganismos

Se utilizaron 3 cepas lácticas de origen bovino: *Lactobacillus casei* DSPV 318T, *Lactobacillus salivarius* DSPV 315T y *Pediococcus acidilactici* DSPV 006T que mostraron propiedades probióticas (Frizzo y col., 2005; Frizzo y col., 2006). Estos microorganismos fueron identificados utilizando técnicas de biología molecular (Schneider y col., 2004) y se conservaron a -80 °C en medio MRS con 35% de glicerol. Sus números de acceso al Genbank son: FJ787305, FJ787306 y FJ787307, respectivamente. 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. La cepa de *Salmonella dublin* DSPV595T de origen bovino 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 de la FCV y se conservó 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 fenotípica fue realizada por el Servicio de Enterobacterias del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, dependiente de la Administración Nacional de Laboratorios e Instituto de Salud (A.N.L.I.S.), “Dr. Carlos G. Malbrán” (Argentina). Su número de acceso al Genbank es FJ997268.

3.4.3. Selección de mutantes resistentes a antibióticos

Las cepas del inóculo resistentes a la rifampicina se obtuvieron por cultivos seriales en medio MRS desde niveles bajos hasta una concentración de 100 µg/ml de rifampicina (Kurzak, 2000; Demecková y col., 2002). La rifampicina se preparó en una solución stock (10 mg/ml) y fue utilizada a una concentración final de 10 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. Las cepas resistentes a rifampicina se propagaron en caldo MRS durante 24 h a 37°C. Se compararon los parámetros fisiológicos y bioquímicos de las cepas original y la resistente a rifampicina para asegurar que la única diferencia entre ambas era dicha resistencia. El cultivo de cada una de las cepas resistentes a rifampicina fue conservado a -80 °C en caldo MRS con 35% de glicerol. Las cepas resistentes obtenidas se incorporaron al inóculo probiótico en reemplazo de la cepa original. Un procedimiento similar se utilizó con la cepa de *Salmonella dublin* DSPV 595T utilizando el medio XLD y los antibióticos novobiocina (50 µg/ml) y ácido nalidíxico (10 µg/ml) (XLD_{nov}nal). Los parámetros fisiológicos, bioquímicos y genotípicos de las cepas original y resistente fueron comparados a los fines de garantizar que la diferencia sólo estaba en la resistencia. La verificación se realizó con pruebas bioquímicas (TSI, LIA, SIM, FA) y amplificación por PCR del gen *InvA* específico de *Salmonella* sp.

3.4.4. Preparación y administración del inóculo de BAL

Las bacterias se multiplicaron en caldo MRS durante 18-20 h a 37 °C. Se determinó la densidad óptica a 560 nm de los cultivos para construir una curva de calibración con la cual se calculó la concentración bacteriana (Frizzo y col., 2006). Los cultivos se centrifugaron a 3000g durante 10 min y se resuspendieron en solución de NaCl. Posteriormente se mezclaron las tres cepas y se enrasó hasta alcanzar el volumen final. Las cepas resistentes a rifampicina integraron el inóculo probiótico, el cual estaba formado por una dosis de 40 ml de una suspensión de los tres microorganismos antes mencionados, en una solución de NaCl 0,15M. Se dosificó con al menos 10⁹ UFC/kg peso vivo (1 dosis diaria). Este inóculo fue administrado a los terneros del G-BAL y del

G-BAL-L incorporado junto al sustituto lácteo durante todo el experimento. El G-C fue inoculado de la misma manera pero con 40 ml de la solución de NaCl 0,15M, que sirvió de placebo.

3.4.5. Inoculación del patógeno

La cepa de *Salmonella dublin* DSPV 595T, desarrollada en caldo BHI durante 18 h a 37 °C, fue administrada junto al sustituto lácteo, en el día 11 del experimento, a todos los terneros de los 3 grupos experimentales (G-C, G-BAL y G-BAL-L). Con el fin de establecer la concentración de la cepa a utilizar en los animales se realizaron diluciones decimales a partir de un cultivo madre. A este cultivo y a sus diluciones se les efectuaron determinaciones de densidad óptica a 560 nm y, paralelamente, se realizaron recuentos en placas. Con ambos parámetros se realizó un análisis de regresión. Posteriormente, para cuantificar la cantidad suministrada se utilizó la ecuación $y = 0,4735 \ln(x) + 8,2162$ donde y corresponde a \log_{10} UFC/ml y la variable x mide la absorbancia del cultivo. El inóculo se suministró en una dosis 2×10^{10} UFC/animal. La dosis infectiva fue elegida tomando como referencia la información bibliográfica disponible (Masalski y col. 1987; Steinbach y col., 1996; Deignan y col., 2000) y mediante la comprobación experimental, por estudio previo a este experimento en un lote de 2 terneros.

3.4.6. Perfil bioquímico sanguíneo y leucograma

Se tomaron muestras de sangre (15 ml) las que fueron procesadas para obtener suero y sangre anticoagulada. El suero sanguíneo fue almacenado a -80 °C hasta el momento de realizar las siguientes determinaciones: aspartatoaminotransferasa (AST), alaninoaminotransferasa (ALT), 5 nucleotidasa (5'-Nt), gamaglutamil-transpeptidasa (GGT), fosfatasa alcalina (FAlc), bilirrubina directa (BD), bilirrubina total (BT), proteínas totales (PT), urea y creatinina. Los ensayos se realizaron con un autoanalizador metrolab 2300 plus. La concentración de haptoglobina en plasma fue medida utilizando un kit de ELISA comercial que es específico para la haptoglobina bovina (ALPCO Diagnostics, Salem, NH). Las muestras de plasma fueron diluidas 1:10.000 con el diluyente provisto en el kit antes del análisis. La sangre anticoagulada fue utilizada para realizar el hemograma completo y el plasma obtenido a partir de ella

para la determinación de fibrinógeno. El leucograma se realizó en cámara de Newbauer y el recuento diferencial (fórmula leucocitaria) se efectuó en un microscopio Zeiss a partir de frotis coloreados con Giemsa.

3.4.7. Temperatura corporal

Los datos de temperatura rectal y timpánica fueron medidos 2 veces al día durante todo el ensayo. La temperatura rectal fue medida con un termómetro clínico de mercurio para grandes animales y la temperatura timpánica con un termómetro infrarrojo de oído GA.MA[®] ET 100C.

3.4.8. Diseño del experimento

Los animales se dividieron en 3 grupos experimentales -grupo control (G-C), grupo inoculado con el inóculo (G-BAL) y grupo inoculado con el inóculo de BAL mas lactosa (G-BAL-L)- con 5, 6 y 4 animales cada uno. Los datos de peso vivo (PV) se registraron en forma semanal. El consumo de alimentos se determinó en forma diaria durante los primeros 10 días del ensayo y fue calculado en base al consumo de sustituto lácteo y alimento balanceado comercial. Se midió el consumo de agua diario. Se efectuó un análisis macroscópico de las heces asignando valores desde 1 (normal) a 4 (acuosa) de acuerdo a las características de la materia fecal. Como indicador de la intensidad y la duración de las deposiciones se utilizó el índice de consistencia fecal (ICF) asignando a la consistencia fecal valores de 1, 2, 3 y 4 (Meyer y col. 2001). Se consideró “animal con diarrea”, aquel que tenía valor 4. La severidad de la diarrea fue registrada según el tipo utilizando los siguientes indicadores: mucosa, con sangre, yema de huevo y fibrinosa. Diariamente fue determinado el estado de salud de los individuos: temperatura rectal y timpánica, nivel de deshidratación (Tabla 4) y frecuencia de diarreas realizando un análisis macroscópico de las heces. En base a estos tres parámetros se determinó el estado de enfermedad del animal (temperatura rectal >40,5 °C, nivel de deshidratación ≥ 2 s y score fecal 4). Los días 1, 11, 12, 13, 14 y 15 de ensayo se tomaron muestras de sangre para evaluar el perfil bioquímico sanguíneo, el estado inmunológico general y para determinar la presencia del patógeno. Los días 1, 5, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 de ensayo se tomaron muestras de materia fecal. En los 3 primeros muestreos se efectuó el recuento de *Lactobacillus* totales, de los integrantes

del inóculo de BAL y de la población de coliformes. Además se realizó la determinación de *Salmonella* para verificar el estado de los terneros (ausencia/presencia del patógeno) antes de realizar la infección experimental. En los siguientes muestreos (4^{to}-8^{vo}) se determinó la presencia/ausencia de *Salmonella* en materia fecal.

Tabla 4: Indicadores de la intensidad del nivel de deshidratación. Según Blood y col., (1986).

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

Sequedad y arrugamiento de la piel. El cuerpo y la cara tienen aspecto de encogimiento. Los globos oculares retroceden hacia las cavidades orbitales y la piel parece plegarse. La piel del párpado superior y la del cuello da una de las mejores indicaciones del grado de deshidratación, el cual, con base clínica se evalúa frecuentemente como porcentaje de peso corporal.

Diariamente se realizaron necropsias programadas de un ternero por grupo experimental desde el día 11 del ensayo hasta completar con todas las unidades experimentales. Las lesiones macroscópicas halladas fueron registradas y distintos órganos parenquimatosos fueron recogidos para el diagnóstico microbiológico. El peso del bazo fue determinado y junto con el peso vivo se calculó el índice de peso esplénico (IPE). Para la evaluación de los cambios anatomopatológicos e histológicos se definieron indicadores específicos de lesiones para cada órgano. Como indicador de la intensidad se utilizó el índice de lesiones macroscópicas (ILMacro) e índice de lesiones microscópicas (ILMicro) asignando valores de 1, 2, 3 y 4 según el grado de severidad (1: Sin lesión aparente (SLA), 2: lesión leve, 3: lesión moderada, 4: lesión severa). Dichos indicadores (Tablas 5, 6, y 7) permitieron estandarizar la rutina de observación y evaluar el grado de modificación de las estructuras. A partir de los indicadores observados se elaboró el IL respectivo según la siguiente fórmula:

$$IL = \frac{[(oE1 \times 1) + (oE2 \times 2) + (oE3 \times 3) + (oE4 \times 4)]}{To \times 4} \times 100$$

donde oE1, oE2, oE3 y oE4 representan el número de órganos con score 1, 2, 3 y 4 respectivamente y To representa el total de órganos evaluados por ternero. El To en el ILMacro fue de 7 para órganos diana y 67 para el resto de los órganos estudiados. El To

en el ILMicro fue de 7 para órganos diana y 16 para el resto de los órganos estudiados. Así, tomando la fórmula como base, fue calculado el ILMacro e ILMicro para órganos diana, no diana y para el total de órganos. Cuanto mayor fue este índice más intensa y severa fue el grado de las lesiones observadas.

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

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

Tabla 6: Indicadores de la intensidad de las lesiones microscópicas utilizados para la elaboración del índice de lesiones microscópicas (ILMicro) en los órganos diana estudiados.

Órgano diana	Escore según el grado de severidad de la lesión			
	1	2	3	4
Yeyuno, íleon y	Sin lesión aparente	Enteritis superficial:	Enteritis superficial:	Enteritis necrotizante:

válvula ileocecal	(SLA).	necrosis de los enterocitos del extremo de las vellosidades, leve edema de la lámina propia, eventuales microhemorragias. Cuerpo y fondos glandulares conservados con actividad mitótica regenerativa. Con o sin hiperplasia de los nódulos linfoides regionales.	necrosis de los enterocitos del extremo de las vellosidades, infiltrados mononucleares o mixtos de la lámina propia. Cuerpo y fondos glandulares conservados con actividad mitótica regenerativa. Con hiperplasia de los nódulos linfoides regionales.	necrosis coagulativa de todo o la mayor parte del cuerpo glandular con infiltrados mononucleares o mixtos. Eventual presencia de “nódulos paratifoideos” en la mucosa o en los nódulos linfoides regionales.
NL mesentérico y NL ileocecal	SLA (aunque es difícil establecer esta categoría pues siempre hay algún tipo de reacción del órgano por su relacionamiento con el medio extracelular y con la circulación de linfa con diversa cantidad y calidad antigénica (por ejemplo activación del NL mesentérico en el momento de la digestión), se ha tomado como parámetro el hecho de que haya una neta separación entre la parte folicular con folículos de forma y tamaño regular; y una central con senos amplios, poco poblados de linfocitos y macrófagos fijos).	Linfoadenitis aguda hiperplásica reaccional: hiperplasia de los folículos corticales, aumento de la parte centro folicular respecto a la parafofolicular con aumento de la población de los linfocitos en los senos y de los macrófagos fijos (“catarro” de los senos).	Linfoadenitis aguda hiperplásica inflamatoria: idem al escore 2 pero con hiperemia y edema.	Linfoadenitis aguda con presencia de “nódulos paralinfoides” o linfoadenitis salmonelósica (subcapsulares, foliculares o en los senos).
Hígado	SLA (ausencia de lesiones degenerativas, necróticas e inflamatorias sinuosidades, periportales o intersticiales.	Degeneración parenquimatosa desde la tumefacción celular aguda, la microvacuolar y la grasa, sin signos inflamatorios.	Hepatitis y colangiohepatitis mononuclear o mixta con cambios degenerativos en el parénquima. Eventual estasis colangiolar o	Hepatitis y colangiohepatitis salmonelósica con infiltrado mononuclear o mixto en espacios porta y sinusoides. Presencia de “nódulos

			canalicular por proliferación de los canalículos biliares.	paratifoideos”. Eventualmente colangiohepatitis con tromboembolia centrolobulillar sin NPT (modelo hiperagudo). Concomitante degeneración parenquimatosa.
Bazo	SLA.	Esplenitis aguda (hiperemia e infiltración de los senos).	Esplenitis aguda hemorrágica (tipo infarto rojo).	Esplenitis salmonelósica: con presencia de NPT. Eventualmente, sin NPT (modelo hiperagudo).

Tabla 7: Indicadores de la intensidad de las lesiones microscópicas utilizados para la elaboración del índice de lesiones microscópicas (ILMicro) en los órganos no diana estudiados.

Órgano	Escore según el grado de severidad de la lesión			
	1	2	3	4
Abomaso	Sin lesión aparente (SLA)	Gastritis catarral: edema de la lámina propia, hiperplasia de las células caliciformes con o sin edema de la submucosa.	Gastritis hemorrágica: microhemorragias superficiales, infiltración mononuclear de la lámina propia con o sin edema de la submucosa.	Gastritis necrótica: necrosis de las glándulas con detritos celulares, infiltración mononuclear o mixta con edema de la submucosa.
Duodeno, colon, ciego,	SLA	Enteritis superficial: necrosis de los enterocitos del extremo de las vellosidades, leve edema de la lámina propia, eventuales microhemorragias. Cuerpo y fondos glandulares conservados con actividad mitótica regenerativa.	Enteritis superficial: necrosis de los enterocitos del extremo de las vellosidades, infiltrados mononucleares o mixtos de la lámina propia. Cuerpo y fondos glandulares conservados con actividad mitótica regenerativa.	Enteritis necrotizante: necrosis coagulativa de todo o la mayor parte del cuerpo glandular con infiltrados mononucleares o mixtos. Eventual presencia de “nódulos paratifoideos”.
NL preescapular, NL poplíteo, NL retrofaríngeo, NL mediastínico	SLA (aunque es difícil establecer esta categoría pues siempre hay algún tipo de reacción del órgano)	Linfoadenitis aguda hiperplásica reaccional: hiperplasia de los folículos corticales, aumento de	Linfoadenitis aguda hiperplásica inflamatoria: idem al escore 2 pero con hiperemia y edema.	Linfoadenitis aguda con presencia de “nódulos paralinfoideos” o linfoadenitis

		por su relacionamiento con el medio extracelular y con la circulación de linfa con diversa cantidad y calidad antigénica, se ha tomado como parámetro el hecho de que haya una neta separación entre la parte folicular con folículos de forma y tamaño regular; y una central con senos amplios, poco poblados de linfocitos y macrófagos fijos).	la parte centro folicular respecto a la para folicular con aumento de la población de los linfocitos en los senos y de los macrófagos fijos (“catarro” de los senos).		salmonelósica (subcapsulares, foliculares o en los senos).
Vesícula biliar	SLA.		Autodigestión de la mucosa.	Infiltración periglandular mononuclear con edema de la mucosa.	Necrosis coagulativa de la mucosa.
Pulmón	SLA.		Alveolitis (engrosamiento del tabique alveolar por hiperemia, eventualmente edema).	Alveolitis (engrosamiento del tabique alveolar por hiperemia con edema, exudación de PMN, linfocitos y fibrina).	Neumonía intersticial (los mismos elementos que en (3) con infiltración entre medio de los alvéolos y en los tabiques interlobulillares.
Cerebro, cerebelo y médula oblonga.	SLA.		Hiperemia y congestión meníngea.	Hiperemia y congestión meníngea con hiperemia y edema parenquimatoso. Lesiones neuronales ausentes.	Meningoencefalitis purulenta o fibrinopurulenta con lesiones neuronales isquémicas y gliosis.
Páncreas	SLA		Hiperemia y edema	No aplica	No aplica
Riñón	SLA		Nefritis glomerular exudativa, hiperemia intersticial sin lesión tubular	No aplica	No aplica
Adrenal	SLA		Hiperemia y microhemorragias en la unión córtico medular. Congestión córtico medular	No aplica	No aplica
Corazón	SLA		Hiperemia y microhemorragias.	No aplica	No aplica
Timo	SLA		Timitis: hiperemia y edema interlobulillar	No aplica	No aplica

con escasos
mononucleares y
eosinófilos.

No aplica significa que no están descritas lesiones muy severas en esos órganos porque no son diana de *Salmonella* sp.

3.4.9. Detección de *Salmonella dublin* en sangre

Las muestras de sangre (1 ml) fueron tomadas diariamente a partir de la inoculación con el patógeno desde la vena yugular de todos los terneros utilizando jeringas con agujas hipodérmicas y procesada con citrato como anticoagulante. La mitad de la muestra fue sembrada en caldo rappaport y la otra mitad en caldo selenito cistina. Después de un período de incubación de 12 h a 42 °C en caldo selenito cistina y de 18 h a 42 °C en caldo rappaport, se sembraron placas con agar XLD_{nov nal} las cuales se incubaron 24 h a 37 °C. El hallazgo de colonias típicas junto a la prueba de aglutinación positiva con un anticuerpo policlonal (OS-A, A.N.L.I.S Dr. Carlos G. Malbrán) fue considerado como resultado positivo a *Salmonella dublin*.

3.4.10. Detección de *Salmonella dublin* en materia fecal

Las muestras de materia fecal (aprox. 5 g) fueron tomadas los días 10, 11, 12, 13, 14 y 15 del ensayo desde el recto de todos los terneros mediante masaje rectal. Un gramo fue sembrado en caldo selenito cistina y 0,1 g en caldo rappaport. Después de un período de incubación de 12 h a 42 °C en caldo selenito cistina y de 18 h a 42 °C en caldo rappaport, se sembraron placas con agar XLD_{nov nal} las cuales se incubaron 24 h a 37 °C. El hallazgo de colonias típicas junto a la prueba de aglutinación positiva con un anticuerpo policlonal (OS-A, A.N.L.I.S Dr. Carlos G. Malbrán) fue considerado como resultado positivo a *Salmonella dublin*.

3.4.11. Necropsias

Se realizaron necropsias diarias programadas de un animal en cada grupo experimental desde el día de la administración del patógeno (día 11) hasta el día 15 de experimento. Las necropsias se realizaron a las 22 h después de la última administración del probiótico. Los animales fueron insensibilizados mediante una droga eutanásica (Euthanyle®, Brouwer S.A.) administrada en condiciones de asepsia. Se recogieron los siguientes órganos para determinaciones microbiológicas: bazo, hígado, nódulo linfático

mesentérico, nódulo linfático ileocecal, porciones intestinales (yeyuno, íleon, ciego y colon), nódulo linfático mediastínico, pulmón y nódulo linfático poplíteo en esta secuencia utilizando instrumental estéril en cada tejido para minimizar la posibilidad de contaminación bacteriana entre muestras (Lee y col., 2000). Se tomaron muestras de líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial y bilis para la detección de *Salmonella* sp. Además de las anteriores muestras de tejidos se agregaron las siguientes para el análisis histopatológico: abomaso, duodeno, válvula ileocecal (VIC), nódulo linfático preescapular, nódulo linfático retrofaríngeo, vesícula biliar, páncreas, riñón, adrenal, corazón, timo, cerebro, cerebelo y médula oblonga. El peso del bazo fue determinado y junto con el peso vivo se calculó el índice de peso esplénico (IPE).

3.4.12. Recuperación del inóculo de BAL y recuento de *Lactobacillus* y coliformes en materia fecal

Las muestras fecales de todos los terneros (aprox. 5 g) obtenidas por masaje rectal los días 1, 5 y 10 del ensayo fueron pesadas, diluidas 1/100 en solución Ringer ¼ y homogeneizadas en un agitador magnético. A partir de las diluciones seriadas de cada muestra se sembraron placas de agar LAMVAB para contar la flora láctica total y placas de agar LAMVAB_{rif} para recuperar solamente el inóculo utilizado. Las placas de Petri se incubaron a 37 °C durante 48 h en condiciones anaeróbicas y posteriormente se contaron las colonias características. Se seleccionaron colonias al azar desde las placas con el antibiótico para posteriormente verificar la morfología. El recuento de coliformes se llevó a cabo en placas con el medio VRBL; las mismas se incubaron a 37 °C durante 24 h.

3.4.13. Recuperación del inóculo de BAL y de *Salmonella dublin* desde distintos sectores del intestino de los terneros

El intestino delgado (duodeno y yeyuno) y el intestino grueso (ciego) de los terneros fue obtenido en condiciones asépticas y se hicieron diluciones decimales en solución de Ringer ¼ del raspado de la mucosa para facilitar los recuentos de los lactobacilos totales y de aquellos que formaban parte del inóculo. Para determinar la colonización del tracto intestinal de los terneros por el inóculo utilizado se realizaron recuentos de colonias viables (UFC) recuperadas en el raspado de la mucosa. La presencia del inóculo

bacteriano en el tracto intestinal fue interpretado como colonización por las bacterias (Lee y col., 2000). A partir de las diluciones seriadas de cada muestra se sembraron, por triplicado, placas de agar LAMVAB para contar la flora láctica total y placas de agar LAMVAB_{rif} para recuperar solamente el inóculo utilizado. Las placas de Petri se incubaron a 37 °C durante 48 h en condiciones anaeróbicas y posteriormente se contaron las colonias características. La determinación del patógeno se realizó en medio XLD_{nov nal} incubando las placas 24 h a 37 °C. El hallazgo de colonias típicas junto a la prueba de aglutinación positiva con un anticuerpo policlonal (OS-A, A.N.L.I.S Dr. Carlos G. Malbrán) fue considerado como resultado positivo a *Salmonella dublin*.

3.4.14. Prueba de translocación bacteriana

Trozos de hígado, bazo, y nódulos linfáticos mesentérico e ileocecal íntegros obtenidos en condiciones asépticas fueron homogeneizados con un stomacher (Seward biomaster®) en agua peptonada buferada. A partir de las diluciones seriadas de cada muestra se determinó translocación al medio interno del inóculo de BAL suministrado (LAMVAB_{rif}), de las poblaciones de Lactobacilli (LAMVAB), coliformes (VRBL), enterococos (Slanetz y Blartley) y aerobios totales (BBA suplementado con vitamina K₁ (1 µg/ml) y hemina (5 µg/ml)) sembrando el homogeneizado en placas de petri con los medios correspondientes.

3.4.15. Detección de *Salmonella dublin* en órganos y fluidos del medio interno

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

3.4.16. Procesamiento de las muestras y ensayo histopatológico

Las muestras fueron fijadas en formol bufferado al 10%. La reducción de las muestras se efectuó dentro de las 24 h del sacrificio y luego fueron lavadas en buffer fosfato salino (PBS) y procesadas siguiendo protocolos histológicos de rutina para efectuar la inclusión en parafina (Woods y Ellis, 1994). Por último, se efectuaron cortes seriados de 5 μm de espesor con un micrótopo rotativo, los que se montaron en portaobjetos previamente tratados con 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y fueron secados en estufa a 37 °C por 24 h. Para realizar el ensayo histopatológico se utilizó 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.

3.4.17. Composición de los alimentos

Todos los alimentos que fueron utilizados en la crianza de los animales no estaban suplementados con antibióticos. El sustituto lácteo contenía un 21% de proteína, un 40% de lactosa y su extracto etéreo era del 16%. La lactosa contenía 99,5% de lactosa (Milkaut, S.A.). El concentrado comercial fue formulado con los siguientes ingredientes: maíz molido, pellet de soja, afrechillo de trigo, fosfato bicálcico, cloruro de sodio y un núcleo vitamínico-mineral. El mismo contenía 90% MS, 18% de proteína, 2,9 Mcal/kg MS, 80% de TND, 5% de fibra, 1,2% de calcio y 0,8% de fósforo.

3.4.18. Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA para determinar si existían diferencias significativas entre las variables del G-C, G-BAL y G-BAL-L estudiadas (recuentos microbianos, peso vivo, consumo de alimentos, índice de peso esplénico, hemograma, leucograma y concentración de AST, ALT, 5'-Nt, GGT, FA, BD, BT, PT, urea y creatinina, fibrinógeno y haptoglobina). Los resultados se expresaron como la media aritmética y sus desvíos estándares. La presencia/ausencia de translocación, la morbilidad y los eventos de diarrea se analizaron mediante el test de chi cuadrado. Las pruebas estadísticas se realizaron con el Programa Statistix para windows versión 1.0.

4. RESULTADOS

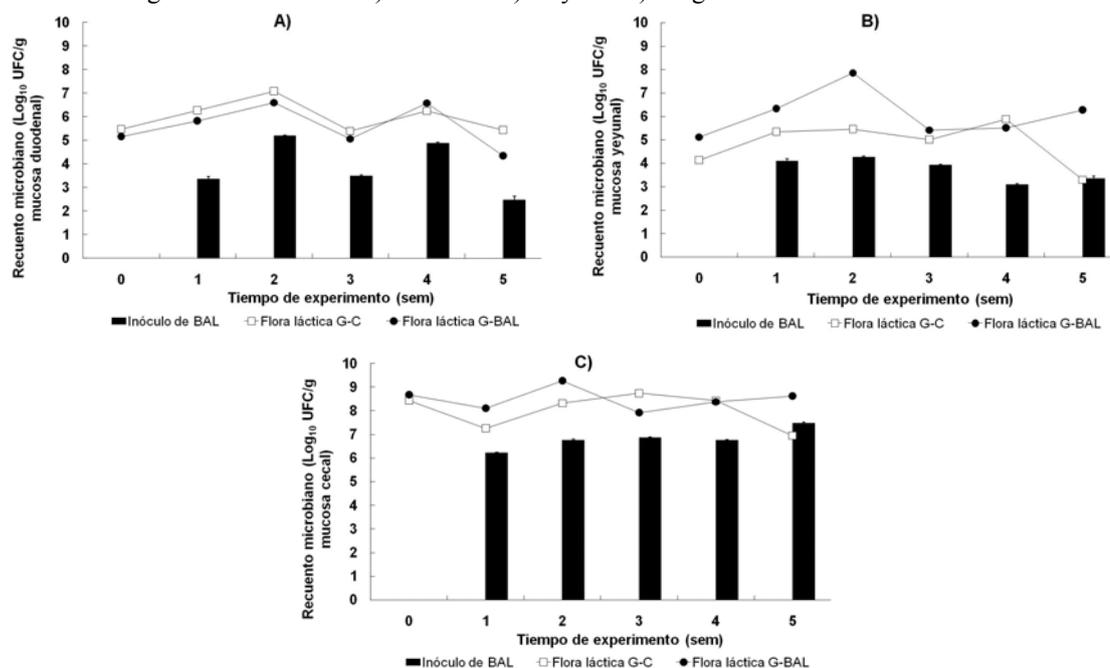
4. RESULTADOS

4.1. Efecto de la suplementación con tres bacterias ácido lácticas de origen bovino sobre la translocación bacteriana, la toxicidad oral aguda, la colonización intestinal, la performance de crecimiento y el estado sanitario

4.1.1. Recuperación de la flora láctica y del inóculo a nivel intestinal

Se observó un alto grado de recuperación de la flora láctica en las diferentes partes del intestino (Figura 4).

Figura 4: Recuperación de la flora láctica desde la microbiota intestinal de los terneros suplementados (G-BAL) y no suplementados (G-C) con el inóculo de bacterias ácido lácticas (Inóculo BAL) a una dosis de 10^9 UFC/kg PV durante 35 d. A) Duodeno B) Yeyuno C) Ciego.



Los recuentos efectuados previamente al inicio del tratamiento, demostraron la ausencia de crecimiento en MRS_{rif} en el raspado de mucosa de los tres órganos en estudio. Esto fue utilizado como control negativo, demostrando que el inóculo administrado, resistente a rifampicina, no era indígena en los terneros empleados en el experimento y confirmando la sensibilidad del modelo para rastrear las tres cepas.

Antes de administrar el inóculo, la flora láctica de las 3 porciones del intestino no presentaba diferencias significativas en ambos grupos ($P > 0,05$), mientras que la flora láctica del ciego resultó ser la más numerosa ($P < 0,05$) de las 3 porciones de intestino, durante toda la experiencia y en ambos grupos.

Administrado el inóculo, los valores de BAL encontrados en el yeyuno y ciego de los animales del G-BAL fueron superiores ($P < 0,05$) respecto de las mismas porciones intestinales del G-C.

La colonización del ciego por parte del inóculo fue significativamente mayor ($P < 0,01$) respecto del duodeno y yeyuno de los animales del G-BAL.

Las cargas microbianas de la flora láctica fueron similares en el duodeno ($P > 0,05$) de ambos grupos mientras que la carga del inóculo fue similar ($P > 0,05$) en duodeno y yeyuno para los animales del G-BAL.

El inóculo utilizado alcanzó niveles menores ($P < 0,05$) a la flora láctica en cada región del intestino del G-BAL.

4.1.2. Estudio de translocación

La incidencia de translocación bacteriana en los diferentes órganos se muestra en tabla 8. No hubo translocación del inóculo administrado hacia los órganos del medio interno de los animales. La presencia de los microorganismos en los órganos investigados no estuvo relacionada con la suplementación del inóculo probiótico. No se encontraron asociaciones entre los recuentos de BAL intestinales y aquellas que translocaron al medio interno. Las poblaciones microbianas que fueron encontradas en el medio interno de los terneros no modificaron el estado de salud de los mismos. Independientemente del grupo experimental, el bazo fue el órgano donde menos frecuentemente se produjo la translocación (Tabla 8 y figura 5).

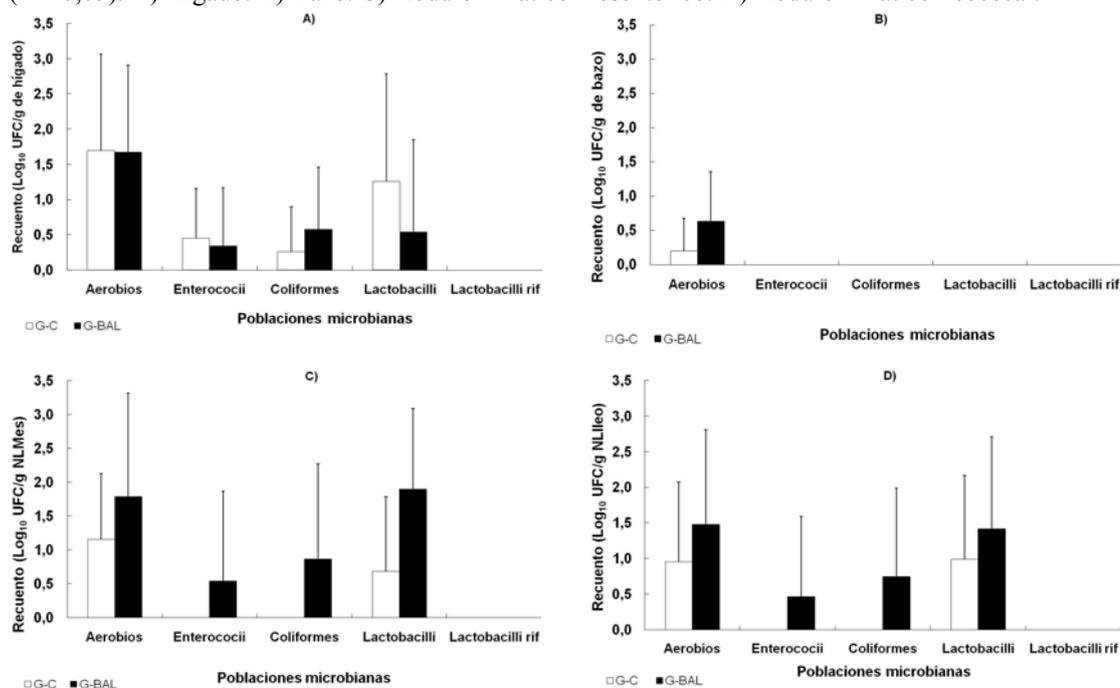
Tabla 8: Translocación bacteriana en diferentes tejidos después de la administración del inóculo probiótico en el grupo control (G-C) y en el grupo inoculado (G-BAL).

Microorganismos	G-C				G-BAL			
	Hígado	Bazo	NLM	NLI	Hígado	Bazo	NLM	NLI
Aerobios	3/5	1/5	3/5	2/5	4/5	2/5	4/5	4/5
<i>Enterococcus</i> sp.	2/5	0/5	0/5	0/5	1/5	1/5	1/5	1/5
Coliformes	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	2/5	2/5
Microbiota láctica	2/5	0/5	1/5	3/5	0/5	0/5	4/5	4/5
Microbiota láctica _{rif}	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

NLM: nódulo linfático mesentérico. NLI: nódulo linfático ileocecal. Microbiota láctica_{rif}: microbiota láctica resistente a rifampicina (100 µg/ml).

Los datos presentados representan el número de cultivos positivos/el número de tejidos estudiados; Test de chi cuadrado: $P > 0,05$.

Figura 5: Translocación bacteriana en diferentes tejidos después de la administración del inóculo probiótico en el grupo control (G-C) y en el grupo inoculado (G-BAL). Los valores representan el log UFC/g de tejido y fueron expresados como la media \pm DS. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$). A) Hígado. B) Bazo. C) Nódulo linfático mesentérico. D) Nódulo linfático ileocecal.



4.1.3. Efecto del tratamiento sobre la performance de crecimiento de los animales

La tabla 9 muestra los valores obtenidos en aquellas variables relacionadas con la performance de crecimiento de los terneros. No existieron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los grupos en el PV, H y PT durante todo el ensayo. La GPV, el CAC, el CTA y el Cag no difirió entre los animales del G-C respecto del G-BAL ($P > 0,05$). Por ende, la CA fue similar en ambos grupos experimentales. La GPV promedio mostró variaciones considerables durante cada semana. Los terneros fueron aumentando paulatinamente su capacidad para ganar peso a lo largo del ensayo. Esto estuvo directamente relacionado con el sostenido aumento del consumo de alimentos a medida que los animales iban creciendo. El consumo total pasó de 3,9 kg a 13,4 kg en el G-BAL y de 4,1 kg a 13,4 kg en el G-C entre la primera y la quinta semana del ensayo. Los valores de conversión alimentaria muestran que los animales del G-C fueron capaces de aumentar en 376 g su peso corporal por cada kilogramo de alimento consumido, mientras que en el G-BAL los animales aumentaron 386 g para un consumo similar; esto representa un consumo de 2,9 kg y 2,7 kg de alimento por cada kilogramo de peso corporal ganado en cada uno de los grupos respectivamente. El Cag semanal

mostró a lo largo del ensayo valores comprendidos entre un rango de 12,3 y 16,4 l y 12,6 y 18,0 l para G-C y G-BAL respectivamente (Tabla 9).

Tabla 9: Performance de crecimiento de terneros suplementados (G-BAL) y no suplementados (G-C) con el inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis de 10^9 UFC/kg PV durante 35 d. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$). Los valores fueron expresados como la media \pm DS.

Parámetros	Tratamiento		P ^a
	G-C	G-BAL	
Terneros (#)	12	12	
Peso inicial (kg)	43,9 \pm 3,33	42,8 \pm 3,07	NS
Peso final (kg)	61,5 \pm 6,51	60,7 \pm 5,80	NS
Ganancia de peso vivo promedio (kg/d)	0,5 \pm 0,2	0,5 \pm 0,1	NS
Ganancia de peso vivo promedio (kg/sem)	3,5 \pm 1,2	3,6 \pm 1,0	NS
semana 1	0,2 \pm 2,0	-0,5 \pm 1,8	NS
semana 2	2,1 \pm 1,2	2,3 \pm 2,1	NS
semana 3	3,9 \pm 2,0	2,8 \pm 2,8	NS
semana 4	5,5 \pm 1,9	6,3 \pm 3,3	NS
semana 5	6,0 \pm 3,8	7,0 \pm 2,5	NS
Consumo total de alimentos (g MS/sem)			
semana 1	4133,9 \pm 706,6	3859,1 \pm 572,6	NS
semana 2	7174,0 \pm 737,9	6816,2 \pm 1106,8	NS
semana 3	10138,7 \pm 1508,6	9881,0 \pm 1556,4	NS
semana 4	11435,2 \pm 1851,3	11652,7 \pm 2005,3	NS
semana 5	13400,9 \pm 2336,0	13359,3 \pm 1699,5	NS
Consumo de concentrado (g MS/sem)			
semana 1	1493,9 \pm 706,6	1219,1 \pm 572,6	NS
semana 2	4094,0 \pm 737,9	3736,2 \pm 1106,8	NS
semana 3	6178,7 \pm 1508,6	5921,0 \pm 1556,4	NS
semana 4	8355,2 \pm 1851,3	8572,7 \pm 2005,3	NS
semana 5	10320,9 \pm 2336,0	10279,3 \pm 1699,5	NS
Conversión alimenticia (kg MS consumida/kg PV ganado)	2,9 \pm 1,2	2,7 \pm 0,5	NS
Conversión alimenticia (g PV ganado /kg MS consumida)	376,3 \pm 114,8	385,5 \pm 62,9	NS
Consumo de agua (l/sem)			
semana 1	12,3 \pm 5,6	13,5 \pm 5,6	NS
semana 2	12,3 \pm 5,1	12,6 \pm 6,2	NS
semana 3	12,7 \pm 5,6	13,1 \pm 6,1	NS
semana 4	16,4 \pm 5,6	18,0 \pm 4,5	NS
semana 5	12,7 \pm 6,0	14,4 \pm 5,0	NS

Altura inicial (cm)	80,0 ± 2,0	79,3 ± 2,4	NS
Altura final (cm)	85,4 ± 2,2	84,8 ± 2,7	NS
Perímetro torácico inicial (cm)	80,9 ± 2,4	80,8 ± 2,0	NS
Perímetro torácico final (cm)	90,8 ± 2,7	90,9 ± 3,3	NS

^aDiferencias no significativas, definidas como $P > 0,05$, son expresadas como NS.

4.1.4. Efecto del tratamiento sobre la frecuencia de diarreas, el índice de consistencia fecal y la tasa de mortalidad

No se observaron eventos de diarreas en ninguno de los animales que integraron el ensayo y, por lo tanto, no fue posible encontrar diferencias significativas entre ambos grupos experimentales (Tabla 10). El ICF calculado para todo el ensayo fue similar ($P > 0,05$) en el G-C (48,7 %) comparado con el G-BAL (47,6 %).

Tabla 10: Índice de consistencia fecal, análisis coproparasitológico y frecuencia de diarreas en terneros suplementados (G-BAL) y no suplementados (G-C) con el inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis de 10^9 UFC/kg PV durante 35 d. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$). Los valores fueron expresados como la media ± DS.

Parámetros	Tratamiento		<i>P</i> ^a
	G-C	G-BAL	
Terneros (#)	12	12	
Índice de consistencia fecal (%)			
semana 1	55,7 ± 7,7	53,0 ± 5,7	NS
semana 2	48,5 ± 4,4	48,2 ± 7,1	NS
semana 3	50,3 ± 6,5	48,8 ± 4,7	NS
semana 4	41,1 ± 6,2	39,6 ± 4,2	NS
semana 5	47,9 ± 4,4	48,2 ± 3,2	NS
semana 1-5	48,7 ± 3,5	47,6 ± 2,7	NS
Análisis coproparasitológico (HPG)			
semana 1	43,0 ± 3,7	42,8 ± 3,1	NS
semana 2	44,1 ± 3,6	42,3 ± 3,6	NS
semana 3	46,2 ± 3,5	44,6 ± 4,1	NS
semana 4	50,1 ± 4,5	47,4 ± 4,8	NS
semana 5	55,6 ± 5,4	53,7 ± 5,6	NS
Frecuencia de diarrea (eventos)	0	0	

^aDiferencias no significativas, definidas como $P > 0,05$, son expresadas como NS.

Los valores semanales del ICF tampoco mostraron diferencias ($P > 0,05$) entre los grupos. Aunque el número de huevos de parásitos en materia fecal fue aumentando a través del ensayo, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre grupos a

lo largo del experimento (Tabla 10). No fue posible comprobar algún efecto del inóculo administrado sobre la carga parasitaria de los animales. El estado de salud de todos los terneros fue excelente a lo largo del estudio. No se observaron signos de enfermedad, ni se produjeron muertes en los individuos de los dos lotes que formaron parte del ensayo.

4.1.5. Perfil bioquímico sanguíneo, leucograma e índice de peso esplénico

Los parámetros bioquímicos sanguíneos se muestran en la figura 6, los resultados del leucograma se presentan en la figura 7 y el IPE de los terneros se muestra en la figura 8. No hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) entre el G-C y el G-BAL en ninguna de las variables estudiadas.

Figura 6: Parámetros bioquímicos sanguíneos en terneros suplementados (G-BAL) y no suplementados (G-C) con el inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis de 10^9 UFC/kg PV durante 35 d. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$). Los valores fueron expresados como la media \pm DS. Las líneas de punto encierran un rango de datos que representan los valores de referencia reportados previamente. A) Proteínas séricas totales. B) Glucosa. C) Urea. D) Colesterol total.

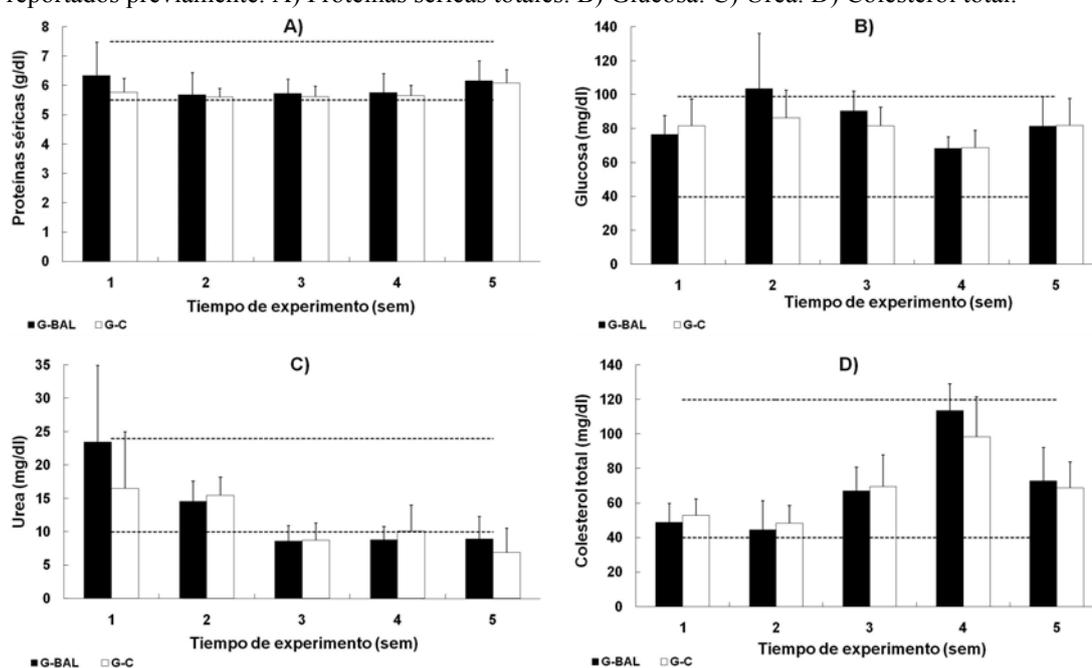


Figura 7: Parámetros sanguíneos en terneros suplementados (G-BAL) y no suplementados (G-C) con el inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis de 10^9 UFC/kg PV durante 35 d. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$). Los valores fueron expresados como la media \pm DS. Las líneas de punto encierran un rango de datos que representan los valores de referencia reportados previamente. A) Leucocitos totales. B) Neutrófilos. C) Linfocitos. D) Eosinófilos. E) Monocitos. F) Basófilos.

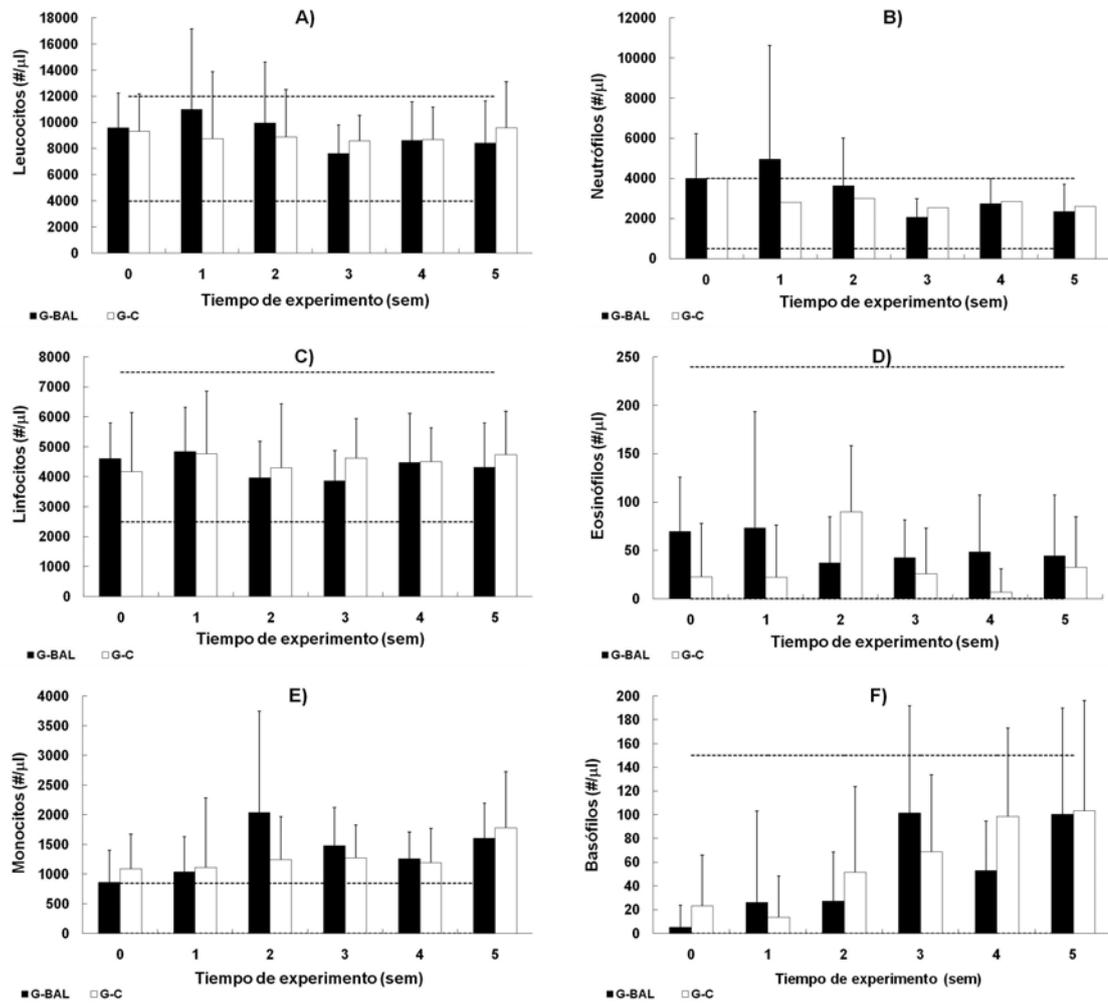
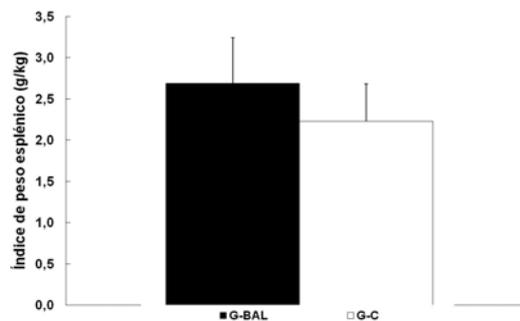


Figura 8: Índice de peso esplénico en terneros suplementados (G-BAL) y no suplementados (G-C) con el inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis de 10^9 UFC/kg PV durante 35 d. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$). Los valores indicados representan el peso del bazo (g)/peso vivo (kg) (media \pm DS).



4.2. Influencia del inóculo de BAL y el suero de queso sobre la performance de crecimiento y el estado sanitario de los terneros

4.2.1. Efecto del tratamiento sobre la performance de crecimiento de los animales

La tabla 11 muestra los valores obtenidos en aquellas variables relacionadas con la performance de crecimiento de los terneros. Los valores iniciales de PV, H y PT fueron similares en ambos grupos estudiados ($P > 0,05$, Tabla 10). El G-BAL presentó valores de PV y PT superiores ($P < 0,05$) al final de la experiencia. En ambos grupos el PV se incrementó en función del tiempo, resultando significativamente superior ($P < 0,05$) el peso del G-BAL, respecto del G-C, en la quinta semana. Durante la primera semana de tratamiento únicamente el G-C mostró una pérdida de peso corporal, situación que no volvió a ocurrir durante el ensayo. Los grupos no se diferenciaron ($P > 0,05$) en la H después de 35 días de ensayo (Tabla 11).

Tabla 11: Performance de crecimiento de terneros alimentados con suero de queso y suplementados (G-BAL) y no suplementados (G-C) con el inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis de 10^9 UFC/kg PV durante 35 d. Los valores fueron expresados como la media \pm DS.

Parámetros	Tratamientos		P ^a
	G-C	G-BAL	
Terneros (#)	8	8	
Peso inicial (kg)	44,6 \pm 3,2	49,0 \pm 7,7	NS
Peso final (kg)	59,6 \pm 5,7	71,7 \pm 12,6	0,0261
Ganancia de peso vivo promedio (kg/d)	0,381 \pm 0,121	0,702 \pm 0,201	0,0017
Ganancia de peso vivo promedio (kg/sem)			
semana 1	-0,7 \pm 3,1	2,3 \pm 1,8	0,0332
semana 2	2,7 \pm 1,7	5,9 \pm 3,3	0,0125
semana 3	3,2 \pm 1,3	3,3 \pm 1,5	NS
semana 4	4,9 \pm 2,6	5,8 \pm 1,2	NS
semana 5	3,2 \pm 3,9	7,2 \pm 1,8	0,0205
semana 1-5	2,7 \pm 0,8	4,9 \pm 1,4	0,0016
Consumo total de alimentos (kg MS/ternero)	40,73 \pm 3,7	57,38 \pm 3,9	0,0000
Consumo total de alimentos (kg MS/sem)			
semana 1	5,11 \pm 0,35	5,13 \pm 0,23	NS
semana 2	5,65 \pm 0,35	8,33 \pm 0,55	0,0000
semana 3	6,54 \pm 0,58	9,19 \pm 0,60	0,0000
semana 4	11,27 \pm 1,84	15,14 \pm 1,02	0,0001

semana 5	12,17 ± 1,50	19,58 ± 2,28	0,0000
semana 1-5	8,15 ± 0,73	11,48 ± 0,79	0,0000
Consumo de concentrado (kg MS/ternero)	18,97 ± 0,33	35,3 ± 4,38	0,0000
Consumo de concentrado (kg MS/sem)			
semana 1	0,71 ± 0,30	0,73 ± 0,33	NS
semana 2	1,32 ± 0,52	3,85 ± 0,55	0,0000
semana 3	2,30 ± 0,77	4,95 ± 0,85	0,0000
semana 4	6,79 ± 1,84	10,66 ± 1,02	0,0001
semana 5	7,85 ± 1,31	15,10 ± 2,28	0,0000
semana 1-5	3,79 ± 0,65	7,06 ± 0,88	0,0000
Conversión alimenticia (kg MS consumida/kg PV ganado)	3,32 ± 0,99	2,48 ± 0,65	0,0699
Conversión alimenticia (g PV ganado/kg MS consumida)	326,6 ± 99,3	424,7 ± 99,3	0,0681
Consumo de agua (l/semana)			
semana 1	17,7 ± 4,9	16,3 ± 3,9	NS
semana 2	14,9 ± 5,0	16,6 ± 5,5	NS
semana 3	14,7 ± 3,8	14,8 ± 2,6	NS
semana 4	19,3 ± 7,3	18,4 ± 5,1	NS
semana 5	18,1 ± 5,8	20,2 ± 5,2	NS
semana 1-5	16,9 ± 4,2	17,3 ± 3,7	NS
Perímetro torácico inicial (cm)	80,3 ± 2,1	83,3 ± 3,7	NS
Perímetro torácico final (cm)	90,5 ± 2,6	95,0 ± 4,4	0,0403
Altura inicial (cm)	81,3 ± 1,5	82,9 ± 3,0	NS
Altura final (cm)	85,8 ± 2,0	89,3 ± 4,4	NS

^aDiferencias no significativas, definidas como $P > 0,05$, son expresadas como NS.

El aumento de peso de los terneros se fue incrementando paulatinamente a lo largo del ensayo. Esto estuvo directamente relacionado con el aumento sostenido del consumo de alimentos a medida que los animales iban creciendo. El CTA pasó de 5,13 kg a 19,58 kg en el G-BAL y de 5,11 kg a 12,17 kg en el G-C entre la primera y la quinta semana del ensayo. Los animales del G-BAL tuvieron consumos superiores ($P < 0,05$) a partir de la segunda semana del ensayo (Tabla 11). El CAC fue superior en los animales del G-BAL desde la segunda semana y hasta el final de la experiencia.

Los animales del G-BAL lograron mayores GPV ($P < 0,05$) que los del G-C durante la primera, segunda y quinta semana. La diferencia encontrada durante la primera semana a favor del G-BAL coincide en tiempo con la evidente pérdida de peso que tuvieron los animales del G-C. El valor de GPV promedio durante todo el experimento

fue de 0,702 kg/d para el G-BAL, mientras que para el G-C fue de 0,381 kg/día ($P < 0,05$). Los valores de conversión alimentaria muestran que los animales del G-BAL fueron capaces de aumentar en 425 g su peso corporal por cada kilogramo de alimento consumido, mientras que los del G-C aumentaron sólo 327 g para un consumo similar; esto representa un consumo de 2,5 kg y 3,3 kg por cada kilogramo de peso corporal ganado en cada uno de los grupos respectivamente. Aunque no hubo diferencias entre grupos ($P > 0,05$) en los valores de conversión antes mencionados, hubo una tendencia ($P = 0,07$) favorable al G-BAL.

No se encontraron diferencias ($P > 0,05$) entre los grupos en el consumo de agua semanal. Esta variable mostró valores comprendidos entre un rango de 14,7 y 20,2 l con valores medios en todo el experimento de 16,9 y 17,3 l para G-C y G-BAL respectivamente (tabla 11).

4.2.2. Efecto del tratamiento sobre la frecuencia de diarreas, el índice de consistencia fecal, la carga parasitaria y la tasa de mortalidad

Aunque no hubo diferencias ($P > 0,05$) en la frecuencia de diarreas entre el G-C (62,5% de los animales) y el G-BAL (37,5% de los animales), el ICF fue mayor en el primer grupo (62,9%) comparado con el segundo (57,0%) ($P < 0,05$). Teniendo en cuenta los valores semanales del ICF, se puede apreciar que el G-BAL mostró diferencias ($P < 0,05$) respecto del G-C durante la semana 5 (Tabla 12). No se produjeron muertes en los individuos de los dos lotes que formaron parte del ensayo. Aunque el número de huevos de parásitos en materia fecal fue aumentando a través del ensayo, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre grupos a lo largo del experimento (Tabla 12). No fue posible comprobar algún efecto del inóculo administrado sobre la carga parasitaria de los animales.

Tabla 12: Índice de consistencia fecal, análisis coproparasitológico y frecuencia de diarreas en terneros alimentados con suero de queso y suplementados (G-BAL) y no suplementados (G-C) con el inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis de 10^9 UFC/kg PV durante 35 d. Los valores fueron expresados como la media \pm DS.

Parámetros	Tratamiento		P^a
	G-C	G-BAL	
Terneros (#)	8	8	
Índice de consistencia fecal (%)			
semana 1	62,5 \pm 7,4	60,3 \pm 5,9	NS

semana 2	59,8 ± 7,3	54,5 ± 6,0	NS
semana 3	65,2 ± 8,3	62,9 ± 6,0	NS
semana 4	62,5 ± 6,9	54,5 ± 8,9	0,0658
semana 5	64,3 ± 10,6	52,7 ± 5,3	0,0156
semana 1-5	62,9 ± 4,7	57,0 ± 4,2	0,0179
Análisis coproparasitológico (HPG)			
semana 0	45,8 ± 5,1	49,0 ± 7,8	NS
semana 1	45,1 ± 2,3	50,7 ± 8,3	NS
semana 2	48,3 ± 1,9	55,4 ± 9,9	NS
semana 3	51,4 ± 2,8	58,7 ± 10,4	NS
semana 4	56,4 ± 3,4	64,5 ± 11,5	NS
semana 5	62,9 ± 4,3	67,9 ± 11,7	NS
semana 1-5	51,6 ± 6,9	57,7 ± 7,5	NS
Frecuencia de diarrea (eventos)	8	4	NS

^aDiferencias no significativas, definidas como $P > 0,05$, son expresadas como NS.

4.2.3. Perfil bioquímico sanguíneo

Los resultados obtenidos en las variables medidas para evaluar el perfil bioquímico sanguíneo se muestran en la tabla 13. La concentración de proteínas séricas totales, urea y glucosa no fue afectada por el tratamiento, situación que se verifica al no encontrarse diferencias significativas ($P > 0,05$) entre el G-C y el G-BAL. Sólo hubo una tendencia ($P = 0,06$) durante la segunda semana, en donde los valores de urea alcanzaron los 17,1 mg/dl en el G-C y 13,5 mg/dl en el G-BAL (Tabla 13). Los animales de ambos grupos tampoco se diferenciaron ($P > 0,05$) en su contenido en proteínas séricas totales antes de iniciar el ensayo. Los valores de colesterol fueron diferentes entre los grupos ($P < 0,05$) en las dos primeras semanas, mostrando G-BAL niveles superiores respecto al control.

Tabla 13: Parámetros bioquímicos sanguíneos en terneros alimentados con suero de queso y suplementados (G-BAL) y no suplementados (G-C) con el inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis de 10^9 UFC/kg PV durante 35 d. Los valores fueron expresados como la media ± DS.

Parámetros	Tratamiento		P^a
	G-C	G-BAL	
Terneros (#)	8	8	
Proteínas séricas totales (g/dl)			
semana 0	5,9 ± 0,9	5,6 ± 0,4	NS
semana 1	6,2 ± 0,7	5,7 ± 0,3	NS
semana 2	5,8 ± 0,6	5,5 ± 0,6	NS

semana 3	5,6 ± 0,6	5,7 ± 0,3	NS
semana 4	5,5 ± 0,5	5,7 ± 0,6	NS
semana 5	6,1 ± 0,6	5,8 ± 0,5	NS
Glucosa (mg/dl)			
semana 1	85,7 ± 23,0	79,0 ± 13,3	NS
semana 2	93,6 ± 21,2	93,6 ± 19,9	NS
semana 3	116,1 ± 19,8	88,6 ± 39,8	NS
semana 4	79,3 ± 8,8	73,6 ± 9,7	NS
semana 5	81,5 ± 15,3	82,8 ± 17,1	NS
Urea (mg/dl)			
semana 1	22,3 ± 5,5	18,6 ± 5,8	NS
semana 2	17,1 ± 4,2	13,5 ± 2,4	0,0561
semana 3	9,0 ± 5,0	6,0 ± 1,2	NS
semana 4	9,5 ± 2,5	10,0 ± 4,0	NS
semana 5	6,7 ± 4,6	6,8 ± 2,4	NS
Colesterol total (mg/dl)			
semana 1	43,0 ± 19,4	70,6 ± 22,7	0,0204
semana 2	39,0 ± 10,4	60,5 ± 22,1	0,0258
semana 3	53,5 ± 16,2	75,0 ± 24,7	0,0584
semana 4	82,1 ± 13,6	104,9 ± 32,6	0,0901
semana 5	60,8 ± 12,1	81,3 ± 39,3	NS

^aDiferencias no significativas, definidas como $P > 0,05$, son expresadas como NS.

4.3. Incorporación de bacterias ácido lácticas y lactosa a la dieta de terneros jóvenes y su efecto sobre la performance de crecimiento y el balance microbiano intestinal

4.3.1. Efecto del tratamiento sobre la performance de crecimiento de los animales

La tabla 14 muestra los valores obtenidos en aquellas variables relacionadas con la performance de crecimiento de los terneros. Los valores iniciales de PV, H y PT fueron similares en ambos grupos estudiados ($P > 0,05$). El análisis de los pesos mostró que la diferencia fue significativa ($P < 0,05$) para el factor probiótico ($P_0 = 52,2$ kg; $P_1 = 54,3$ kg) y para la interacción probiótico*lactosa. No hubo diferencias en la altura, perímetro torácico, consumo y conversión alimenticia. No obstante, esta última tuvo una clara tendencia ($P = 0,0962$) a favor del factor probiótico ($P_0 = 2,27$ kg consumo/kg ganancia de peso; $P_1 = 2,02$ kg consumo/kg ganancia de peso).

Tabla 14: Performance de crecimiento de terneros suplementados con lactosa a tres niveles (L₀, L₁ y L₂) y suplementados con probióticos a 2 niveles (P₀ y P₁). El suplemento probiótico fue administrado a dosis diaria de 10⁹ UFC/kg PV durante 35 d solamente en P₁. La lactosa fue administrada a una dosis diaria de 100 g y 200 g en L₁ y L₂ respectivamente. Los valores fueron expresados como la media ± DS.

Parámetros	Tratamientos										P ^a
	P ₀ L ₀	P ₀ L ₁	P ₀ L ₂	P ₁ L ₀	P ₁ L ₁	P ₁ L ₂	P	L	P*L	P*L	
Terneros (#)	4	4	4	4	4	4	--	--	--	--	--
Peso inicial (kg)	45,7 ± 2,6	46,0 ± 3,6	45,3 ± 3,1	45,9 ± 2,8	45,8 ± 3,5	46,1 ± 3,3	NS	NS	NS	NS	NS
Peso final (kg)	59,7 ± 2,9	62,2 ± 6,8	63,5 ± 10,2	65,5 ± 5,0	65,4 ± 8,7	62,6 ± 1,8	0,003	NS	NS	0,048	NS
Ganancia de peso vivo promedio (kg/d)	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,1	NS	NS	NS	NS	NS
Ganancia de peso vivo promedio (kg/sem)	2,8 ± 0,7	3,2 ± 0,8	3,6 ± 1,6	3,9 ± 0,6	3,9 ± 1,5	3,3 ± 0,6	NS	NS	NS	NS	NS
Semana 1	-3,0 ± 2,2	-1,4 ± 1,4	0,1 ± 3,8	0,0 ± 1,5	-0,3 ± 3,1	0,1 ± 1,2	NS	NS	NS	NS	NS
Semana 2	4,5 ± 0,9	4,9 ± 1,5	3,1 ± 1,9	5,1 ± 1,9	5,3 ± 2,7	4,6 ± 0,9	NS	NS	NS	NS	NS
Semana 3	1,9 ± 2,5	2,2 ± 0,9	2,9 ± 2,1	1,3 ± 2,2	2,8 ± 4,2	0,7 ± 2,8	NS	NS	NS	NS	NS
Semana 4	4,4 ± 1,3	5,1 ± 1,1	6,4 ± 1,6	6,6 ± 0,8	6,7 ± 1,1	3,6 ± 2,0	NS	NS	NS	NS	NS
Semana 5	6,2 ± 2,4	5,4 ± 1,0	5,8 ± 1,4	6,7 ± 1,1	5,1 ± 1,3	7,5 ± 4,1	NS	NS	NS	NS	NS
Consumo de concentrado (kg MS/ternero)	16,9 ± 4,6	15,2 ± 5,1	19,3 ± 8,0	20,9 ± 4,0	19,1 ± 6,1	15,1 ± 4,3	NS	NS	NS	NS	NS
Consumo de concentrado (kg MS/sem)	3,38 ± 0,91	3,05 ± 1,01	3,85 ± 1,60	4,19 ± 0,80	3,82 ± 1,22	3,02 ± 0,85	NS	NS	NS	0,003	NS
Semana 1	0,65 ± 0,26	0,45 ± 0,19	1,58 ± 1,02	0,89 ± 0,33	0,90 ± 0,54	0,92 ± 0,14	NS	0,06	NS	0,08	NS
Semana 2	1,52 ± 0,49	1,07 ± 0,62	1,96 ± 1,24	1,75 ± 0,44	1,69 ± 0,96	1,85 ± 0,41	NS	NS	NS	NS	NS
Semana 3	2,71 ± 1,09	2,37 ± 0,97	2,94 ± 1,86	3,20 ± 0,52	2,73 ± 1,37	2,35 ± 1,14	NS	NS	NS	NS	NS
Semana 4	4,78 ± 1,38	4,66 ± 1,54	5,25 ± 2,42	6,47 ± 1,40	6,33 ± 1,77	4,60 ± 1,68	NS	NS	NS	NS	NS
Semana 5	7,25 ± 1,54	6,69 ± 1,95	7,54 ± 1,95	8,64 ± 1,47	7,46 ± 1,91	5,38 ± 1,45	NS	NS	NS	NS	NS

Consumo total de alimentos (kg MS/ternero)	32,2 ± 4,5	33,7 ± 5,3	38,8 ± 8,9	36,2 ± 3,9	37,3 ± 6,4	34,9 ± 4,6	NS	NS	NS
Consumo total de alimentos (kg MS/sem)	6,44 ± 0,90	6,75 ± 1,07	7,76 ± 1,78	7,25 ± 0,78	7,47 ± 1,29	6,99 ± 0,93	NS	NS	0,010
Semana 1	3,62 ± 0,33	3,96 ± 0,47	5,74 ± 1,23	3,97 ± 0,33	4,54 ± 0,62	4,76 ± 0,82	NS	0,001	0,059
Semana 2	4,60 ± 0,50	4,85 ± 0,62	5,64 ± 1,41	4,83 ± 0,44	5,33 ± 1,08	5,69 ± 1,00	NS	NS	NS
Semana 3	5,79 ± 1,09	6,02 ± 1,11	5,98 ± 2,09	6,17 ± 0,48	6,11 ± 1,65	5,87 ± 1,46	NS	NS	NS
Semana 4	7,86 ± 1,38	8,44 ± 1,54	9,41 ± 2,84	9,55 ± 1,40	10,11 ± 1,77	8,76 ± 1,36	NS	NS	NS
Semana 5	10,33 ± 1,54	10,47 ± 1,95	12,02 ± 1,95	11,72 ± 1,47	11,24 ± 1,91	9,86 ± 1,45	NS	NS	NS
Conversión alimenticia (kg MS consumida/kg PV ganado)	2,4 ± 0,5	2,1 ± 0,1	2,3 ± 0,4	1,9 ± 0,2	2,0 ± 0,5	2,1 ± 0,3	0,096	NS	NS
Conversión alimenticia (g PV ganados/kg MS consumida)	433,1 ± 102,3	471,9 ± 34,1	453,3 ± 90,9	542,1 ± 61,0	511,7 ± 111,9	473,2 ± 71,2	0,097	NS	NS
Semana 1	-863,5 ± 676,7	-338,6 ± 367,1	-71,0 ± 560,3	-28,2 ± 373,3	-95,0 ± 677,6	13,7 ± 224,7	NS	NS	NS
Semana 2	991,9 ± 280,0	1001,2 ± 174,5	519,0 ± 307,6	1079,1 ± 470,7	974,0 ± 457,0	813,0 ± 106,5	NS	NS	NS
Semana 3	272,2 ± 397,6	365,9 ± 147,9	480,9 ± 338,9	195,7 ± 331,2	346,6 ± 699,5	174,2 ± 595,4	NS	NS	NS
Semana 4	555,6 ± 85,6	603,3 ± 96,6	728,9 ± 326,0	694,8 ± 116,8	674,9 ± 153,2	430,1 ± 236,6	NS	NS	NS
Semana 5	621,3 ± 277,2	511,1 ± 45,0	481,6 ± 78,4	579,9 ± 120,1	449,4 ± 53,0	738,1 ± 292,2	NS	NS	NS
Altura inicial (cm)	84,5 ± 3,0	84,3 ± 2,2	85,3 ± 1,5	81,8 ± 6,0	83,8 ± 1,9	83,5 ± 3,1	NS	NS	NS
Altura final (cm)	90,8 ± 1,0	93,8 ± 3,3	94,8 ± 4,6	93,8 ± 1,3	95,8 ± 3,1	93,3 ± 1,0	0,069	NS	NS
Perímetro torácico inicial (cm)	79,0 ± 4,7	79,8 ± 1,3	79,8 ± 1,3	77,5 ± 2,1	80,3 ± 3,8	78,8 ± 2,2	NS	NS	NS
Perímetro torácico final (cm)	87,3 ± 6,1	85,3 ± 1,7	85,3 ± 2,6	85,5 ± 2,9	84,5 ± 3,0	84,8 ± 1,7	NS	NS	NS

^aDiferencias no significativas, definidas como $P > 0,05$, son expresadas como NS.

Tabla 15: Índice de consistencia fecal de terneros suplementados con lactosa a tres niveles (L_0 , L_1 y L_2) y suplementados con probióticos a 2 niveles (P_0 y P_1). El suplemento probiótico fue administrado a dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV durante 35 d solamente en P_1 . La lactosa fue administrada a una dosis diaria de 100 g y 200 g en L_1 y L_2 respectivamente. Los valores fueron expresados como la media \pm DS.

Parámetros	Tratamientos										P^a
	P_0L_0	P_0L_1	P_0L_2	P_1L_0	P_1L_1	P_1L_2	P	L	$P*L$		
Terneros (#)	4	4	4	4	4	4	--	--	--	--	--
Índice de consistencia fecal (%)											
Semana 1	59,8 \pm 20,9	54,5 \pm 13,2	64,3 \pm 7,7	53,6 \pm 7,7	57,1 \pm 6,5	58,9 \pm 14,4	NS	NS	NS	NS	NS
Semana 2	33,0 \pm 6,8	40,2 \pm 14,4	64,3 \pm 4,1	28,6 \pm 2,9	47,3 \pm 5,4	58,9 \pm 20,7	NS	0,00	NS	NS	NS
Semana 3	34,8 \pm 6,1	42,0 \pm 20,3	69,6 \pm 7,4	37,5 \pm 20,3	50,9 \pm 11,8	69,6 \pm 15,0	NS	0,00	NS	NS	NS
Semana 4	32,1 \pm 4,1	42,9 \pm 6,5	61,6 \pm 13,8	37,5 \pm 7,1	34,8 \pm 8,9	57,1 \pm 14,0	NS	0,00	NS	NS	NS
Semana 5	28,6 \pm 6,4	42,9 \pm 9,7	41,1 \pm 13,2	41,1 \pm 12,5	37,5 \pm 15,0	47,3 \pm 15,3	NS	NS	NS	NS	NS
Semana 1-5	37,9 \pm 3,8	44,5 \pm 7,2	60,4 \pm 7,5	39,3 \pm 7,2	45,7 \pm 6,7	58,4 \pm 15,4	NS	0,00	NS	NS	NS
Frecuencia de diarrea (eventos)	1	3	18	1	5	16	--	--	--	--	--

^aDiferencias no significativas, definidas como $P > 0,05$, son expresadas como NS.

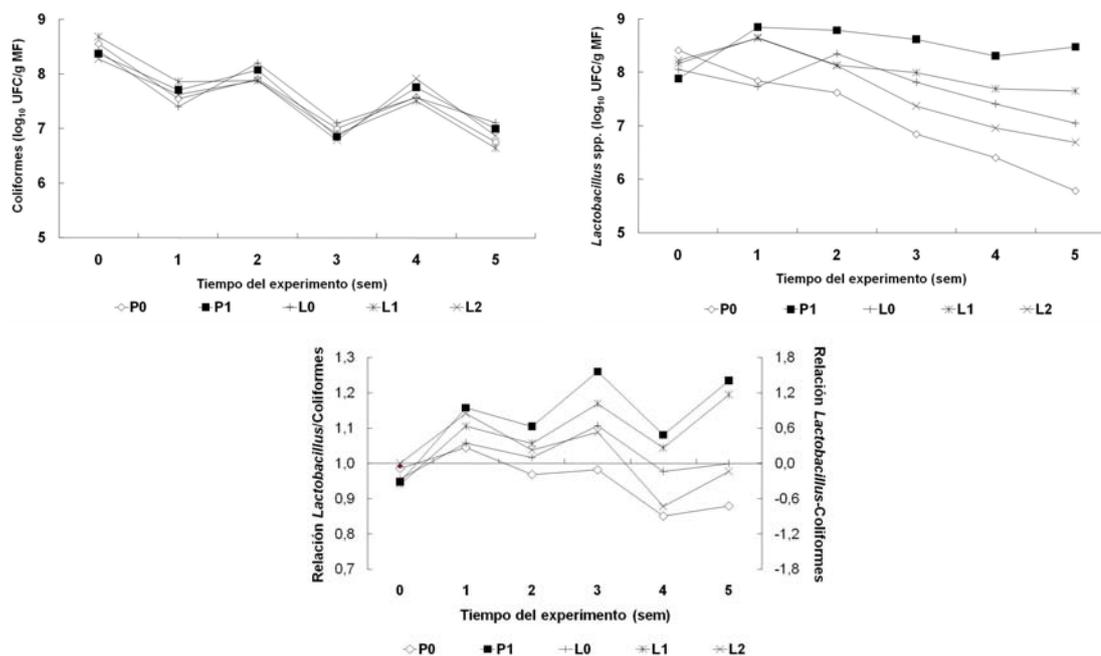
4.3.2. Efecto del tratamiento sobre la frecuencia de diarreas, el índice de consistencia fecal y la tasa de mortalidad

Teniendo en cuenta los valores semanales del ICF, se puede apreciar que el factor Lactosa mostró diferencias ($P < 0,05$) durante la semana 2, 3 y 4 (Tabla 15). La frecuencia de diarrea estuvo fuertemente aumentada en los animales que consumieron mayores cantidades de lactosa (L_2). No fue posible comprobar algún efecto del inóculo administrado sobre la frecuencia de diarrea o el índice de consistencia fecal. No se produjeron muertes en los individuos de ninguno de los grupos que formaron parte del ensayo.

4.3.3. Efecto del tratamiento sobre las poblaciones microbianas de coliformes y *Lactobacillus*

La figura 9 muestra los recuentos de las dos poblaciones microbianas estudiadas en la materia fecal de los terneros de los seis grupos experimentales y la relación *Lactobacillus*/coliformes y *Lactobacillus*-coliformes. Después de la primera semana de tratamiento se encontraron diferencias ($P < 0,05$) en el número de *Lactobacillus* spp. para el factor lactosa siendo mayores los recuentos en los animales tratados con el azúcar. Además, hubo diferencias ($P < 0,05$) en los recuentos de *Lactobacillus* spp. para el factor probiótico obteniendo mayor número en los animales inoculados. El tratamiento probiótico no redujo el recuento fecal de coliformes aunque generó diferencias ($P < 0,05$) en la relación *Lactobacillus*/coliformes desde la segunda semana y hasta el final del experimento. Esto fue debido a que se encontró un número sostenido de *Lactobacillus* spp. a lo largo de la experiencia, atribuible al inóculo, sumado a una disminución del número de coliformes a través del tiempo.

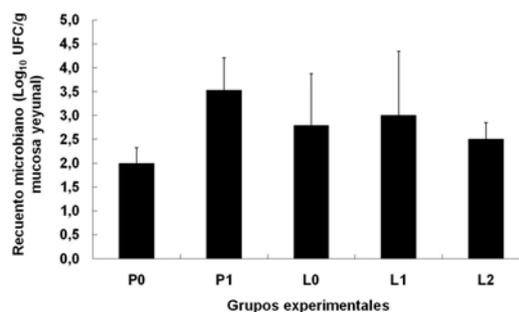
Figura 9: Recuentos en las poblaciones de coliformes y *Lactobacillus* y relación *Lactobacillus*/coliformes y *Lactobacillus*-coliformes en la materia fecal de los terneros suplementados con lactosa a tres niveles (L_0 , L_1 y L_2) y suplementados con probióticos a 2 niveles (P_0 y P_1). El suplemento probiótico fue administrado a dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV durante 35 d solamente en P_1 . La lactosa fue administrada a una dosis diaria de 100 g y 200 g en L_1 y L_2 respectivamente. Los valores fueron expresados como la media \pm DS.



4.3.4. Recuperación de la flora láctica del yeyuno

La recuperación de la flora láctica del yeyuno en aquellos animales sacrificados al final del ensayo se muestra en la figura 10. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) para el factor probiótico obteniendo valores mayores en el grupo inoculado ($3,5 \log\text{UFC/g}$) respecto al grupo control ($2 \log\text{UFC/g}$). No hubo efecto de la lactosa sobre los recuentos obtenidos en el yeyuno.

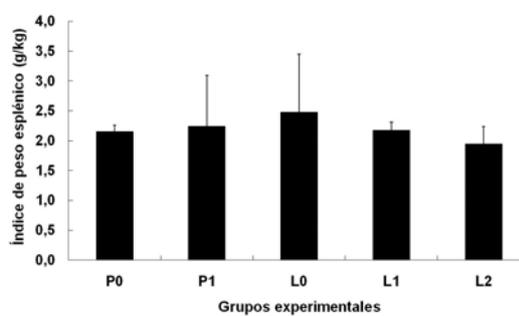
Figura 10: Recuperación de la flora láctica desde el yeyuno de los terneros suplementados con lactosa a tres niveles (L_0 , L_1 y L_2) y suplementados con probióticos a 2 niveles (P_0 y P_1). El suplemento probiótico fue administrado a dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV durante 35 d solamente en P_1 . La lactosa fue administrada a una dosis diaria de 100 g y 200 g en L_1 y L_2 respectivamente. Los valores fueron expresados como la media \pm DS. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$).



4.3.5. Índice de peso esplénico

Los valores del IPE de los terneros se encontraban entre 1,8 g/kg (DS = 0,4 g/kg) y 2,7 g/kg (DS = 1,6 g/kg) (Figura 11). No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) para los factores probiótico y lactosa.

Figura 11: Índice de peso esplénico de terneros suplementados con lactosa a tres niveles (L_0 , L_1 y L_2) y suplementados con probióticos a 2 niveles (P_0 y P_1). El suplemento probiótico fue administrado a dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV durante 35 d solamente en P_1 . La lactosa fue administrada a una dosis diaria de 100 g y 200 g en L_1 y L_2 respectivamente. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$). Los valores indicados representan el peso del bazo (g)/peso vivo (kg) (media \pm DS).

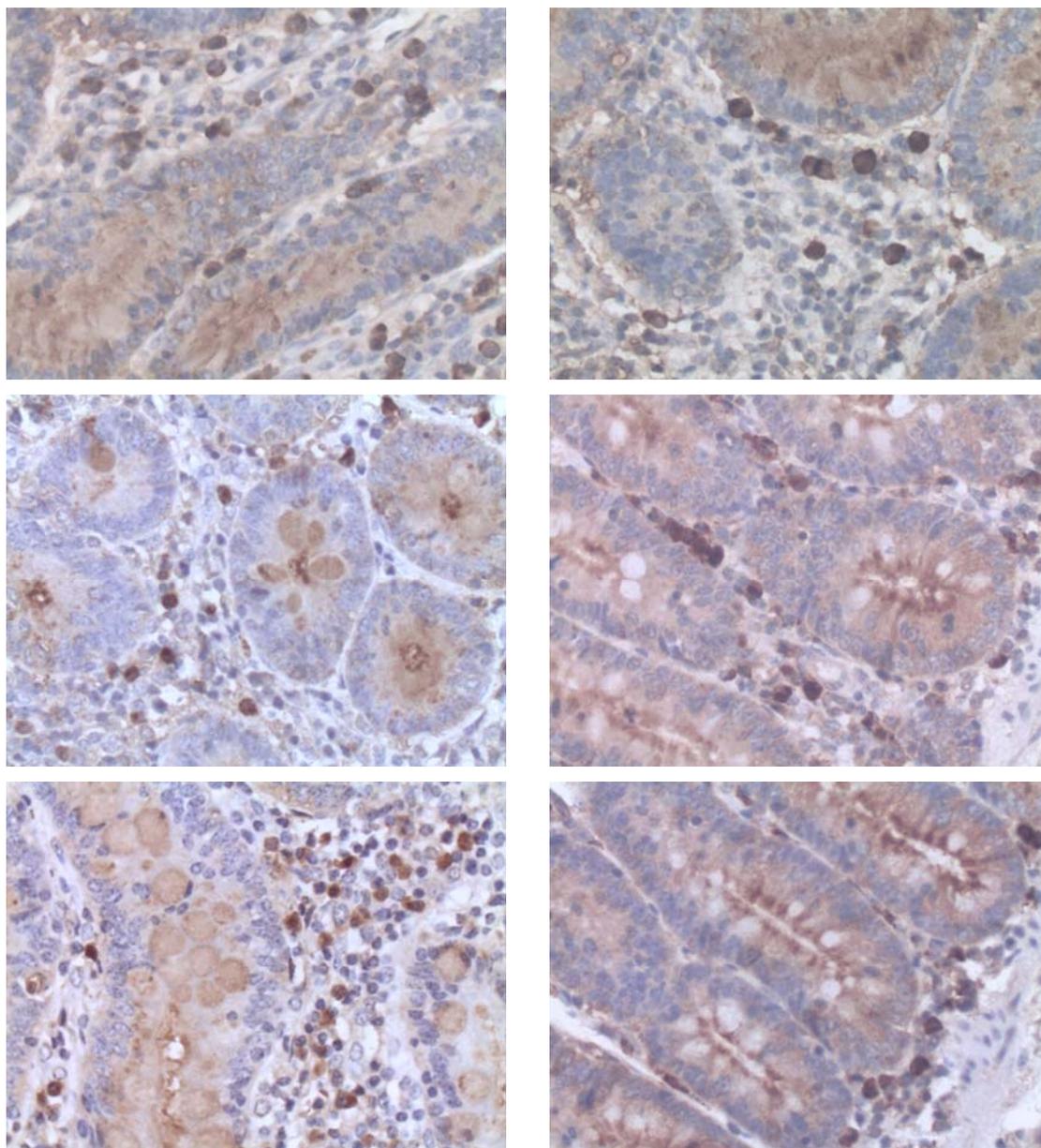


4.3.6. Estudio inmunohistoquímico

4.3.6.1. Marcación de IgA en yeyuno

Las células de la mucosa intestinal y la submucosa mostraron una intensa marcación citoplasmática. Se encontró reacción positiva específica en las células y en el moco. La inmunomarcación también se observó en la secreción de las glándulas de la mucosa (Figura 12). Los animales inoculados con el probiótico mostraron un aumento en el AIHQM en el yeyuno respecto de los animales controles ($P < 0,05$). No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) para el factor lactosa.

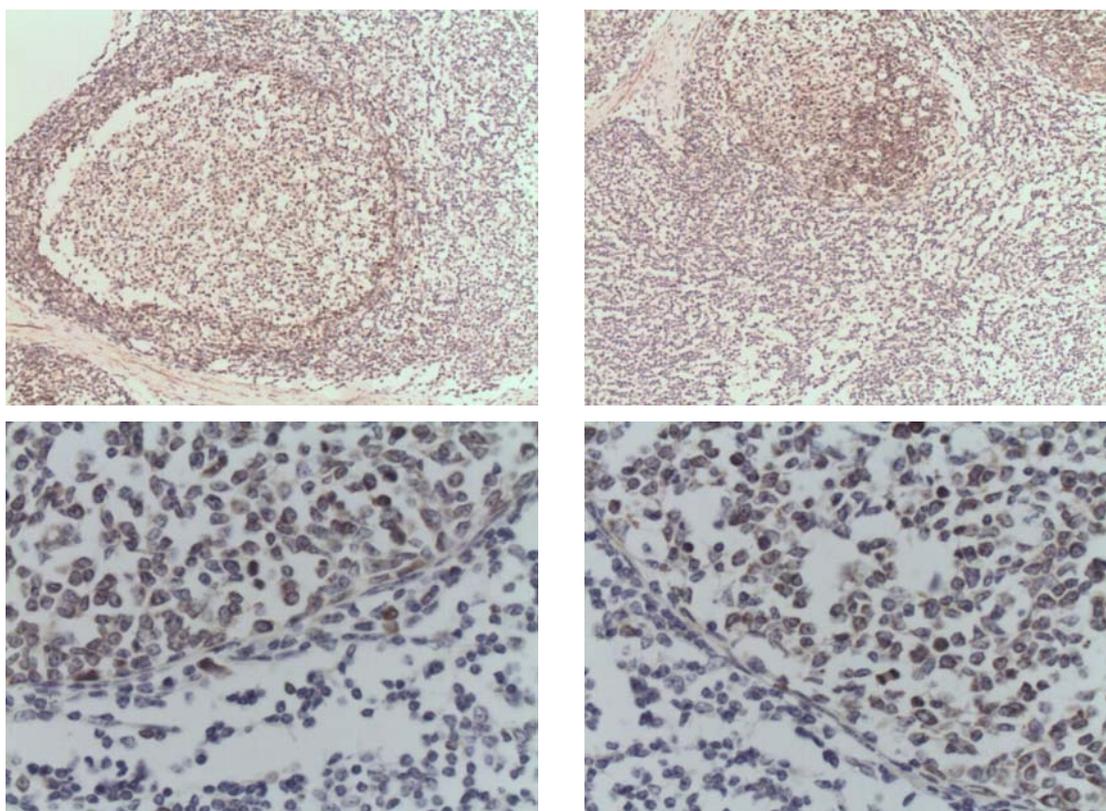
Figura 12: Inmunomarcación de IgA en el yeyuno de terneros suplementados con lactosa a tres niveles (L_0 , L_1 y L_2) y suplementados con probióticos a 2 niveles (P_0 y P_1). El suplemento probiótico fue administrado a dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV durante 35 d solamente en P_1 . La lactosa fue administrada a una dosis diaria de 100 g y 200 g en L_1 y L_2 respectivamente. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) para el factor probiótico.



4.3.6.2. Marcación de linfocitos B en nódulos linfáticos

Se encontró inmunomarcación citoplasmática intensa en las células de la corteza de los nódulos linfáticos mesentéricos e ileocecales en donde se encontraron folículos linfocitos intensamente marcados (Figura 13). Se observó reacción positiva específica en las células que componen el folículo linfocitoide y en algunas células de la médula de ambos nódulos linfáticos. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) para los factores probiótico y lactosa.

Figura 13: Inmunomarcación de linfocitos B en nódulos linfáticos de terneros suplementados con lactosa a tres niveles (L_0 , L_1 y L_2) y suplementados con probióticos a 2 niveles (P_0 y P_1). El suplemento probiótico fue administrado a dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV durante 35 d solamente en P_1 . La lactosa fue administrada a una dosis diaria de 100 g y 200 g en L_1 y L_2 respectivamente. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) para los factores probiótico y lactosa.

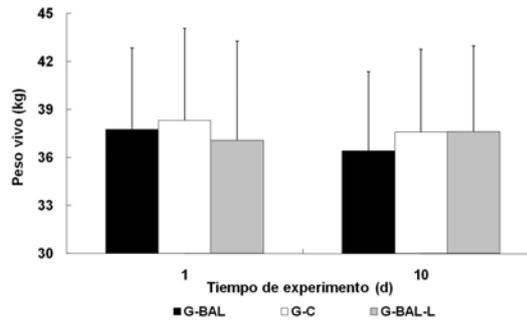


4.4. Incorporación de bacterias ácido lácticas y lactosa a la dieta de terneros jóvenes y su efecto sobre la colonización intestinal de *Salmonella dublin* DSPV 595T y la invasión a los órganos internos en terneros alimentados con sustituto lácteo.

4.4.1. Efecto del tratamiento sobre el peso de los animales antes de la infección con el patógeno

El peso vivo de los terneros previo a la inoculación con el patógeno se muestra en la figura 14. El G-BAL-L fue el único grupo experimental que aumentó de peso durante esta etapa mientras que los animales del G-BAL y el G-C disminuyeron levemente su peso. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre grupos experimentales.

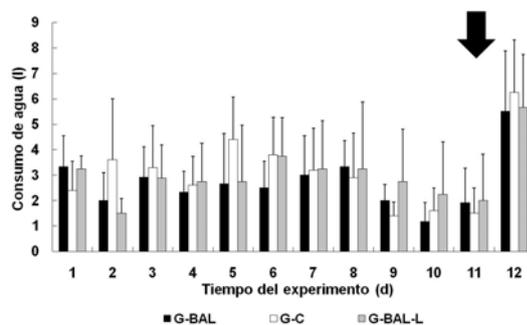
Figura 14: Peso vivo de los terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) previo a la infección con *Salmonella dublin* DSPV 595T. Los valores representan la media \pm DS. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$).



4.4.2. Efecto del tratamiento sobre el consumo de agua de los animales antes y durante la infección con el patógeno

Durante los 10 primeros días del ensayo los animales de todos los grupos experimentales consumieron alrededor de 2,5 l/d (figura 15). Los animales aumentaron significativamente ($P < 0,05$) el consumo de agua durante el día 12 (2^{do} día de infección) indistintamente del grupo experimental al que pertenecían, llevándolo a los 6 l/d.

Figura 15: Consumo de agua de los terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) previo y durante la infección con *Salmonella dublin* DSPV 595T. Los valores representan la media \pm DS. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre grupos. La flecha indica el día de la infección con el patógeno.

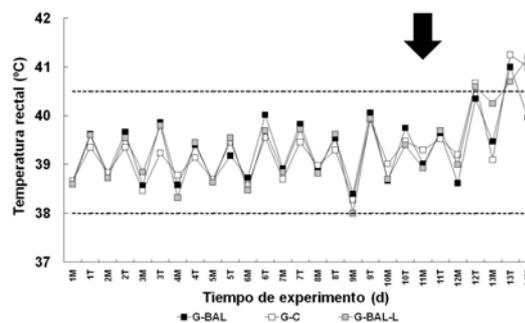


4.4.3. Efecto del tratamiento sobre la temperatura de los animales antes y durante la infección con el patógeno

4.4.3.1. Temperatura rectal

La figura 16 muestra los valores de temperatura rectal de los animales durante los 10 días antes y los días posteriores a la infección con *Salmonella dublin*. Pevio a la inoculación con el patógeno y durante los dos primeros días de infección la temperatura de los animales de todos los grupos experimentales se mantuvo dentro de los valores considerados de referencia. Después de 1,5 d de inoculado el patógeno los animales del G-C y G-BAL-L superaron el límite superior del valor de referencia aunque fue durante el tercer día de infección cuando todos los animales presentaron las mayores temperaturas, las cuales superaron el valor de 40,5 °C, nivel superior del valor de referencia a partir del cual se puede afirmar que los animales presentaban un síndrome febril.

Figura 16: Temperatura rectal de los terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) previo y durante la infección con *Salmonella dublin* DSPV 595T. Los valores representan la media \pm DS. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$). La flecha indica el día de la infección con el patógeno. Las líneas de punto encierran un rango de datos que representan los valores de referencia reportados previamente.

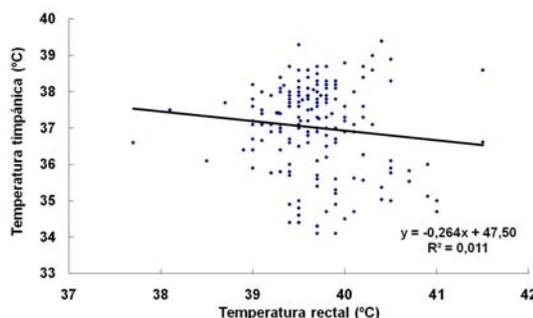


4.4.3.2. Correlación entre la temperatura rectal y timpánica

La figura 17 muestra la correlación entre la temperatura rectal y la timpánica de los animales del ensayo. Los valores de temperatura timpánica fueron siempre inferiores a los de temperatura rectal, obtenidos simultáneamente. La incidencia del ambiente durante el muestreo matutino tuvo como consecuencia que buena parte de los datos de temperatura timpánica fueran imposibles de obtener debido a que el equipo no lograba alcanzar el valor mínimo de lectura. Es por eso que para la correlación sólo fueron

utilizados los valores obtenidos por la tarde. No obstante ello, no se encontró relación entre los valores ($P = 0,7$).

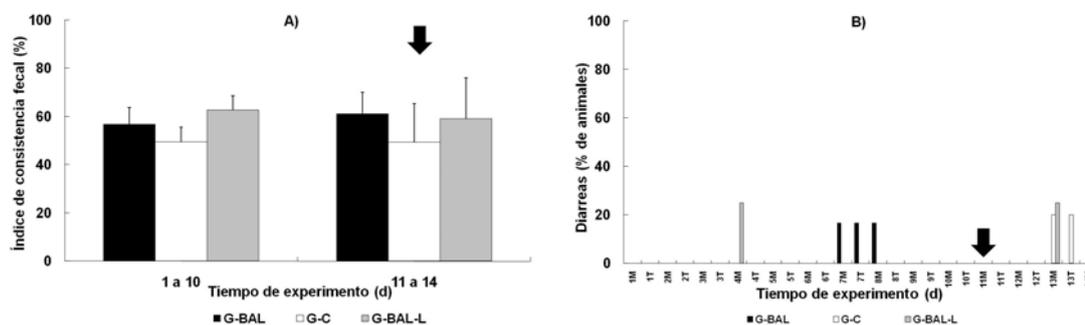
Figura 17: Correlación entre la temperatura rectal y timpánica de los terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) previo y durante la infección con *Salmonella dublin* DSPV 595T. Se muestra la línea de regresión lineal simple; el coeficiente de regresión fue de $-0,105$ y $P = 0,7$. No se encontró relación entre los valores.



4.4.4. Índice de consistencia fecal y frecuencia de diarreas en terneros antes y durante la infección con el patógeno

La figura 18 muestra los valores del índice de consistencia fecal y la frecuencia de diarreas en terneros antes y durante la infección con *Salmonella dublin* DSPV 595T. El ICF mostró valores entre el 50 % y el 70 % tanto antes como después de la infección y no hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los grupos. Las mayores frecuencias de diarreas fueron vistas a partir del segundo día de infección aunque no se registraron diarreas en los animales del G-BAL durante el período de infección (Figura 18B).

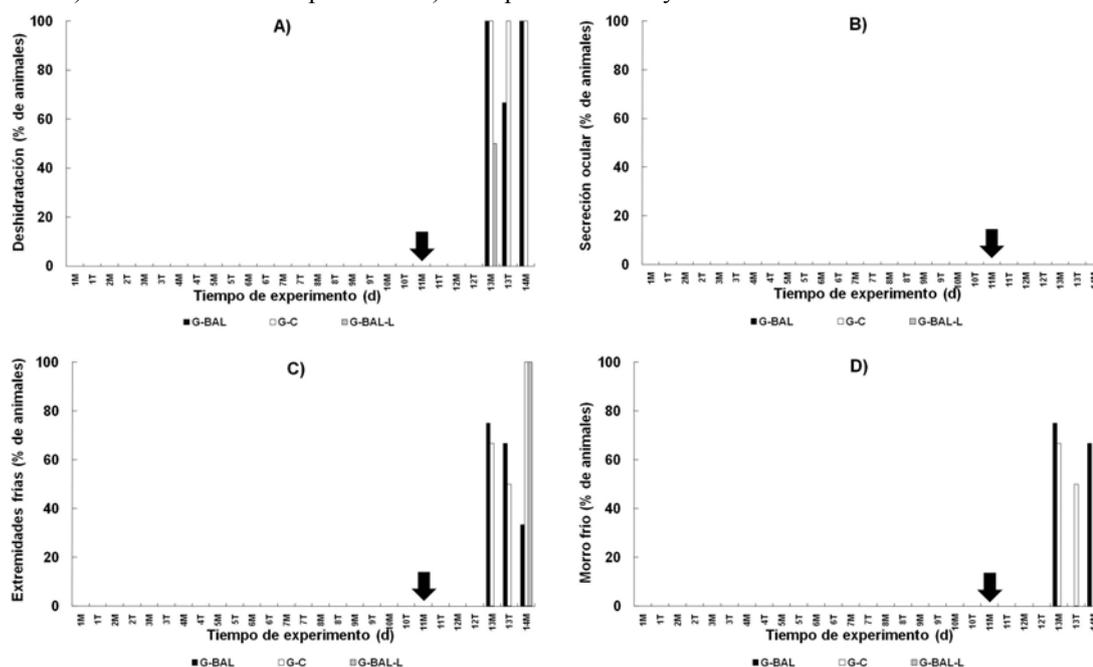
Figura 18: Índice de consistencia fecal y frecuencia de diarreas en terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T. Los valores fueron expresados como la media \pm DS. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$). La flecha indica el día de la infección con el patógeno. A) Índice de consistencia fecal. B) Frecuencia de diarreas.

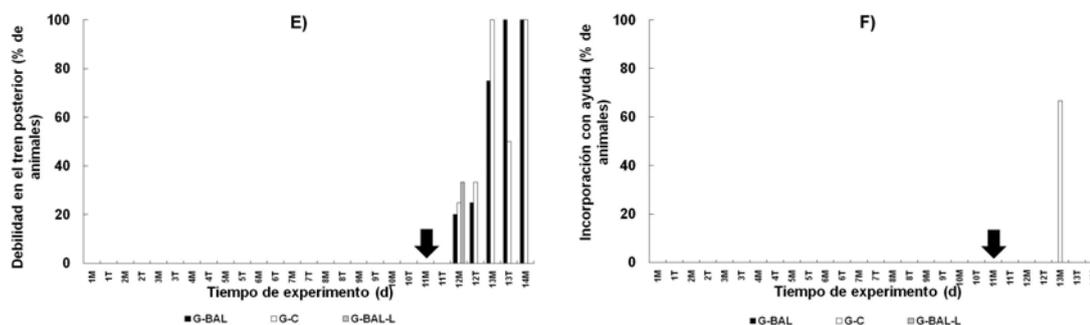


4.4.5. Indicadores clínicos del estado de salud en terneros antes y durante la infección con el patógeno

La figura 19 muestra los indicadores del estado de salud en terneros antes y durante la infección con *Salmonella dublin* DSPV 595T. Antes de la inoculación con el patógeno ninguno de los animales presentó alguno de los signos evaluados en este apartado. A partir del primer día de infección los animales presentaron debilidad en el tren posterior, la cual se prolongó hasta el final del ensayo (Figura 19E). Sin embargo, los animales mostraron deshidratación, extremidades frías y morro frío desde el segundo día de infección (Figura 19A, 19C y 19D). Sólo animales del G-C necesitaron ayuda para su incorporación (Figura 19F). Ninguno de los animales presentó secreción ocular durante la etapa de infección con el patógeno (Figura 19B). No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre grupos para ninguna de las variables estudiadas.

Figura 19: Indicadores clínicos del estado de salud en terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T. Los valores fueron expresados como la media \pm DS. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$). La flecha indica el día de la infección con el patógeno. A) Deshidratación. B) Secreción ocular. C) Extremidades frías. D) Morro frío. E) Debilidad en el tren posterior. F) Incorporación con ayuda.

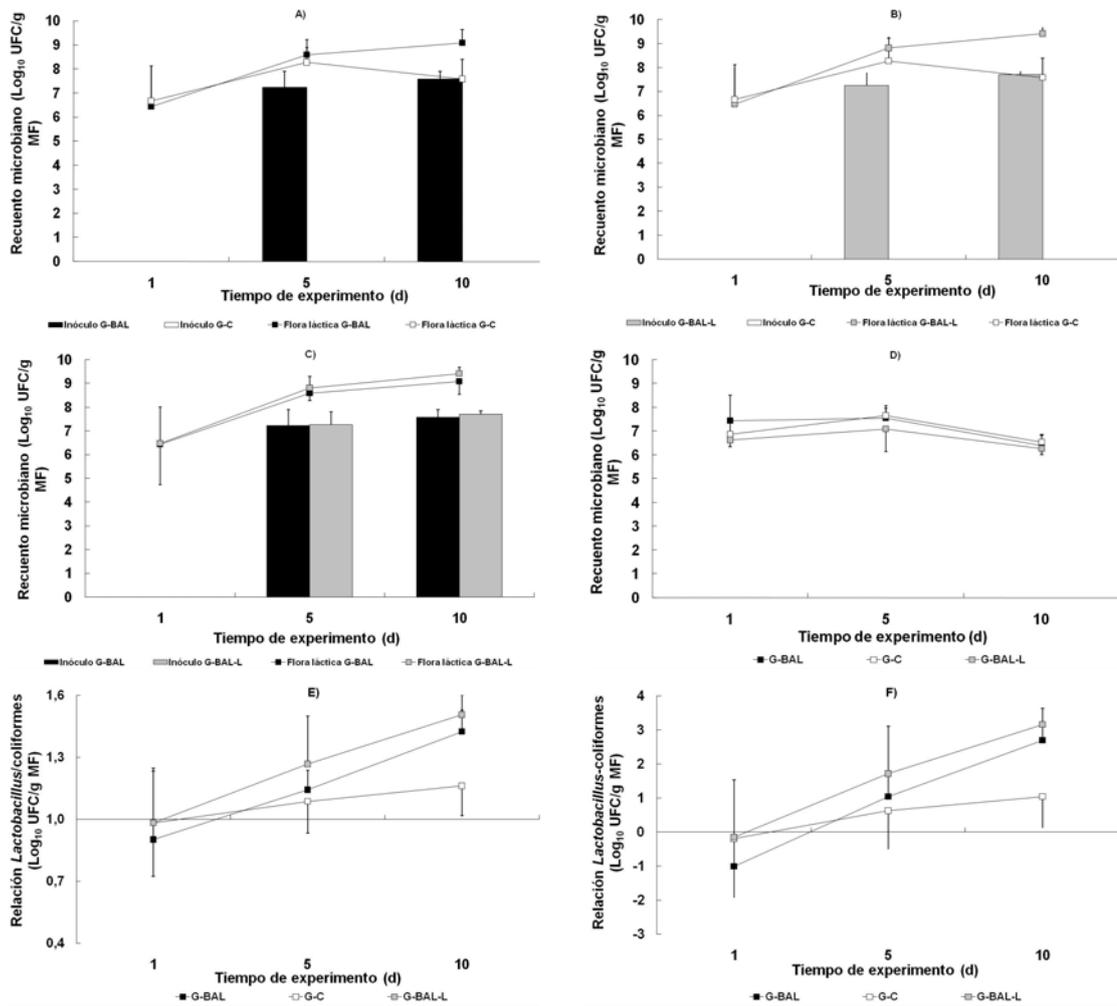




4.4.6. Efecto del tratamiento sobre las poblaciones microbianas fecales de coliformes y *Lactobacillus* en terneros jóvenes antes de la infección con *Salmonella dublin* DSPV 595T

La figura 20 muestra los recuentos en la materia fecal, de los terneros de los tres grupos experimentales, de las dos poblaciones microbianas estudiadas, del inóculo experimental y la relación *Lactobacillus*/coliformes y *Lactobacillus*-coliformes. Después del transcurso de 10 d de tratamiento probiótico se encontraron diferencias ($P < 0,05$) en el número de *Lactobacillus* spp. en los animales del G-BAL y G-BAL-L, siendo mayores los recuentos en estos dos grupos respecto al G-C (Figura 20A, B y C). El día 10 del ensayo, los valores de *Lactobacillus* spp. en materia fecal alcanzaron los 9 logUFC/g en ambos grupos inoculados con BAL superando en 1,5 logUFC/g a los niveles alcanzados por los microorganismos integrantes del inóculo. Los niveles de *Lactobacillus* en la materia fecal de los terneros del G-C fueron similares a los del inóculo experimental en ambos grupos inoculados. El tratamiento probiótico no redujo el recuento fecal de coliformes aunque generó diferencias ($P < 0,05$) en la relación *Lactobacillus*/coliformes durante el día 10 del experimento (Figura 20E). Esto fue debido a que se encontró un número sostenido de *Lactobacillus* spp. a lo largo de la experiencia, generado por el inóculo, sumado a una disminución del número de coliformes a través del tiempo (Figura 20D). El número de *Lactobacillus* spp. superó en alrededor de 3 logUFC/g al número de coliformes en el día 10 del ensayo (Figura 20F).

Figura 20: Recuentos en las poblaciones de coliformes y *Lactobacillus* y relación *Lactobacillus*/coliformes y *Lactobacillus*-coliformes en la materia fecal de terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T. Los valores representan el \log_{10} UFC/g de materia fecal y fueron expresados como la media \pm DS. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$). A) Flora láctica y carga del inóculo en G-C y G-BAL. B) Flora láctica y carga del inóculo en G-C y G-BAL-L. C) Flora láctica y carga del inóculo en G-BAL y G-BAL-L. D) Coliformes. E) Relación *Lactobacillus*/coliformes. F) Relación *Lactobacillus*-coliformes.



4.4.7. Detección de *Salmonella dublin* DSPV 595T en materia fecal

Salmonella dublin fue detectada en materia fecal de los terneros a partir de las 24 h post-infección y durante el resto del ensayo (Tabla 16). Sólo 1 animal, perteneciente al G-BAL, se mostró negativo al aislamiento del patógeno a las 96 h post-infección. De todas maneras, la presencia del patógeno en materia fecal no estuvo relacionada con la administración del inóculo probiótico.

Tabla 16: Detección de *Salmonella dublin* en materia fecal de terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T.

Tiempo post-infección (h)	G-BAL	G-C	G-BAL-L
0	0/6	0/5	0/4
24	5/5	4/4	3/3
48	4/4	3/3	2/2
72	3/3	2/2	1/1
96	1/2	1/1	0/0

Los datos presentados representan el número de cultivos positivos/el número de tejidos estudiados; Test de chi cuadrado: $P > 0,05$.

4.4.8. Detección de *Salmonella dublin* DSPV 595T en sangre

Todos los animales mostraron ausencia del patógeno en sangre durante las 2 primeras h de administrado el mismo. *Salmonella dublin* fue detectada en la sangre de 2 terneros del G-BAL-L a las 4 h post-infección (Tabla 17). A partir de las 12 h post-infección algún animal del G-BAL y del G-BAL-L presentaron al patógeno en sangre. La detección del patógeno en el G-C sólo fue posible a las 96 h de administrado el mismo. De todas maneras, la presencia del patógeno en sangre no estuvo relacionada con la administración del inóculo probiótico.

Tabla 17: Translocación de *Salmonella dublin* en sangre de terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T.

Tiempo post-infección (h)	G-BAL	G-C	G-BAL-L
0	0/6	0/5	0/4
1	0/6	0/5	0/4
2	0/6	0/5	0/4
4	0/6	0/5	2/4
8	0/6	0/5	0/4
12	1/6	0/5	1/4
24	2/5	0/4	1/3

48	2/4	0/3	2/2
72	1/3	0/2	1/1
96	2/2	1/1	0/0

Los datos presentados representan el número de cultivos positivos/el número de tejidos estudiados; Test de chi cuadrado: $P > 0,05$.

4.4.9. Efecto del tratamiento sobre las poblaciones microbianas de coliformes, *Lactobacillus*, *Salmonella* y del inóculo experimental en distintos sectores del tracto intestinal de terneros jóvenes infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T

La figura 21 y 22 muestran las poblaciones de coliformes, *Lactobacillus*, *Salmonella* e inóculo experimental y la relación *Lactobacillus*/coliformes y *Lactobacillus*-coliformes en distintos sectores del tracto intestinal de terneros infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T. Los coliformes se encontraron en niveles similares tanto en intestino delgado como en intestino grueso (aproximadamente 7 logUFC/g). Un alto grado de recuperación de la flora láctica fue observada en diferentes partes del intestino. *Lactobacillus* spp. alcanzaron cantidades superiores en intestino grueso que en intestino delgado aunque las diferencias no fueron significativas. El inóculo probiótico se encontró en niveles de 5 logUFC/g en intestino grueso en ambos grupos inoculados con el probiótico y en intestino delgado ese valor sólo fue alcanzado por el grupo G-BAL-L mientras que el grupo G-BAL mostró recuentos inferiores en intestino delgado (alrededor de 1 logUFC/g menos). *Salmonella* estuvo presente tanto en intestino delgado como en intestino grueso alcanzando niveles entre 2 logUFC/g y 4 logUFC/g (Figura 21). Aunque los animales del G-BAL-L mostraron valores inferiores de *Salmonella* a los del G-C las diferencias entre grupos no fueron significativas. Durante la infección con *Salmonella* solamente el G-BAL-L mantuvo niveles de *Lactobacillus* superiores a los coliformes en todos los sectores estudiados del tracto digestivo (Figura 22).

Figura 21: Recuentos en las poblaciones de coliformes, *Lactobacillus*, *Salmonella* e inóculo experimental en distintos sectores del tracto intestinal de terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T. Los valores representan el \log_{10} UFC/g de materia fecal y fueron expresados como la media \pm DS. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$). A) Yeyuno. B) Íleon. C) Ciego. D) Colon.

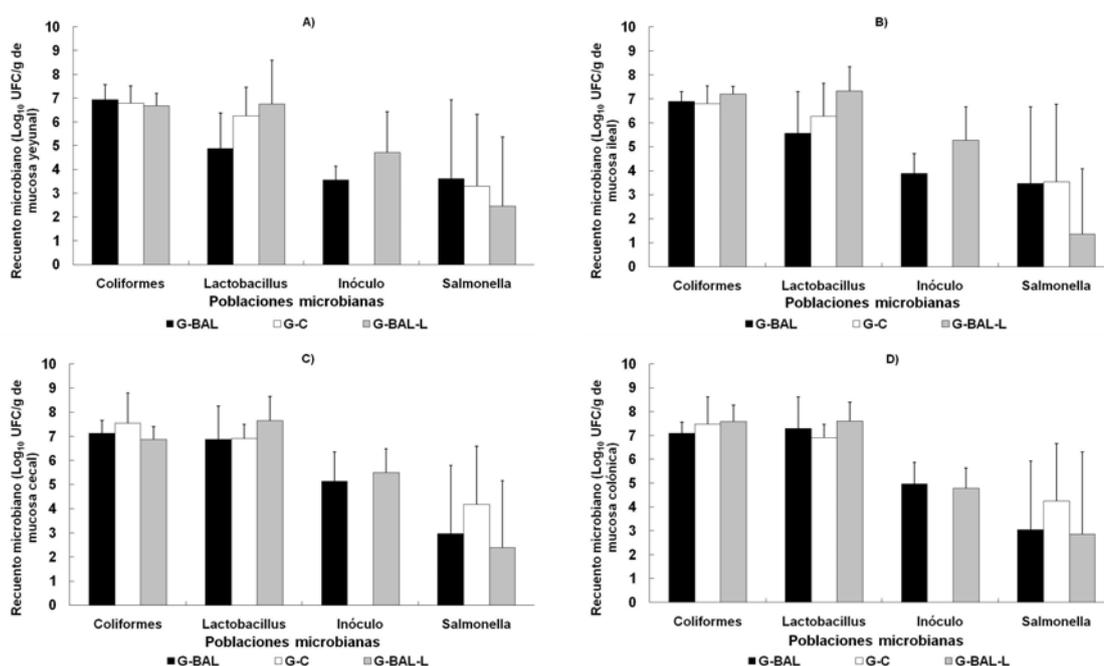
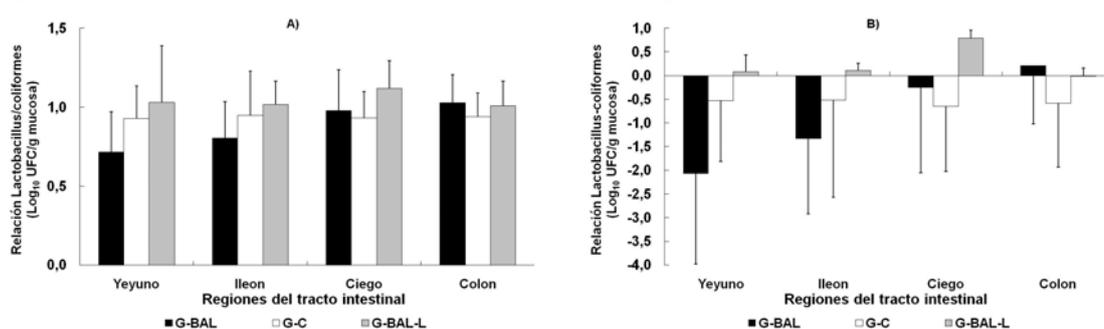


Figura 22: Relación *Lactobacillus*/coliformes (A) y *Lactobacillus*-coliformes (B) en distintos sectores del tracto intestinal de terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T. Los valores representan el \log_{10} UFC/g de materia fecal y fueron expresados como la media \pm DS. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$).



4.4.10. Translocación de poblaciones microbianas en terneros jóvenes infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T

Altas cargas microbianas fueron encontradas en los órganos del medio interno (Figura 23). Los mayores recuentos correspondieron a las poblaciones de aerobios y se obtuvieron en los nódulos linfáticos (5 logUFC/g a 6 logUFC/g). Los coliformes representaron una alta proporción de ese total mostrando niveles de 1 logUFC/g inferiores a los aerobios. *Enterococcus* spp. alcanzó niveles de aproximadamente 1

logUFC/g en hígado y bazo y de alrededor de 2 logUFC/g en los nódulos linfáticos mesentérico e ileocecal. *Lactobacillus* spp. fueron encontrados solamente en los nódulos linfáticos de los grupos inoculados con el probiótico en cantidades muy bajas (< 1 logUFC/g). Ninguno de los microorganismos integrantes del inóculo probiótico fue encontrado en alguno de los órganos del medio interno estudiados (Figura 23). *Salmonella* estuvo presente en todos los órganos del medio interno alcanzando niveles entre 3 logUFC/g y 4 logUFC/g (Figura 23). Aunque los animales del G-BAL-L mostraron valores inferiores de *Salmonella* a los del G-C las diferencias entre grupos no fueron significativas ($P > 0,05$). Aunque el patógeno fue detectado en el hígado de muchos de los animales infectados, en la bilis se aisló con poca frecuencia. También el nódulo linfático poplíteo, el líquido cefalorraquídeo y el líquido sinovial fueron ubicaciones donde rara vez fue detectado el patógeno (Tabla 18). Sin embargo, el pulmón y el nódulo linfático mediastínico fueron lugares de frecuente ubicación de *Salmonella*. De todas maneras, la presencia de los microorganismos en los órganos del medio interno no estuvo relacionada con la administración del inóculo probiótico.

Figura 23: Translocación bacteriana en terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T. Los valores representan el log UFC/g de tejido y fueron expresados como la media \pm DS. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre grupos. A) Hígado. B) Bazo. C) Nódulo linfático mesentérico. D) Nódulo linfático ileocecal.

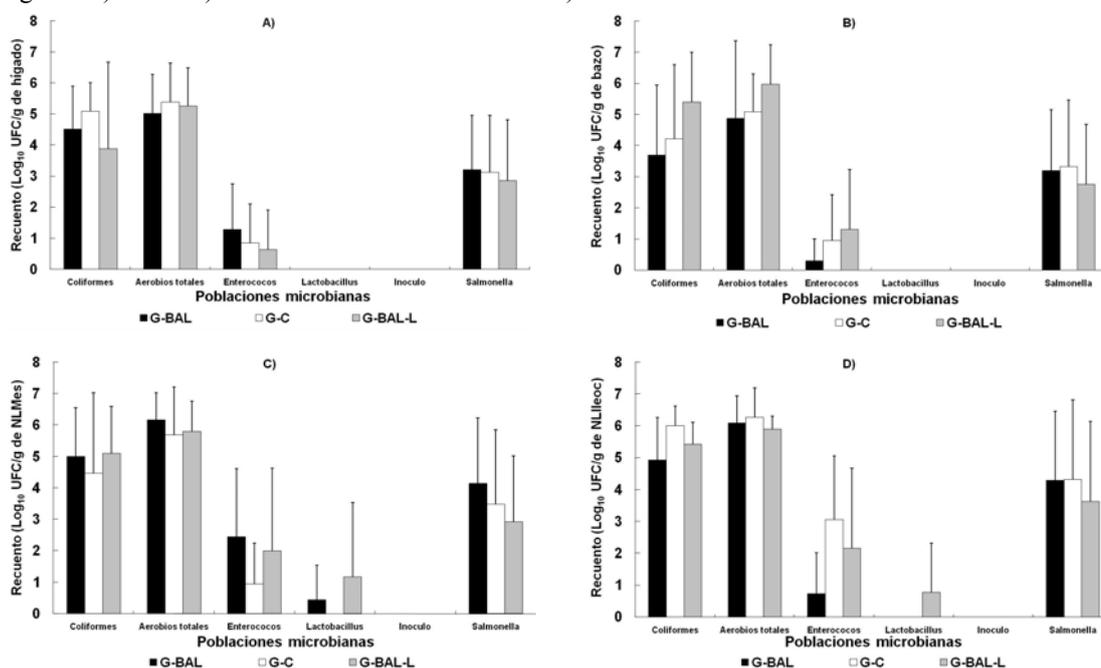


Tabla 18: Translocación de *Salmonella dublin* en órganos y fluidos corporales de terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T.

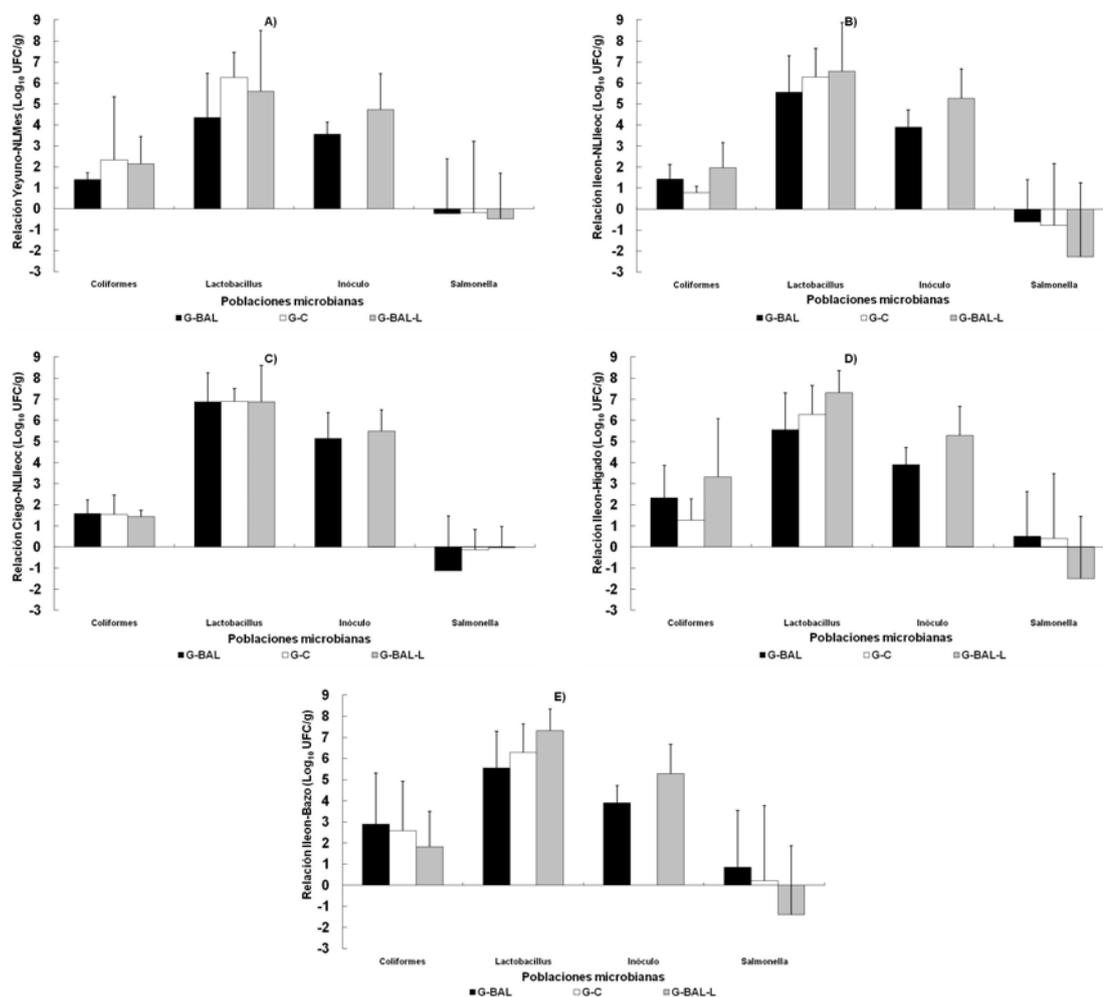
Órgano o fluido corporal	G-BAL	G-C	G-BAL-L
Hígado	5/6	4/5	4/4
Bazo	5/6	5/5	3/4
NL Mesentérico	5/6	5/5	4/4
NL Ileocecal	5/6	5/5	3/4
NL Mediastínico	3/6	4/5	3/4
NL Poplíteo	3/6	1/5	1/4
Pulmón	3/6	4/5	3/4
LCR	1/6	0/5	1/4
Bilis	3/6	0/5	1/4
Líquido sinovial	1/6	0/5	0/4

Los datos presentados representan el número de cultivos positivos/el número de órganos o fluidos estudiados; Test de chi cuadrado: $P > 0,05$.

4.4.11. Relación entre las poblaciones microbianas presentes en los distintos sectores intestinales y en el medio interno

La relación entre las poblaciones microbianas de diferentes sectores del tracto intestinal y el medio interno se muestra en la figura 24. Los *Lactobacillus* mostraron valores superiores a los coliformes producto de su alto recuento intestinal sumado a su escasa capacidad para translocar al medio interno. Los coliformes se encontraron en niveles bajos debido a que la alta cantidad intestinal fue balanceada por altos recuentos en los órganos internos. La relación para los microorganismos pertenecientes al inóculo fue igual a los niveles intestinales alcanzados por el mismo debido a que no fueron detectados en el medio interno. *Salmonella* mostro un patrón diferente a las demás poblaciones. Salvo raras excepciones, los niveles del patógeno fueron más elevados en los órganos del medio interno que en las porciones intestinales.

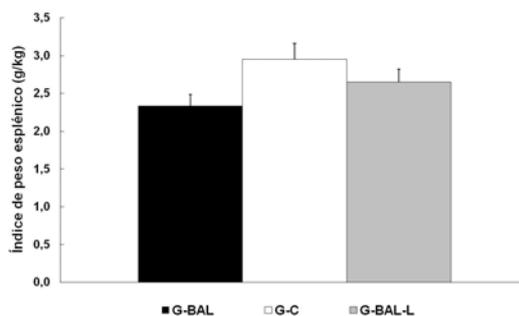
Figura 24: Relación entre las poblaciones microbianas presentes en los distintos sectores intestinales y en el medio interno de terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T. Los valores fueron expresados como la media \pm DS. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre grupos. A) Relación Yeyuno-Nódulo linfático mesentérico. B) Relación Ileon-Nódulo linfático ileocecal. C) Relación Ciego-Nódulo linfático ileocecal. D) Relación Ileon-Hígado. E) Relación Ileon-Bazo.



4.4.12. Índice de peso esplénico en terneros jóvenes infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T

La figura 25 muestra los valores del índice de peso esplénico en terneros infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T. Los animales evidenciaron valores de IPE entre 2 g/kg y 3 g/kg (Figura 25). Aunque los terneros del G-C mostraron valores superiores a los animales de los grupos inoculados con el probiótico, las diferencias entre grupos no fueron significativas ($P > 0,05$).

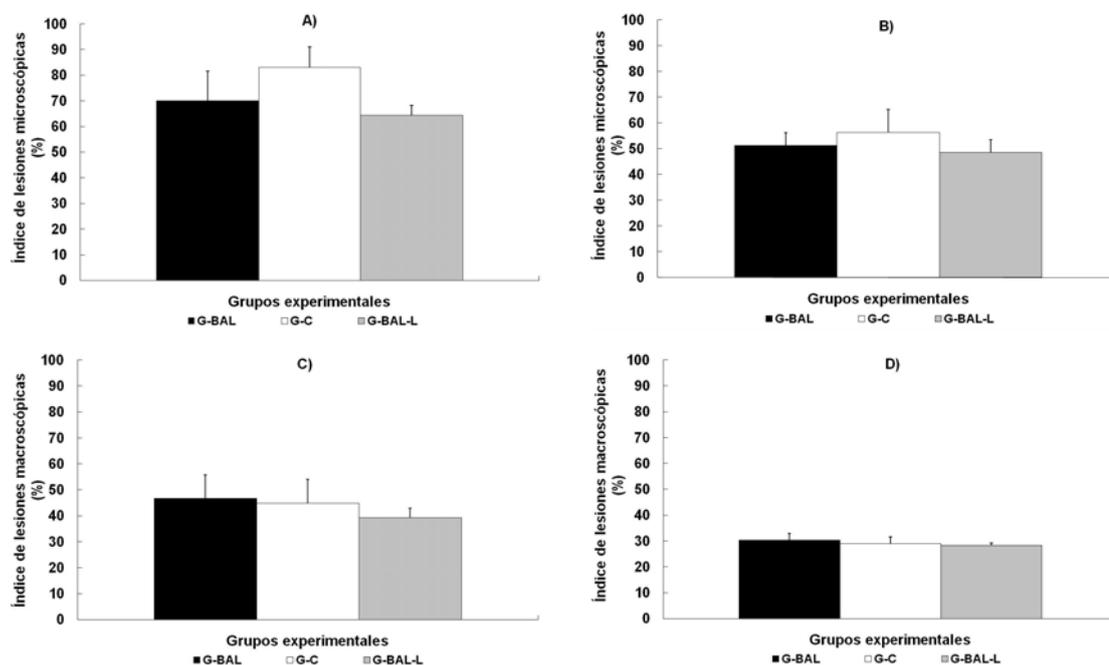
Figura 25: Índice de peso esplénico en terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$). Los valores indicados representan el peso del bazo (g)/peso vivo (kg) (media \pm DS).



4.4.13. Índice de lesiones microscópicas y macroscópicas en terneros jóvenes infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T

El IL de los órganos diana fue mayor que el IL utilizado para todos los órganos. A su vez, el ILMicro fue mayor que el ILMacro tanto para los órganos diana como para todos los órganos estudiados (Figura 26). El ILMicro en órganos diana fue de 83 %, 70 % y 64,3 % para el G-C, G-BAL y G-BAL-L respectivamente. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el G-BAL-L y el G-C (Figura 26A). No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) para el resto de los parámetros estudiados (Figura 26B, C y D). En las figuras 27, 28 y 29 (columna A) se muestran algunos órganos diana después de transcurridas 8 h de infección. En ese momento no se encontraron lesiones características de *Salmonella*. En las figuras 27, 28 y 29 (columna B) se muestran las lesiones características en algunos órganos diana después de transcurridas 80 h de infección. En general se encontraron las lesiones propias del patógeno. Sin embargo, fue notoria la ausencia de NPT en algunos órganos como el hígado y el bazo. A su vez, los escasos NPT encontrados estaban en proceso de formación y, en general, con poca necrosis de coagulación. Las lesiones microscópicas encontradas en el G-BAL-L después de 80 h de la inoculación del patógeno fueron similares a aquellas encontradas en el G-C a las 32 h y 56 h post-infección. Por ello el ILMicro se mantuvo en niveles inferiores.

Figura 26: Índice de lesiones microscópicas (ILMicro) y macroscópicas (ILMacro) en terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T. Los valores fueron expresados como la media \pm DS. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre grupos para el ILMicro en órganos diana. A) ILMicro en órganos diana. B) ILMicro en todos los órganos estudiados. C) ILMacro en órganos diana. D) ILMacro en todos los órganos estudiados.



En el hígado sólo se encontró una degeneración parenquimatosa con muy pocas manifestaciones infiltrativas inflamatorias con proliferación de los canalículos biliares a lo largo de la placa limitante de los lobulillos, reacción inespecífica que se encuentra en muchos procesos patológicos. El bazo, sólo en algunos casos, presentó una esplenitis hemorrágica, tal como se observa en cualquier proceso septicémico. No se encontraron NPT en estos órganos. La vesícula biliar no mostró lesiones de importancia en ninguno de los grupos estudiados.

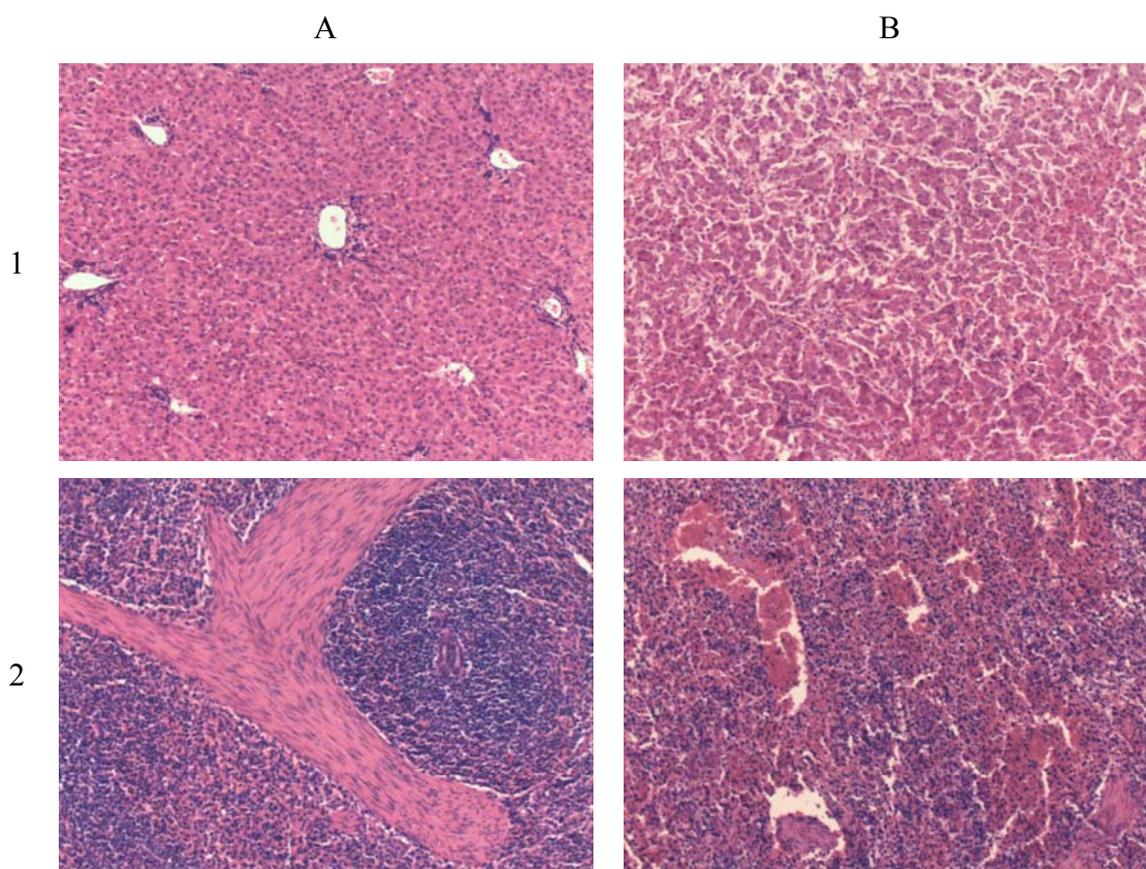
En el yeyuno de los animales del G-C aparecen lesiones de necrosis de la mucosa en las necropsias 2 y 4 y claras lesiones de necrosis con NPT en la necropsia 5. En los otros dos grupos las lesiones de necrosis (sin NPT) sólo aparecen a partir de la 3^{er} necropsia en el G-BAL y G-BAL-L. Las lesiones encontradas fueron leves y no patognomónicas.

En el íleon se encontró necrosis en las necropsias 3 y 5 en los animales del G-C. Llamativamente en la necropsia 4 las lesiones fueron leves. En el G-BAL y G-BAL-L durante toda la serie las lesiones fueron de poca importancia.

Los terneros del G-C presentaron lesiones necróticas tempranas en la VIC (necropsias 2 y 3) y la presencia de NPT en las dos últimas necropsias (4 y 5). En el G-BAL sólo aparece necrosis en las tres últimas necropsias y sin la presencia de NPT. En el G-BAL-L la lesión completa sólo aparece en un ternero de la necropsia 3, pero en

todas los demás las lesiones son de poca importancia. En el nódulo linfático mediastínico, se encontraron lesiones que denuncian sepsis sólo en el G-C, no así en los otros dos grupos dónde las lesiones son de tipo reaccional leve. El pulmón de los terneros de la experiencia tuvo una participación muy modesta mostrando lesiones que llegan sólo a la categoría de alveolitis.

Figura 27: Lesiones microscópicas en el hígado y el bazo de terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T. A1) Hígado SLA 8 h post-infección (Hígado; H-E x100). B1) Degeneración parenquimatosa con muy pocas manifestaciones infiltrativas inflamatorias sin NPT 80 h post-infección (Hígado; H-E x100). A2) Bazo SLA 8 h post-infección (Bazo; H-E x100). B2) Esplenitis aguda hemorrágica sin NPT 80 h post-infección (Bazo; H-E x100).



El colon de los terneros del G-C sólo mostró lesiones patognomónicas (NPT) en la necropsia 3. En todos los terneros tratados con el inóculo de BAL las lesiones fueron de tipo leve. Las lesiones en los nódulos linfáticos mesentéricos muestran que en el G-C la

presencia de NPT es constante a partir de la necropsia 2 con localización en la zona cortical del nódulo linfático y no en el seno subcapsular, como habitualmente suele aparecer. En el G-BAL, la aparición de este tipo de lesión fue más tardía, a partir de la necropsia 4. En el G-BAL-L el mismo tipo de lesión apareció sólo, y de modo aislado, en el ternero de la necropsia 3. En el nódulo linfático ileocecal se encontraron lesiones completas en el G-C a partir de la necropsia 3. Tanto en el G-BAL como en el G-BAL-L las lesiones aparecieron a partir de la necropsia 4.

Figura 28: Lesiones microscópicas en el íleon de terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T. A1) Panorámica del Íleon SLA 8 h post-infección (Íleon; H-E x40). B1) Panorámica del Íleon con enteritis necrotizante sin NPT 80 h post-infección (Íleon; H-E x40). A2) Mucosa ileal SLA 8 h post-infección (Íleon; H-E x100). B2) Mucosa ileal con necrosis coagulativa de todo el cuerpo glandular con infiltrados mononucleares y sin NPT 80 h post-infección (Íleon; H-E x100).

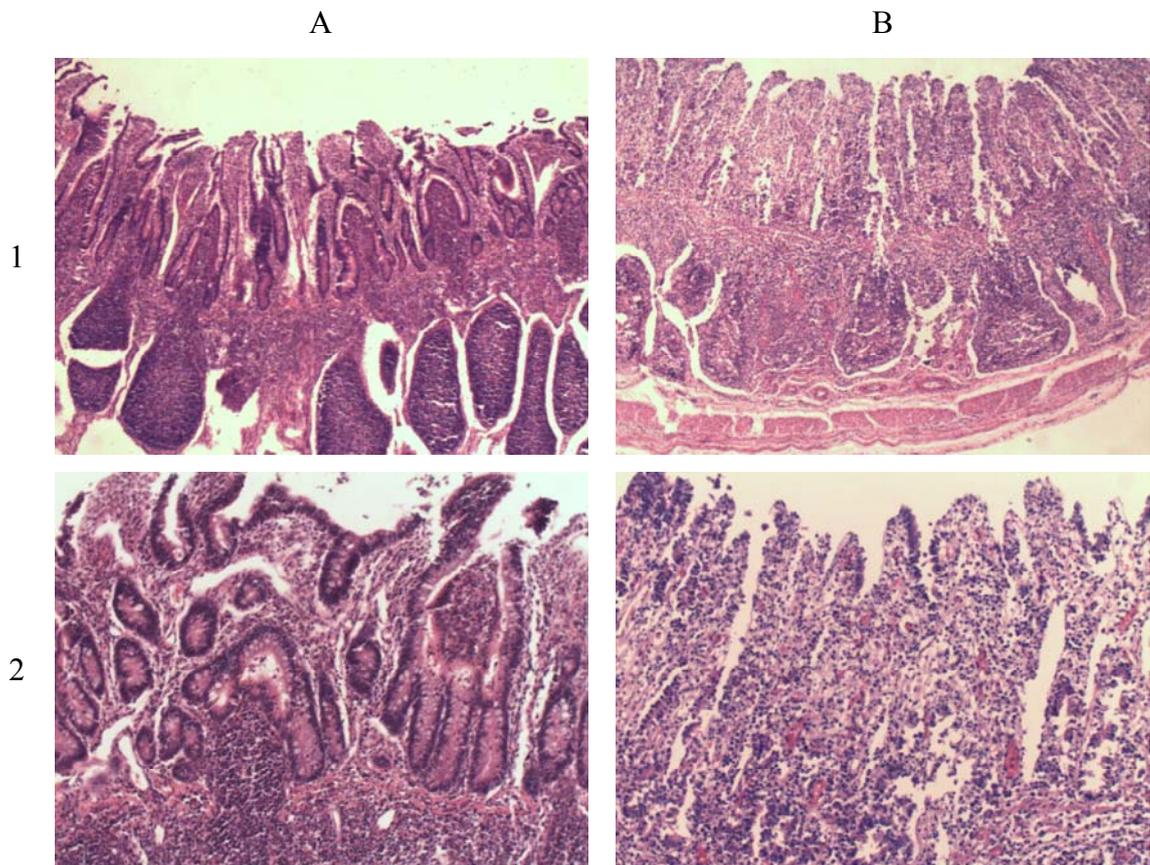
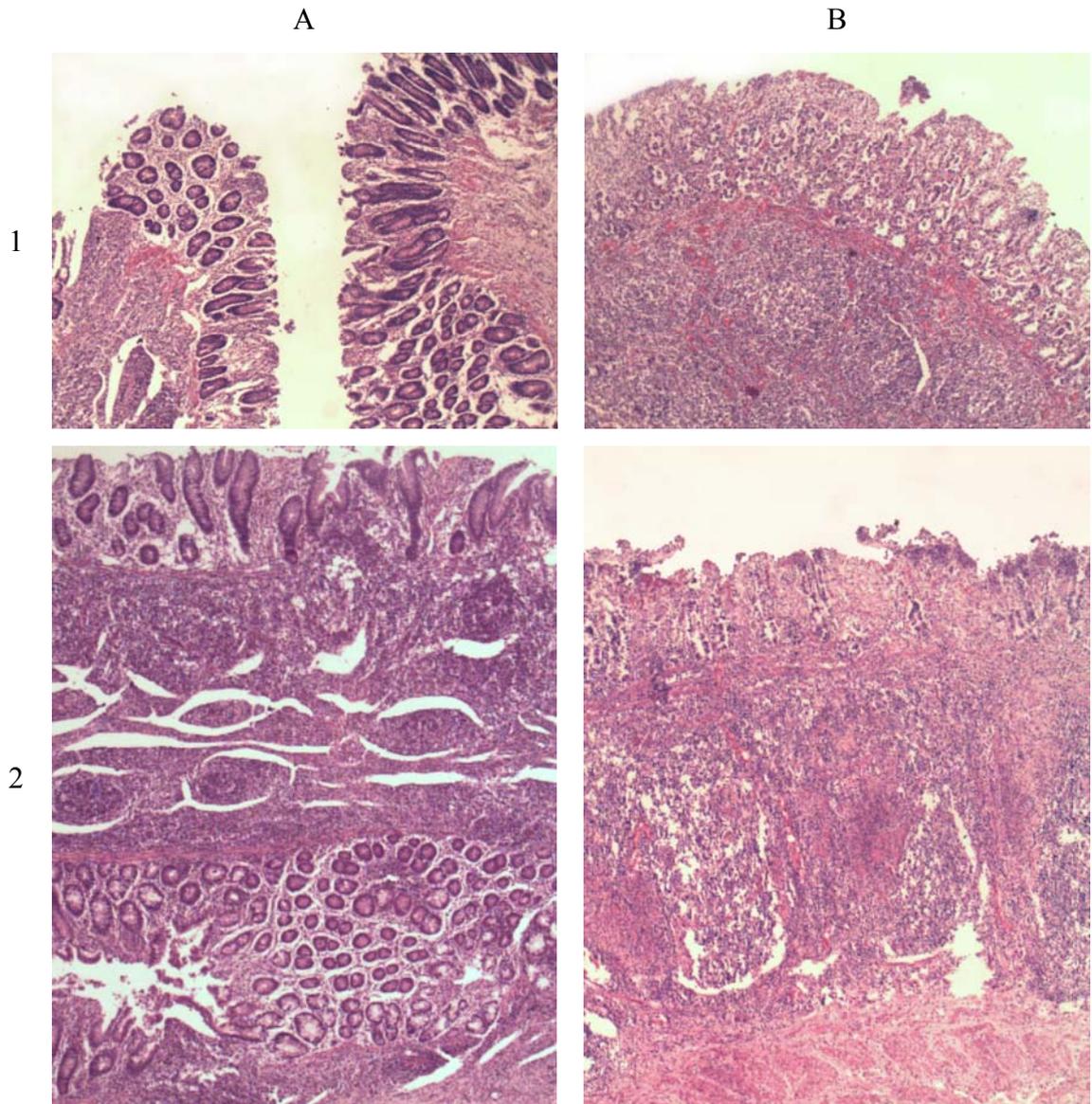
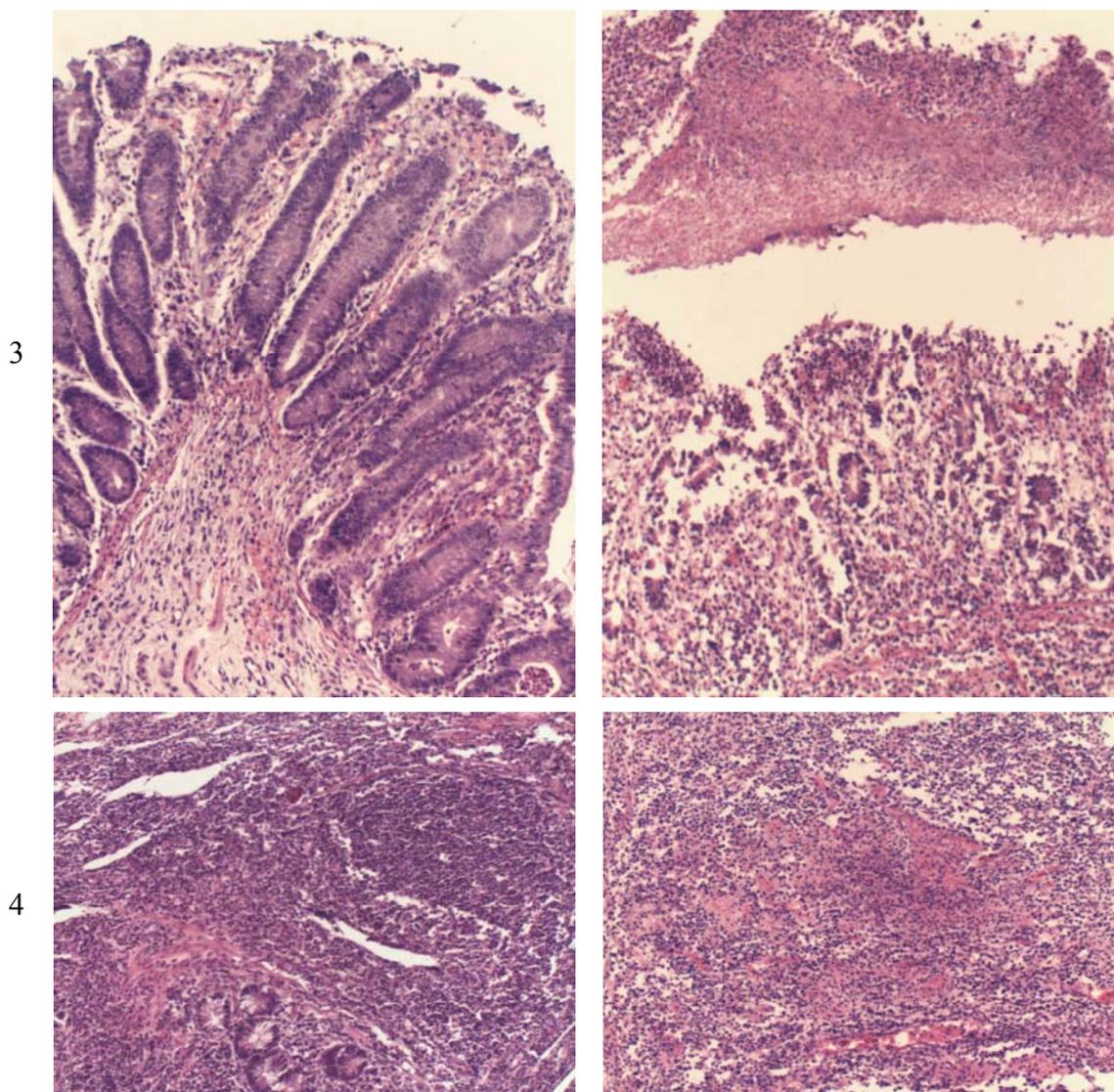


Figura 29: Lesiones microscópicas en la válvula ileocecal de terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T. A1) Panorámica de la VIC SLA 8 h post-infección (VIC; H-E x40). B1) Panorámica de la VIC con enteritis necrotizante sin NPT 80 h post-infección (VIC; H-E x40). A2) Panorámica de la VIC SLA 8 h post-infección (VIC; H-E x40). B2) Panorámica de la VIC con enteritis necrotizante y NPT en formación 80 h post-infección (VIC; H-E x40). A3) Mucosa de la VIC SLA 8 h post-infección (VIC; H-E x100). B3) Enteritis fibrinonecrótica en la mucosa de la VIC con ausencia de vellosidades y capa de fibrina con restos celulares 80 h post-infección (VIC; H-E x100). A4) Tejido linfoideo en la submucosa de la VIC SLA 8 h post-infección (VIC; H-E x100). B4) Formación inicial de un NPT en la submucosa de la VIC con reclutamiento de PMN y macrófagos con necrosis de coagulación 80 h post-infección (VIC; H-E x100).



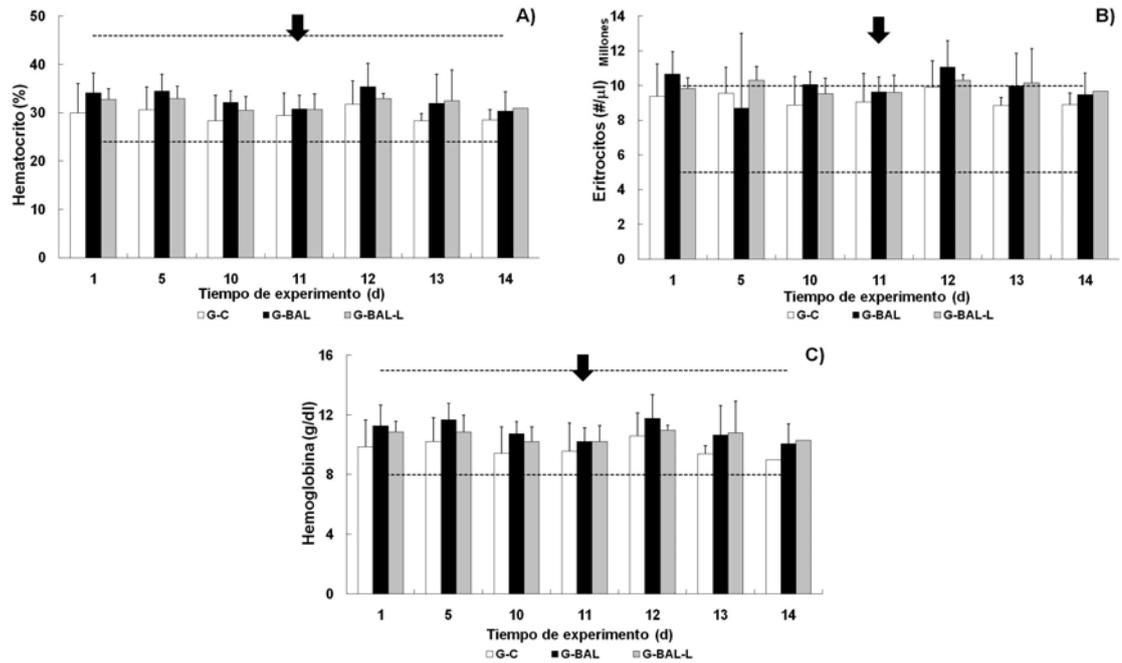


4.4.14. Parámetros sanguíneos en terneros jóvenes infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T

4.4.14.1. Serie eritrocítica

El hematocrito, el número de los eritrocitos y la concentración de hemoglobina de los terneros estuvieron dentro de los valores normales (Figura 30A, B y C). Los animales mostraron valores de hematocrito entre 30 % y 35 %, el número de eritrocitos entre 9 millones por microlitro y 11 millones por microlitro y la concentración de hemoglobina entre 9 g/dl y 12 g/dl. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre grupos para ninguna de las variables estudiadas. La infección con el patógeno no modificó ninguno de los parámetros sanguíneos de la serie eritrocítica.

Figura 30: Parámetros sanguíneos (serie eritrocítica) en terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T. Los valores fueron expresados como la media \pm DS. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$). Las líneas de punto encierran un rango de datos que representan los valores de referencia reportados previamente. La flecha indica el día de la infección con el patógeno. A) Hematocrito. B) Eritrocitos. C) Hemoglobina.

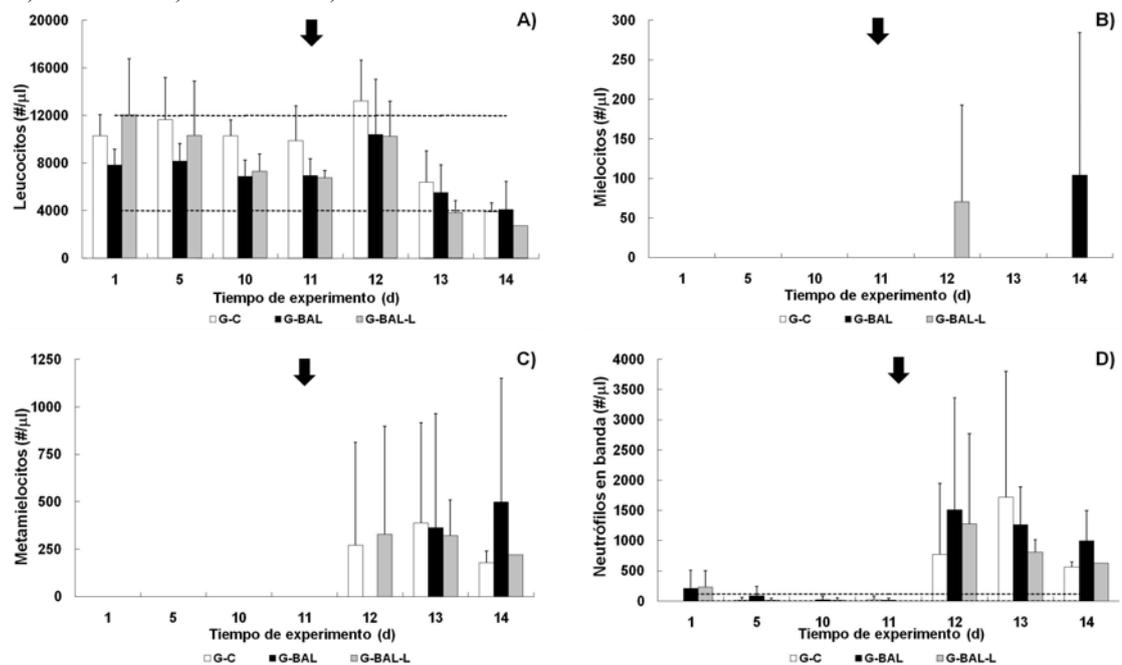


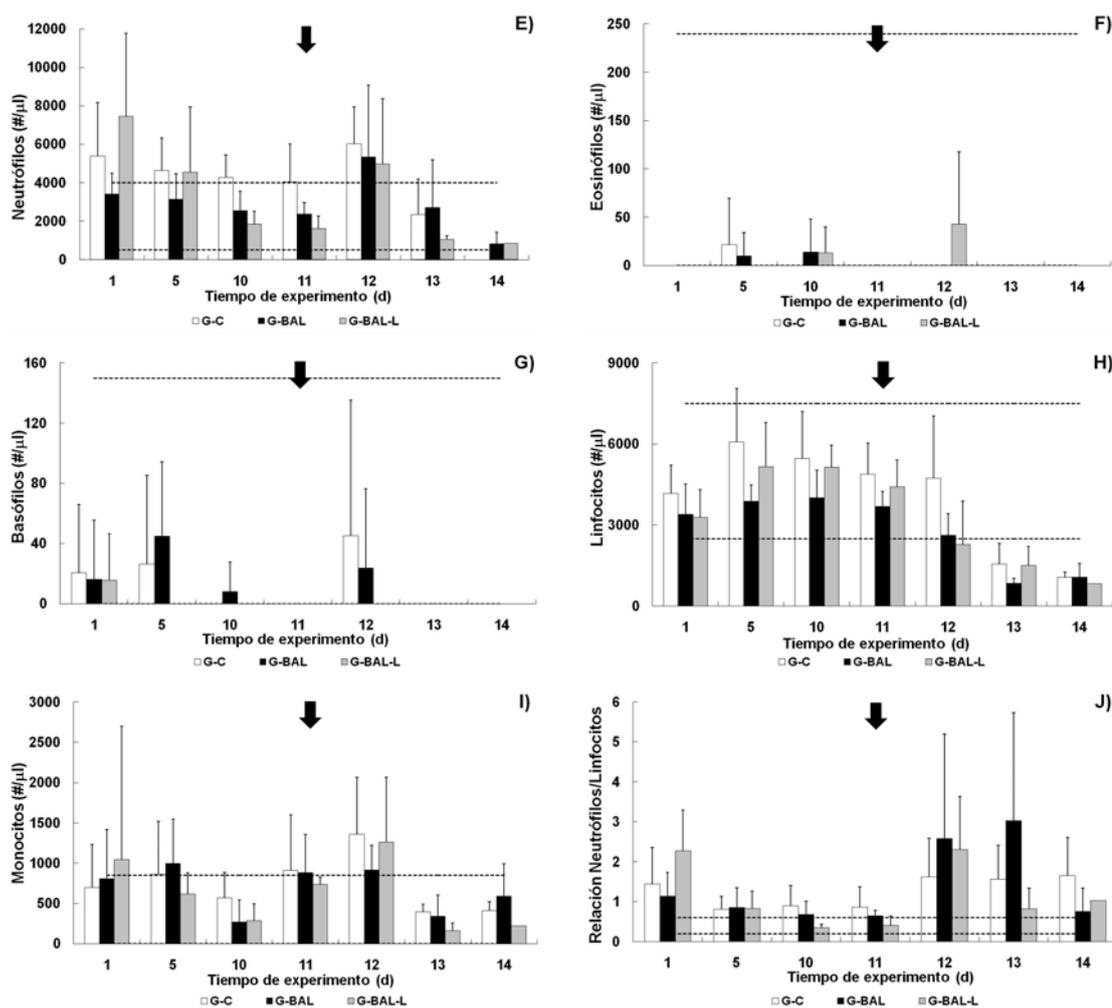
4.4.14.2. Serie leucocítica

El número total de leucocitos de los terneros estuvo dentro de los valores normales (Figura 31A) mostrando niveles entre 4000 cel/ μ l y 12000 cel/ μ l. Sin embargo, la infección con el patógeno fue responsable de la aparición de células inmaduras liberadas por la médula ósea como los mielocitos y metamielocitos los cuales no se encuentran normalmente en la sangre. Los mielocitos fueron encontrados en el G-BAL-L un día después de la infección y en el G-BAL tres días después de la infección. Estas células inmaduras no fueron encontradas en la sangre del G-C (Figura 31B). Los metamielocitos estuvieron presentes en la sangre de los terneros de todos los grupos experimentales a partir del segundo día de infección y hasta el final del ensayo (Figura 31C). Aunque los neutrófilos alcanzaron niveles superiores a los valores de referencia solamente durante el segundo día de infección (Figura 31E), los neutrófilos en banda mostraron niveles superiores a los normales a partir del segundo día de infección y durante el resto del ensayo (Figura 31D). Los eosinófilos y los basófilos se encontraron

dentro de los valores normales (Figura 31F y G). Los linfocitos permanecieron dentro de los niveles normales hasta el segundo día de infección. A partir del tercer día de infección y hasta el final del ensayo el número de linfocitos fue inferior al menor valor considerado como normal (Figura 31H). La disminución en los niveles de linfocitos y el aumento en los niveles de neutrófilos en este período de la infección fueron responsables del marcado aumento en la relación neutrófilos/linfocitos que caracterizó a los días de infección (Figura 31J). Los monocitos se encontraron dentro de los valores normales excepto durante el segundo día de infección (Figura 31I). Aunque la infección con el patógeno modificó algunos de los parámetros sanguíneos de la serie leucocítica no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre grupos para ninguna de las variables estudiadas.

Figura 31: Parámetros sanguíneos (serie leucocítica) en terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T. Los valores fueron expresados como la media \pm DS. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$). Las líneas de punto encierran un rango de datos que representan los valores de referencia reportados previamente. La flecha indica el día de la infección con el patógeno. A) Leucocitos totales. B) Mielocitos. C) Metamielocitos. D) Neutrófilos en banda. E) Neutrófilos. F) Eosinófilos. G) Basófilos. H) Linfocitos. I) Monocitos. J) Relación Neutrófilos/Linfocitos.



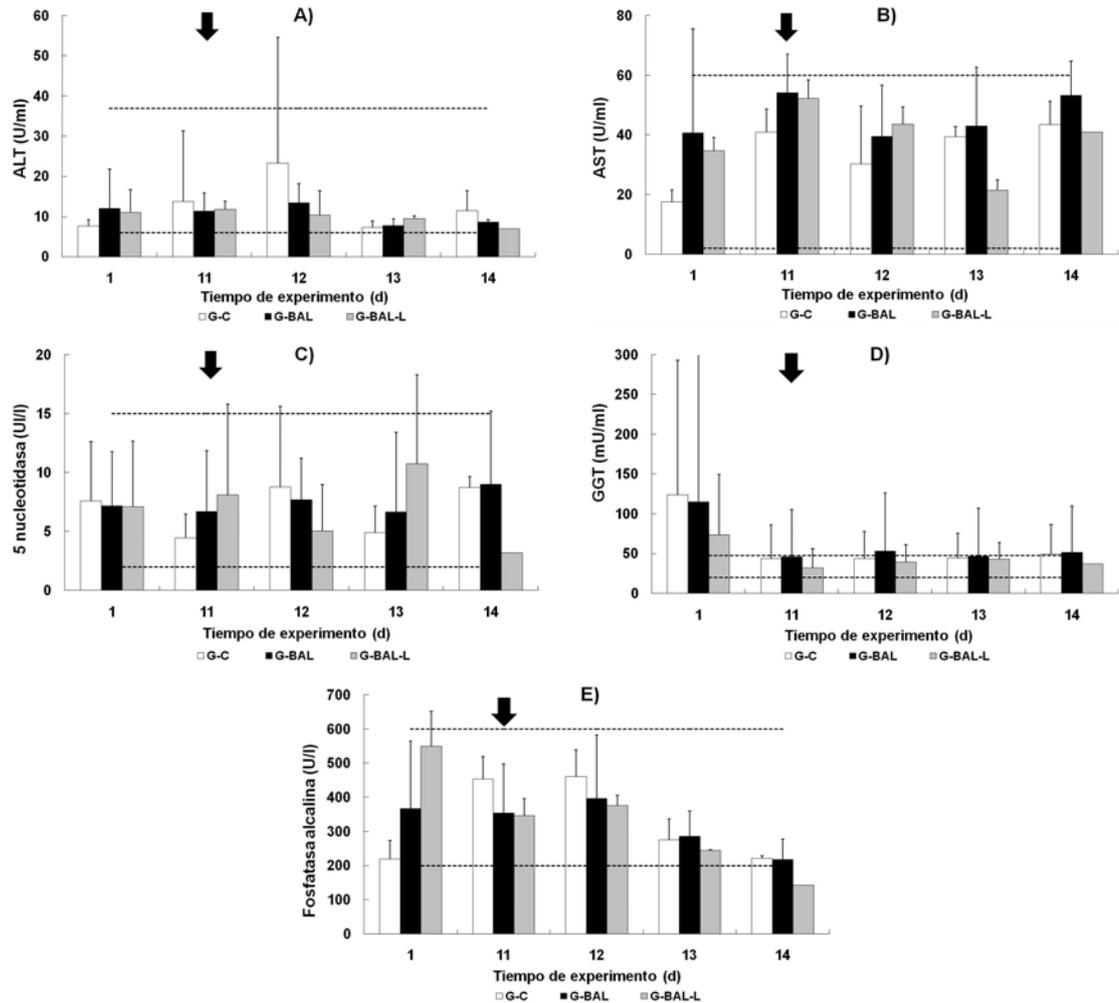


4.4.15. Niveles de enzimas hepáticas en terneros jóvenes infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T

El nivel de enzimas hepáticas de los terneros estuvo dentro de los valores normales (Figura 32). El patógeno no fue capaz de aumentar los niveles de enzimas hepáticas durante este breve período de infección. Aunque la concentración de GGT al inicio del ensayo estuvo fuera de los valores considerados normales es lógico vincular este hallazgo con la proximidad del calostrado de los animales. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre grupos para ninguna de las variables estudiadas.

Figura 32: Niveles de enzimas hepáticas en terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T. Los valores fueron expresados como la media \pm DS. No

se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$). Las líneas de punto encierran un rango de datos que representan los valores de referencia reportados previamente. La flecha indica el día de la infección con el patógeno. A) ALT. B) AST. C) 5 nucleotidasa. D) GGT. E) Fosfatasa alcalina.

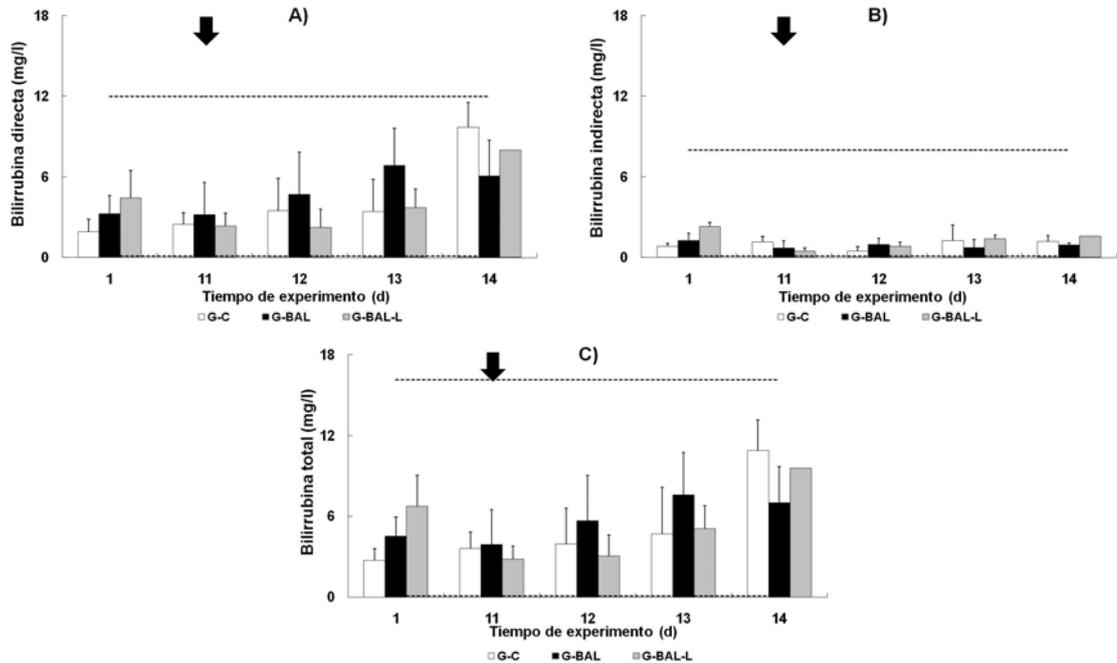


4.4.16. Niveles de bilirrubina en terneros jóvenes infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T

La figura 33 muestra los valores de bilirrubina en terneros infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T. La bilirrubina directa, indirecta y total estuvieron dentro de los valores normales mostrando que el patógeno no fue capaz de aumentar sus niveles durante este breve período de infección. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre grupos.

Figura 33: Niveles de bilirrubina en terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T. Los valores fueron expresados como la media \pm DS. No

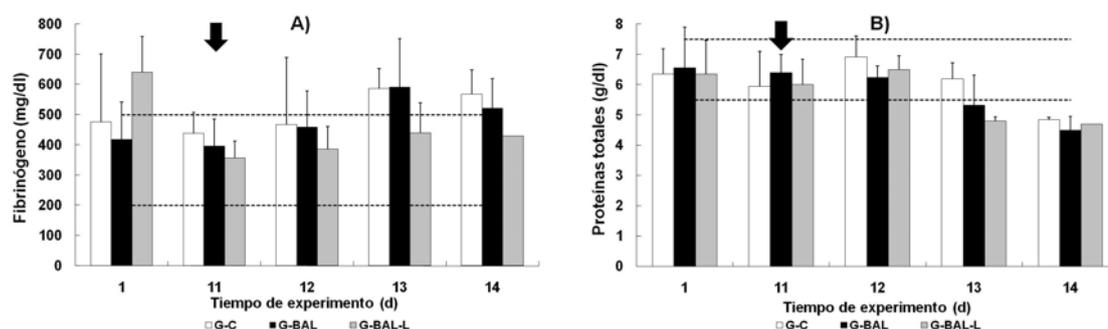
se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$). Las líneas de punto encierran un rango de datos que representan los valores de referencia reportados previamente. La flecha indica el día de la infección con el patógeno. A) Bilirrubina directa. B) Bilirrubina indirecta. C) Bilirrubina total.



4.4.17. Niveles de fibrinógeno y proteínas totales en terneros jóvenes infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T

Aunque el fibrinógeno mostró niveles superiores a los considerados normales durante el día 1 de experimento para el G-BAL-L y en los días 13 y 14 de ensayo para el G-C y G-BAL no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre grupos (Figura 34A). Los niveles de proteínas sérica estuvieron dentro de los niveles normales excepto durante el día 13 de ensayo para el G-BAL-L y durante el día 14 de experimento para todos los grupos experimentales. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre grupos (Figura 34B).

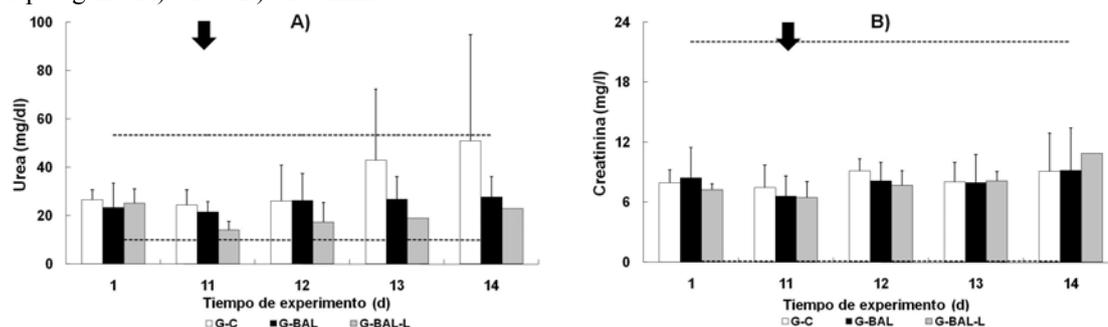
Figura 34: Niveles de fibrinógeno y proteínas totales en terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T. Los valores fueron expresados como la media \pm DS. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$). Las líneas de punto encierran un rango de datos que representan los valores de referencia reportados previamente. La flecha indica el día de la infección con el patógeno. A) Fibrinógeno. B) Proteínas totales.



4.4.18. Niveles de urea y creatinina en terneros jóvenes infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T

La concentración de urea y creatinina estuvieron dentro de los valores normales mostrando (Figura 35A y B) que el patógeno no fue capaz de aumentar sus niveles durante este breve período de infección. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre grupos.

Figura 35: Niveles de urea y creatinina en terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T. Los valores fueron expresados como la media \pm DS. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$). Las líneas de punto encierran un rango de datos que representan los valores de referencia reportados previamente. La flecha indica el día de la infección con el patógeno. A) Urea. B) Creatinina.

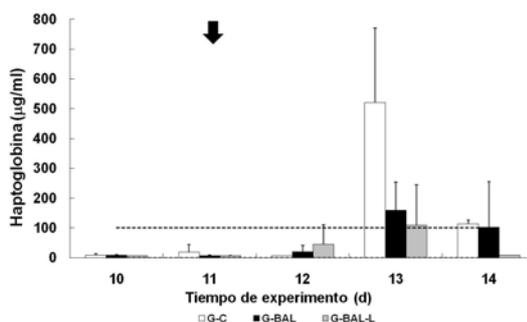


4.4.19. Niveles de haptoglobina en terneros jóvenes infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T

La figura 36 muestra los valores de haptoglobina en terneros infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T. Después de 10 días de tratamiento con el inóculo de BAL y previo a la inoculación con el patógeno los animales de todos los grupos experimentales tenían niveles de haptoglobina en su suero dentro de los valores

normales ($< 100 \mu\text{g/ml}$). Aunque dos días después del ingreso del patógeno los terneros de todos los grupos tenían niveles anormales de haptoglobina en el suero, se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el G-C y los grupos inoculados con las BAL (Figura 36). Así, durante el día 13 de experimento el G-C mostró un valor promedio de $520,6 \mu\text{g/ml}$ mientras que el G-BAL evidenció $159,3 \mu\text{g/ml}$ y el G-BAL-L $109,4 \mu\text{g/ml}$.

Figura 36: Niveles de haptoglobina en terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV (G-BAL), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de 10^9 UFC/kg PV y 100 g de lactosa (G-BAL-L) y no suplementados (G-C) e infectados con *Salmonella dublin* DSPV 595T. Los valores fueron expresados como la media \pm DS. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los grupos. Las líneas de punto encierran un rango de datos que representan los valores de referencia reportados previamente. La flecha indica el día de la infección con el patógeno.



5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. Efecto de la suplementación con tres bacterias ácido lácticas de origen bovino sobre la translocación bacteriana, la toxicidad oral aguda, la colonización intestinal, la performance de crecimiento y el estado sanitario

La microbiota intestinal de los mamíferos es compleja, numerosa y está fuertemente asociada a la salud del hospedador (Vlková y col., 2006). En los terneros jóvenes, el género *Lactobacillus* es un grupo bacteriano dominante tanto en el tracto digestivo como en la materia fecal y coloniza rápidamente el intestino alcanzando poblaciones de 10^7 - 10^8 UFC/g durante la primera semana de vida (Karney y col., 1986; Rada y col., 2006), momento en el cual la comunidad bacteriana intestinal del recién nacido es altamente inestable (Lukás y col., 2007).

La ausencia de crecimiento en MRS_{rif} de la flora láctica intestinal permitió rastrear el inóculo utilizado. De esta manera, fue posible estudiar el fenómeno poniendo énfasis específicamente en la colonización y la translocación del inóculo.

Los resultados muestran que la flora láctica de los animales antes de iniciar la suplementación con el inóculo bacteriano estaba en niveles equivalentes a aquellos informados por Vlková y col. (2006) y eran similares en ambos grupos experimentales. Esto permitió verificar diferencias atribuidas a la incorporación del inóculo en la dieta de los terneros.

El inóculo utilizado toleró las condiciones adversas de la porción anterior del tubo digestivo y colonizó ésta región del intestino. Además, contribuyó a la colonización del ciego de los animales del G-BAL porque permitió establecer estos microorganismos benéficos a nivel de intestino grueso, donde encontraron un lugar adecuado para su desarrollo y afincamiento. El ambiente menos agresivo del intestino grueso permite un mejor desarrollo de la microbiota intestinal en esta región (Ozawa y col., 1983; Vlková y col., 2006).

Los microorganismos inoculados alcanzaron en el duodeno una carga suficiente para mantener estables los valores encontrados en yeyuno y ciego de los animales del G-BAL. Además, mostraron su poder competitivo, desplazando y reemplazando la flora láctica residente en el duodeno, sin aumentar los niveles totales de BAL. Si bien los microorganismos utilizados sólo desplazaron parte de la flora normal del duodeno, en el yeyuno y ciego lograron aumentar significativamente el número de BAL totales,

situación que se puso en evidencia al recuperar un mayor número de microorganismos desde estas porciones del intestino de los animales tratados, a partir de la administración del inóculo. Este resultado está mostrando un efecto de colonización y permanencia representado por los altos niveles del inóculo encontrados en el tracto intestinal a lo largo del experimento, lo cual podría ser suficiente para conseguir algún efecto probiótico. En el futuro se debería determinar con precisión el intervalo entre inoculaciones que permitan mantener una carga bacteriana de orden 10^7 UFC a 10^8 UFC y la permanencia de los microorganismos en el tracto gastrointestinal después de finalizado el tratamiento.

Los integrantes del inóculo encontrados viables en el tracto intestinal son el resultado de la cantidad de microorganismos inoculados que fueron capaces de sobrevivir a las barreras biológicas, el producto de su multiplicación, la saturación de los nichos de alojamiento y, por otra parte, de la evacuación debida a la dificultad encontrada para adherirse. Las cepas inoculadas fueron capaces de sobrevivir en un nicho ecológico complejo como es el tracto gastrointestinal de los terneros. Esta característica resulta importante para microorganismos con potencial probiótico (Rogelj y col., 2002). Por otra parte, la capacidad del inóculo estudiado para alojarse en el intestino delgado es interesante porque en dicha región del sistema digestivo, además de desarrollarse los procesos de digestión y absorción de nutrientes, se alojan las células del sistema inmune que pueden ser estimulados como parte de su potencial actividad probiótica.

La evolución en los pesos de los terneros de ambos grupos, durante el período de estudio, mantuvo las características habituales para esa etapa de crecimiento y desarrollo de los animales. El aumento de peso fue continuo y sostenido a partir de la segunda semana del experimento y no mostró una disminución o pico durante el ensayo. Este comportamiento es el que frecuentemente se produce, cuando las condiciones sanitarias son óptimas, a partir del período posterior a la segunda semana de crianza. En ese momento los animales han superado el período estresante del transporte y afincamiento en su nuevo hogar. Los aumentos de peso fueron similares a los informados por Abe y col. (1995) para terneros Holstein criados en condiciones análogas. Si bien la diferencia entre las variables que conforman la performance de ambos grupos no pudo ser demostrada, una dosis escasa del inóculo, o una duración

insuficiente del ensayo, podrían explicar los resultados encontrados y abrir las puertas a otro estudio donde se contemplen estas nuevas condiciones. Por otra parte, la utilización de algún prebiótico junto a los microorganismos podría, en esas circunstancias, mejorar la performance de los animales, lo cual permitiría que el inóculo se establezca con mayor eficiencia a nivel intestinal.

Muchas de las dificultades en la performance de los terneros jóvenes están directamente relacionadas a las fallas en la digestión y absorción de nutrientes ocasionadas por bacterias patógenas productores de diarreas. El inóculo microbiano utilizado no fue capaz de producir aumentos significativos del peso vivo en condiciones sanitarias adecuadas, en donde la diarrea no estuvo presente. El efecto de los probióticos puede no ser pronunciado cuando el estado de salud de los terneros es bueno (Jenny y col., 1991). Sería interesante poner a prueba este inóculo microbiano en un modelo experimental en donde se utilicen terneros con diarrea de origen nutricional. La utilización de suero de queso o lactosa en altas cantidades junto al sustituto lácteo generaría un desbalance a nivel intestinal y los microorganismos integrantes del inóculo podrían demostrar su accionar benéfico ante estas circunstancias.

Muchos investigadores han estudiado acerca de la suplementación con probióticos en terneros y han expuesto resultados contradictorios, mostrando algunos de ellos mejoras en la performance de crecimiento (Bechman y col., 1977; Gilliland y col. 1980, Schwab y col., 1980; Abe y col., 1995; Meyer y col., 2001; Timmerman y col., 2005), mientras que otros no han visto efectos benéficos (Hatch y col., 1973; Morrill y col., 1977; Ellinger y col., 1980; Jenny y col., 1991; Higginbotham y Bath, 1993; Abu-Tarboush y col., 1996; Cruywagen y col., 1996; Goncalves y col., 1997; Oropeza Aguilar y col., 1998). Los principales factores que explican las diferencias encontradas entre los estudios, sin tener en cuenta el propio inóculo microbiano, están relacionados con el estado sanitario, el nivel de estrés de los animales y el grado de exposición a patógenos durante de la crianza. Todo indica que los beneficios que brinda la utilización de probióticos en cuanto a la performance de crecimiento, incremento de la salud y supervivencia de los terneros pueden ser detectados con mayor facilidad en establecimientos que presentan altas tasas de morbilidad y mortalidad ocasionadas básicamente por el síndrome diarrea. Esta idea, seguramente asociada a un potencial efecto curativo, no debería incentivar el empleo sólo en forma terapéutica y hacer perder

de vista la importancia estratégica de su uso en forma profiláctica. La acción benéfica de los probióticos siempre debe estar dirigida a mantener la microbiota intestinal indígena en equilibrio para que el animal se encuentre mejor preparado y pueda responder exitosamente ante el eventual ingreso, colonización e invasión de un patógeno.

La variabilidad en la tasa de crecimiento y en la aceptación del alimento concentrado durante la etapa temprana del desarrollo de los terneros impide que los efectos benéficos de los probióticos sean vistos, especialmente, en crías donde los factores estresantes están disminuidos y la microbiota intestinal está balanceada (Jenny y col., 1991). El inóculo no mostró efectos significativos, positivos o negativos, sobre la performance de los animales que puedan haber sido medidos en las condiciones en que se desarrolló el estudio. Estos resultados pueden estar relacionados con un buen estado de salud de los animales debido a condiciones sanitarias y ambientales adecuadas. Los animales sanos presentan una microbiota intestinal balanceada que les permite desarrollarse en forma adecuada. Sin embargo, cuando los mismos se encuentran en condiciones de estrés, ocurre un desbalance en la microbiota en donde las poblaciones de lactobacilos y bifidobacterias se ven disminuidas y los microorganismos patógenos pueden estar incrementados. El uso de probióticos previene este desbalance en el tracto intestinal e impide la ocurrencia de diarreas (Fuller, 1989) o reduce significativamente su prevalencia en los terneros (Abe y col., 1995). La actividad biológica de las BAL influye directamente sobre los procesos metabólicos, la dinámica de la microbiota gastrointestinal y la resistencia del hospedador (Novik y col., 2006). Como no hubo casos de diarreas en ambos lotes, no pudo comprobarse el comportamiento del inóculo ante esta situación. Los resultados de este experimento coinciden con los obtenidos por Higginbotham y Bath (1993), donde no observaron muerte de los animales ni casos de diarrea en terneros tratados con *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus faecium* durante el período de crianza. Conocimientos específicos de cada animal y su flora, la dieta y la fisiología digestiva, así como la situación de estrés, etc, podrían formar parte de la base para entender cuando la terapia BAL podría ser necesaria en el caso particular de cada granja. Hasta entonces, el enfoque más prometedor parece ser la utilización de BAL en los animales recién nacidos, tratados con antibióticos u otros animales con una microbiota intestinal temporalmente perturbada (Jonsson, 1985). Es necesario realizar

nuevas experiencias en donde se evalúen en detalle los efectos del inóculo ante un desafío con patógenos primarios productores de diarrea.

Para asegurar el crecimiento normal de los tejidos de los preestómagos, se debe estimular al ternero para que consuma alimento seco a una edad temprana, pues el desarrollo de los preestómagos y de las papilas absortivas responde al consumo de fibra y granos. Una gran parte de la ganancia de peso de los terneros jóvenes alimentados con cantidades limitadas de leche, además de un concentrado, se debe al crecimiento del tejido intestinal y a su llenado (Davis y Drackley, 2001). En este ensayo, el consumo de sustituto lácteo fue brindado intencionalmente en forma similar y constante en todos los terneros para estimular el rápido consumo de concentrado. Aunque no pudo apreciarse un consumo mayor o más precoz en los animales del G-BAL, una importante ingestión de concentrado fue vista a lo largo del ensayo que permitiría eliminar el sustituto lácteo de la dieta, parcial o totalmente, al finalizar la cuarta semana. La digestibilidad aparente de las proteínas mejora con la edad, lo que se relaciona con la maduración de los sistemas de la digestión proteica (Davis y Drackley, 2001).

El consumo de alimentos, la ganancia de peso vivo y la ocurrencia de las diarreas son los indicadores más generales y sensibles del estado de salud de los terneros y han sido utilizados para evaluar la toxicidad aguda de cepas potencialmente probióticas (Zhou y col., 2000). Los resultados mostraron un excelente estado de salud de todos los terneros y no se observaron signos de enfermedad ni muertes como consecuencia de la administración de un inóculo bacteriano suministrado a una cantidad de 10^9 UFC/kg PV/d. Es decir, no se encontraron efectos adversos sobre el estado de salud general, crecimiento y desarrollo de los animales del experimento, indicando que el inóculo utilizado no mostró efectos de toxicidad oral aguda.

Los resultados obtenidos en los parámetros bioquímicos sanguíneos, el leucograma, el análisis coproparasitológico y el índice de peso esplénico indican que los mismos se encontraban dentro de los rangos de los valores de referencia (Debreuil y Lapierre, 1997; Knowles y col., 2000; Mohri y col., 2007) y refuerzan la afirmación que los animales no mostraron signos de toxicidad y se mantuvieron en un estado adecuado de salud.

La translocación bacteriana es un indicador recomendado para evaluar el nivel de seguridad de un probiótico (Locascio y col., 2001) porque es el primer paso en el

proceso de patogénesis de muchas cepas indígenas oportunistas (Berg, 1995). Por ello, la habilidad de translocación es un buen indicador de su potencial infectividad (Zhou y col., 2000).

Los integrantes del inóculo utilizado no mostraron capacidad para translocar a sitios extraintestinales o, si lo hicieron, fueron eliminados por el sistema inmune del hospedador antes que puedan ser detectados. Es por eso que resulta razonable pensar que las cepas analizadas no ejercen efectos secundarios como translocación bacteriana y no tienen la habilidad de sobrevivir en los animales fuera del intestino. Además, el peso inalterable del bazo de los animales tratados indica que las cepas de BAL suministradas no causan o inducen infecciones sistémicas. Esto permite afirmar que las cepas no son invasivas y refuerza la hipótesis que plantea una utilización segura en la dieta de los terneros.

El crecimiento de algunas poblaciones microbianas demuestra que los órganos del medio interno estudiados no estaban ausentes de microorganismos (translocación fisiológica), hallazgo que ha sido informado previamente por otros autores (Zhou y col., 2000). La translocación ocurrió en ambos grupos experimentales y la intensidad no fue incrementada por el tratamiento probiótico. Esto indica que el inóculo no fue responsable de la translocación de las poblaciones estudiadas, pues los recuentos se obtuvieron tanto antes como durante su administración. Del mismo modo que lo expresaran Zhou y col. (2000) y Trevisi y col. (2007), no se puede excluir la hipótesis que en el hospedador persiste una pequeña cantidad, relativamente constante, de bacterias comensales en los órganos linfoides para mantener el sistema inmune activado al menos en la fase de transición del destete. El efecto visto no es atribuible al inóculo, sino que se trata de una población microbiana de base que el organismo trata de depurar en forma continua. La translocación de bacterias ácido lácticas se puede encontrar aún en aquellos animales no suplementados y es posible que sea un fenómeno verdaderamente normal (Trevisi y col., 2007). A la dosis utilizada, el inóculo no translocó al medio interno, de modo que podrían utilizarse dosis superiores en futuros experimentos si ello resulta necesario para lograr efectos benéficos.

Durante el período de destete la incorporación de sustitutos lácteos puede originar una respuesta inflamatoria que produciría desórdenes anatómicos y funcionales (Davis y Drackley, 2001), y ocasionalmente algunas bacterias podrían pasar a través de la

mucosa intestinal hasta los nódulos linfáticos mesentéricos y otros tejidos (Trevisi y col., 2007). La incidencia de translocación y diseminación es un indicador de la integridad de la barrera mucosa intestinal (Lee y col., 2000) y la inmadurez del intestino en los terneros jóvenes puede contribuir al traspaso de microorganismos hacia sitios extraintestinales.

No se encontró una asociación clara entre los recuentos microbianos de BAL indígenas en el intestino y los valores encontrados en los órganos internos, aunque no se hallaron integrantes del inóculo en los mismos. De todas maneras, el estado de salud de los terneros no fue afectado por la translocación.

Aunque el inóculo no fue capaz de inhibir completamente la translocación de otras poblaciones bacterianas, tampoco favoreció su ocurrencia y demostró no ser invasivo en un momento temprano de la vida del ternero en donde el intestino todavía no había completado su desarrollo. En ese mismo momento, otras poblaciones bacterianas han sido capaces de atravesar esta barrera inmadura en cantidad limitada durante todo el período de crianza de los terneros, posiblemente debido a que el hospedador no tuvo la capacidad para generar una respuesta adecuada que permitiera impedirla en esa etapa crítica de la vida de los animales en la que están sometidos a altos niveles de estrés.

Si las condiciones estresantes que ocurren durante el destete pueden generar una translocación fisiológica de bacterias comensales y de los microorganismos utilizados con efecto probiótico, la translocación no sería un buen parámetro para seleccionar los probióticos debido a que es un evento normal en estos animales jóvenes (Trevisi y col., 2007). Como esta interesante apreciación está sustentada sobre resultados obtenidos con técnicas de biología molecular sería conveniente reforzarla con ensayos que demuestren la viabilidad de los microorganismos en los órganos internos. Este estudio demostró la presencia de bacterias intestinales viables en los órganos internos de terneros sanos y la ausencia de los integrantes del inóculo probiótico. Además, es destacable la importancia de utilizar mutantes resistentes para poder rastrear las cepas probióticas en los ensayos de translocación.

Este inóculo microbiano de origen bovino ha protegido los animales de laboratorio infectados experimentalmente con *Salmonella dublin* (Frizzo y col., 2005) y podría actuar como un antagonista una vez instalado en el intestino. Por ello, sería interesante investigar el efecto del tratamiento probiótico sobre la colonización y translocación de

un patógeno causante de enfermedad en los terneros jóvenes, con el fin de verificar el posible efecto protector del mismo.

Muchas de las dificultades en la performance de los terneros lactantes están directamente relacionadas con las fallas en la digestión y absorción de nutrientes ocasionadas por bacterias patógenas productores de diarreas. El inóculo utilizado no interfirió en el crecimiento de los animales y no produjo casos de diarrea en una etapa crítica del desarrollo de los terneros. Como no hubo casos de diarreas en ambos lotes no se pudo comprobar algún efecto favorable del inóculo ante esta situación. Es necesario realizar nuevas experiencias en donde se evalúe en detalle la performance del inóculo ante un desafío con patógenos productores de diarrea.

La utilización del inóculo, en las condiciones que se realizó el experimento, no tuvo influencia sobre la performance de crecimiento. Es posible que el excelente estado sanitario en que se encontraban los animales y la ausencia de condiciones estresantes durante la crianza haya impedido al inóculo expresar sus efectos benéficos. De todas maneras, este inóculo microbiano de origen bovino podría actuar como un antagonista una vez instalado en el intestino y por ello sería interesante investigar el efecto del tratamiento probiótico sobre la colonización y translocación de un patógeno primario causante de enfermedad en los terneros jóvenes para verificar el posible efecto protector del mismo. Además, se debería determinar con precisión un intervalo máximo entre inoculaciones que permitan mantener una carga bacteriana razonable y la permanencia de los microorganismos en el tracto gastrointestinal después de finalizado el tratamiento. Aunque habría que realizar pruebas específicas, el inóculo utilizado manifestó cierto grado de inocuidad al no producir reacciones adversas desde el punto de vista clínico.

5.2. Influencia del inóculo de BAL y el suero de queso sobre la performance de crecimiento y el estado sanitario de los terneros

Los terneros son vulnerables a las enfermedades, especialmente gastroentéricas, durante las primeras semanas de vida. El mantenimiento del peso vivo durante esta etapa podría mejorar la resistencia contra estos padecimientos (Cruywagen y col., 1996). En particular, los terneros alimentados con sustituto lácteo sufren, frecuentemente, una disminución de su peso en la etapa inicial de la crianza (Jaster y col., 1990). El inóculo utilizado fue capaz de producir aumentos significativos del peso

de los animales en condiciones donde se registraron casos de diarrea. La utilización de suero de queso como suplemento junto al inóculo mejoró la performance de los animales en estas condiciones. Esto podría estar relacionado con un adecuado establecimiento de los microorganismos integrantes del inóculo a nivel intestinal y una mejora en la utilización del alimento en general y de la lactosa en particular. Por otro lado, es improbable que el tratamiento con el inóculo microbiano haya generado algún efecto adverso sobre la salud de los animales debido a que el consumo y la ganancia de peso fueron adecuadas y el estado de salud de los animales fue bueno.

En la etapa de producción de terneros jóvenes, la reducción de los costos de alimentación es clave para la sustentabilidad del sistema. De esta manera, la incorporación de fuentes alternativas de proteínas, la sustitución de componentes naturales, o la modificación en la relación de los ingredientes lácteos en los sustitutos, contribuyen a mejorar la rentabilidad en la crianza. Sin embargo, la propia constitución y calidad de la materia prima, sobre todo proteica, puede afectar la coagulación que se produce en el abomaso, la cual es considerada esencial para una adecuada digestión y absorción de los nutrientes en los terneros y, subsecuentemente, para una satisfactoria performance de crecimiento (Ortigue-Marty y col., 2003). No obstante, es irrelevante que las proteínas del suero de leche no coagulen en el abomaso porque las mismas son digeridas naturalmente en el intestino delgado sin la acción de las proteasas abomasales y, de esta manera, son bien utilizadas por los terneros para su crecimiento (Davis y Drackley, 2001). El patrón de productos finales de la digestión y absorción influencia la utilización de nutrientes por los tejidos corporales en los terneros prurumiantes (Ortigue y col., 1996). Por otra parte, las proteínas solubles incluidas en los sustitutos lácteos contribuyen al vaciado gástrico más rápido (Toullec y Formal, 1998) y, por consiguiente, mejoran el consumo. Al analizar los resultados obtenidos en la experiencia, el mayor consumo de alimento concentrado, que se observó en los terneros alimentados con el inóculo estudiado, podría explicar los mayores aumentos de peso que tuvieron esos animales, aunque obligó a los terneros a mantener niveles de eficiencia adecuados en la utilización de su fuente alimenticia para conseguir tal fin. Además, un consumo prematuro de concentrado por parte del ternero joven tiene, normalmente, un fuerte impacto sobre el desarrollo ruminal. Es decir, para asegurar el crecimiento normal de los tejidos de los preestómagos, se debe estimular al ternero para

que consuma alimento seco a una edad temprana, pues el desarrollo de los tejidos de los preestómagos y de las papilas absortivas responde al consumo de fibra y grano. Una gran parte de la ganancia de peso de los terneros jóvenes alimentados con cantidades limitadas de leche, más el agregado de un concentrado, se debe al crecimiento del tejido intestinal y a su llenado (Davis y Drackley, 2001). En este ensayo, el sustituto lácteo fue brindado intencionalmente en forma similar y constante en todos los terneros para estimular el rápido consumo de concentrado. Esto permitió diferenciar con facilidad a los animales del G-BAL, quienes consumieron una mayor cantidad de alimento en forma más precoz. Esta mayor ingestión de concentrado, vista a lo largo del ensayo, es muy importante porque permitiría eliminar totalmente el sustituto lácteo de la dieta de los terneros del G-BAL antes de la cuarta semana, mientras que en los animales del G-C esta misma condición se alcanzaría sólo después de la quinta semana. El inóculo microbiano estimuló el consumo de alimento seco en los terneros, lo cual es fundamental para el desarrollo de los tejidos epiteliales del retículo-rumen, que a su vez son necesarios para la absorción de los productos de la digestión fermentativa que allí ocurre. Además, el establecimiento de la población microbiana depende de los sustratos provistos por el alimento seco (Davis y Drackley, 2001). Es en estas condiciones, precisamente, donde el inóculo estudiado favorecería el consumo precoz de concentrado e, indirectamente, podría estimular el crecimiento temprano de los preestómagos, permitiendo un destete anticipado de los animales. Esto tiene una fuerte relevancia sobre los costos de producción y la sustentabilidad del sistema de crianza.

Hasta el momento no hay acuerdo entre los autores sobre la cantidad máxima de suero de queso que puede ser incluida en los sustitutos lácteos sin producir una disminución en la performance de crecimiento. Concentraciones superiores al 30% de suero producen con frecuencia diarreas o una reducción del rendimiento debido a los altos contenidos de lactosa y minerales del suero deshidratado (Davis y Drackley, 2001). A pesar de esto, hay datos experimentales muy variados en este sentido. Por un lado, se ha observado disminución de la ganancia de peso en terneros alimentados con sustituto lácteo en los que se utilizaba un 45% de suero de queso seco, mientras que en otros trabajos se han obtenido ganancias de peso satisfactorias utilizando 89% de suero seco (Schingoethe, 1976). Entre estos extremos se encuentran un importante número de ensayos con resultados muy diversos donde se han utilizado distintas cantidades de

suero. Esta variabilidad en los resultados obtenidos en los experimentos obedece a la diversidad de los distintos componentes de los sueros de queso y la discrepancia entre los procesos tecnológicos utilizados para el secado. Por otra parte, una diferencia en la actividad de la lactasa intestinal puede explicar los desórdenes digestivos que ocurren en algunos animales alimentados con alto contenido de lactosa, pero no en otros (Schingoethe, 1976). Seguramente la composición de la microbiota también influye en el nivel de eficiencia en que la lactosa es utilizada a nivel intestinal, la cual, a su vez, ejerce un notable poder de selección sobre sus integrantes bacterianos. Los animales sanos presentan una microbiota intestinal balanceada que les permite desarrollarse en forma adecuada. Sin embargo, cuando los mismos se encuentran en condiciones de estrés, ocurre un desbalance en esta microbiota, las poblaciones de lactobacilos y bifidobacterias se ven disminuidas y los microorganismos patógenos pueden incrementarse. Como se indicó, el empleo de probióticos previene este desbalance en el tracto intestinal e impide la ocurrencia de diarreas (Fuller, 1989) o reduce significativamente su prevalencia en los terneros (Abe y col., 1995). La concentración de lactosa en la leche está finamente regulada por la glándula mamaria y se mantiene entre límites muy estrechos. Esto podría obedecer a la escasa capacidad que tiene el intestino de los individuos jóvenes para tolerar altas concentraciones de este carbohidrato. De acuerdo con los resultados obtenidos se puede considerar a la lactosa, componente mayoritario del suero de queso, como la responsable del aumento del ICF en los terneros no tratados con los microorganismos y al inóculo como el encargado de disminuir este índice al estar en contacto con niveles de lactosa superiores a los encontrados en la leche bovina. Además, los resultados muestran que la capacidad de utilización de la lactosa aumentó a medida que la edad de los animales se fue incrementando. Todo ello posibilitó un mejor aprovechamiento de la lactosa por parte de los terneros tratados y justifica la incorporación del inóculo en la crianza artificial para mejorar la utilización de este carbohidrato de origen lácteo. Además, aumenta las chances de incorporar un mayor contenido de lactosa en los sustitutos lácteos sin riesgo de generar problemas sanitarios (diarreas osmóticas).

El consumo de sustituto lácteo con una concentración de lactosa superior al habitual (5% de lactosa in la leche vs. 7.9% de lactosa en este experimento) generó un estado de desequilibrio que quedó en evidencia al encontrar elevados ICF. Este modelo

experimental expuso al ternero a una situación de mayor vulnerabilidad para sufrir trastornos digestivos; motivo por el cual, resultó especialmente interesante para evaluar el comportamiento del inóculo microbiano, debido a la dificultad que se presenta cuando los animales tienen un muy buen estado de salud relacionado a condiciones sanitarias y ambientales adecuadas. Cualquiera otra estrategia, más allá de la lograda con la lactosa en este estudio, que tenga por finalidad generar un desbalance controlado en el tracto gastrointestinal, será de utilidad para evaluar el efecto benéfico de un inóculo microbiano con potencial probiótico. Esto está sustentado por las observaciones de Jenny y col. (1991) y Higginbotham y Bath (1993), quienes no encontraron diferencias significativas en los índices de diarrea y la mortalidad en dos grupos experimentales integrados por terneros en buen estado sanitario, en donde uno de ellos estaba tratado con probióticos. La diarrea no patógena es causada, en la mayoría de los casos, por un desbalance de la microbiota intestinal. Varios tipos de estrés (consumo de alimentos de alta densidad, cambios drásticos en las condiciones climáticas -en particular en la temperatura-, cambios en los componentes de los alimentos y en las circunstancias ocurridas después del transporte) son los principales factores que causan diarrea (Ishihara y col., 2001). Los microorganismos patógenos pueden infectar con mayor facilidad a los terneros una vez que la microbiota se encuentra desbalanceada. De todas maneras, el establecimiento y mantenimiento de especies benéficas de microorganismos en el intestino de los terneros podría ayudar a suprimir los microorganismos patógenos (Morrill y col., 1995), constituyendo una estrategia profiláctica del sistema productivo.

Se encontraron fuertes diferencias entre los grupos en los niveles de colesterol total durante las 2 primeras semanas. La diferencia encontrada en estos valores podría estar relacionada con el mejor aprovechamiento del sustituto lácteo (16% de extracto etéreo), del suero de queso (4% de grasa) por los animales del G-BAL y con el mayor consumo de alimento balanceado (5% de extracto etéreo) que demostró ese grupo durante el experimento. De todas maneras, los resultados obtenidos en los parámetros bioquímicos sanguíneos indican que los mismos se encontraban dentro de los rangos de los valores de referencia (Debreuil y Lapierre, 1997; Knowles y col., 2000; Mohri y col., 2007). Todo ello refuerza la afirmación que los animales se mantuvieron en un estado adecuado de salud. El factor determinante más importante para la salud y supervivencia del ternero es el consumo temprano y adecuado de un calostro de alta calidad, debido a

que nace sin una adecuada inmunidad humoral (Davis y Drackley, 2001). La concentración de proteínas séricas totales de ambos grupos experimentales al inicio del experimento fue superior a 5,5 g/dl, lo cual evidenció que la ingestión de calostro fue satisfactoria (Quigley, 2001). Aunque habría que hacer pruebas específicas, el inóculo utilizado podría ser considerado inocuo al no producir reacciones adversas desde el punto de vista clínico.

Muchos de los problemas afines a la performance de los terneros jóvenes están directamente relacionados con los fallos en la digestión y la absorción de los nutrientes ocasionados por las bacterias patógenas productoras de diarreas. Sin embargo, la diarrea de tipo nutricional es la que frecuentemente antecede y predispone al ternero al síndrome de diarrea generado por microorganismos patógenos. El inóculo microbiano se puso a prueba en un modelo experimental diseñado para que los terneros jóvenes, alimentados con sustituto lácteo y una alta cantidad de suero de queso, estuvieran más expuestos a desbalances a nivel intestinal. En este contexto, los microorganismos que integraron el inóculo demostraron su accionar benéfico y podrían utilizarse para prevenir algunos tipos de diarrea de origen nutricional. La única variable que se modificó entre los grupos fue la incorporación del inóculo microbiano en la dieta de los terneros tratados. Es evidente que los microorganismos que integran el inóculo modificaron, de alguna manera, los patrones del flujo de nutrientes en el intestino, lo cual tuvo efectos benéficos sobre la utilización del alimento por parte de los animales. Los terneros inoculados habrían aprovechado mejor la lactosa y las proteínas del suero de queso, lo cual se manifestó con una mejor performance de crecimiento. Esta observación justifica el empleo del inóculo junto al suero de queso durante la crianza de los terneros destetados tempranamente. Es necesario realizar nuevas experiencias en donde se evalúen, en detalle, los efectos del inóculo junto a la lactosa frente a un desafío con patógenos primarios productores de diarrea.

5.3. Incorporación de bacterias ácido lácticas y lactosa a la dieta de terneros jóvenes y su efecto sobre la performance de crecimiento y el balance microbiano intestinal

La homeostasis intestinal se sustenta en el equilibrio entre la absorción (nutrientes, iones), secreción (iones, IgA) y la capacidad de barrera (para los agentes patógenos y macromoléculas) del epitelio digestivo. Estas funciones se controlan a través de múltiples interacciones con las células endocrinas, neurocrinas, del estroma y las células inmunitarias o con la microbiota bacteriana residente que regulan las funciones del epitelio (Heyman y Ménard, 2002). El inóculo microbiano se puso a prueba en un modelo experimental diseñado para que los terneros jóvenes, alimentados con sustituto lácteo y una alta cantidad de lactosa, estuvieran más expuestos a desbalances a nivel intestinal. Teniendo en cuenta que el 70% del suero de queso está constituido por lactosa, el modelo fue similar al del ensayo anterior aunque sin la posible influencia que pueden tener el resto de los componentes del suero de queso (principalmente proteínas solubles de la leche que permanecen en este subproducto lácteo). Un importante número de investigadores han estudiado los efectos de la lactosa sobre la performance de crecimiento de los terneros (Rojas y col., 1948; Flipse y col., 1950a y 1950b; Atkinson y col., 1957). En general, los terneros alimentados con leche entera o leche descremada por períodos de hasta 6 semanas utilizaron la lactosa en la dieta de manera muy eficaz aunque cuando se duplicó la concentración del carbohidrato la diarrea fue notoria. Sin embargo, se han reportado mejoras en la conversión alimenticia en animales suplementados con lactosa (Flipse y col., 1950a y 1950b). Por otra parte, es bien conocido el efecto laxante que tiene la lactosa cuando se otorga en una concentración superior a las que se encuentran en la leche materna (Fischer y Sutton, 1949).

Los altos niveles de lactosa (200 g/d) generaron un importante desbalance en el intestino de los animales, hecho que se vio claramente reflejado debido a la alta frecuencia de diarreas encontrada en esos animales. Cualquier factor luminal o seroso que afecte a los sistemas de transporte también afecta al movimiento de los electrolitos y el agua. Además de los mecanismos específicos implicados en el movimiento de agua en el intestino, la diarrea osmótica también puede ser inducida cuando un compuesto no absorbible alcanza el lumen intestinal y mantiene un gradiente osmótico entre el lumen intestinal y la sangre. Un caso típico de la diarrea osmótica que es inducida por la

malabsorción de la lactosa en el caso de deficiencia de lactasa (Heyman y Ménard, 2002). Es indiscutible tanto que el ICF fue notoriamente superior en esos mismos animales como que la lactosa fue la responsable de ello. Sin embargo, los terneros inoculados con probióticos habrían aprovechado mejor la lactosa lo cual se manifestó con una mejor performance de crecimiento. La inhibición de las actividades generales de la microbiota en la producción de sustancias tóxicas tales como las aminas, el amoníaco y los compuestos fenólicos podrían explicar las mejores performance de crecimiento que a veces se observan. Si esto ocurre realmente *in vivo* se podría reducir la demanda del huésped para desintoxicar estas sustancias, y por lo tanto, dejaría más energía para el crecimiento (Jonsson, 1985). Los terneros son especialmente vulnerables a los trastornos digestivos durante las primeras semanas de vida y los desbalances nutricionales y las enfermedades gastroentéricas son comunes en los sistemas de crianza intensivos. Ante estas condiciones de manejo el empleo del inóculo probiótico durante la crianza mejoraría las condiciones de los animales, los índices de performance en la guachera y podrían utilizarse para prevenir diarreas de origen nutricional. No obstante, sería conveniente realizar nuevas experiencias en donde se ponga a prueba el inóculo frente a un desafío con patógenos primarios productores de diarrea para comprobar su comportamiento en esta condición extrema.

La incorporación de lactosa en la dieta de los terneros tomo relevancia cuando se comenzaron a formular los sustitutos lácteos comerciales. La cantidad en que debía suministrarse siempre fue motivo de mucha discusión a tal punto que no está claro cuanta lactosa es capaz de tolerar un ternero joven sin que se produzcan efectos indeseables en su crecimiento y en su estado sanitario. Se sabe que el suministro de lactosa genera diarrea a los terneros a las pocas horas de su administración y que cuando el carbohidrato se retira de la dieta los animales vuelven al estado inicial. Los terneros más jóvenes son más susceptibles a la diarrea debido a la lactosa incorporada aunque, paradójicamente, la actividad lactasa disminuye a lo largo de la vida del ternero joven. La actividad de la microbiota intestinal puede explicar, al menos en parte, este comportamiento en el cual la lactosa incorporada es mejor utilizada cuando los animales aumentan su edad. No sólo las bacterias interfieren con la fisiología intestinal sino que también el ambiente intestinal es importante en la habituación de las bacterias. El ambiente intestinal es capaz de modificar la proporción de las bacterias ingeridas

afectando su viabilidad (Heyman y Ménard, 2002). Los niveles de lactosa utilizados fueron capaces de generar un aumento en el número de los microorganismos del género *Lactobacillus*. Además, un incremento similar ocurrió en los animales suplementados con el inóculo. Esto podría estar relacionado con un adecuado establecimiento de los microorganismos integrantes del inóculo a nivel intestinal y una mejora en la utilización del alimento en general y de la lactosa en particular. La explicación de la influencia favorable de la lactosa en las bacterias ácido lácticas del intestino debe buscarse en el hecho de que cuando la lactosa está presente, incluso en pequeñas cantidades, las mejores condiciones culturales y ambientales son creados para estos organismos en particular, sin un correspondiente cambio favorable para la masa de otras bacterias normalmente presentes. Así, una dieta alta en lactosa tiene marcada influencia sobre la flora intestinal (Atkinson y col., 1957) y la persistencia en el tracto gastrointestinal de las bacterias ácido lácticas ingeridas, por lo menos durante algunos días, es obligatorio para su efecto beneficioso (Heyman y Ménard, 2002). Aunque el número de coliformes no disminuyó en los terneros suplementados con el inóculo tampoco se notaron incrementos que podrían haber ocurrido debido al aumento del contenido de lactosa en la dieta, carbohidrato que es utilizado fácilmente por esta población microbiana. Los animales sanos presentan una microbiota intestinal balanceada que les permite desarrollarse en forma adecuada y la población de *Lactobacillus* tiene una fuerte influencia sobre esa condición de balance. Aunque la lactosa es un azúcar ampliamente utilizable por muchos de los microorganismos intestinales, indudablemente ejerció un considerable poder de selección sobre los integrantes de la microbiota intestinal y junto al inóculo utilizado fueron responsables de sostener a lo largo del tiempo una relación microbiana favorable a la población de *Lactobacillus* vs coliformes. Es probable que estos dos factores mejoren el aprovechamiento de la lactosa a nivel intestinal la cual, a su vez, retroalimentaría el sistema favoreciendo el mantenimiento de poblaciones bacterianas benéficas que se adaptan mejor a las condiciones generadas por los ácido orgánicos en el intestino. El recuento de *Lactobacillus* es normalmente mayor que el de coliformes (Relación *Lactobacillus*/coliformes > 1) en los terneros sanos pero es menor en aquellos terneros que sufren diarrea (Abu-Tarboush y col., 1996). Resultados similares a los de este ensayo fueron informados por Jonsson y Olsson (1985). Después de 5 semanas de tratamiento probiótico la relación *Lactobacillus*/coliformes fue menor a

1 en los animales que no recibieron el inóculo de BAL y en los que no recibieron lactosa o la recibieron en cantidades elevadas. Sin embargo esta relación fue beneficiosa (> 1) en los grupos inoculados con un nivel tolerable de lactosa y con el inóculo de BAL. De esta manera, la utilización de estos 2 elementos pondría al animal en una situación ventajosa frente a un posible contacto con un microorganismo patógeno que ingresara por la vía oral. El efecto beneficioso de las bacterias lácticas viables es, posiblemente, debido a la proliferación transitoria de estas bacterias en el tracto digestivo, *in vivo*, que representan una barrera microbiológica contra el desarrollo de bacterias patógenas (Heyman y Ménard, 2002). Los microorganismos del género *Lactobacillus* probablemente puedan obtener ventajas en determinados regímenes de alimentación y competir con éxito con las bacterias patógenas (Jonsson, 1985). El incremento en los *Lactobacillus* fecales encontrado en este estudio está en un todo de acuerdo con otras observaciones reportadas por varios investigadores (Ellinger y col., 1980; Gilliland y col., 1980; Jenny y col., 1991; Abu-Tarboush y col., 1996). Sin embargo, el número absoluto informado para terneros jóvenes por los diferentes autores no son similares y varían extremadamente. Esto podría estar generado en parte por las diferentes metodologías utilizadas por los autores y por la variación propia de los sistemas biológicos. De todas maneras, todos coinciden en que el número de *Lactobacillus* es mayor durante las primeras semanas de vida y alrededor de las 5 a 6 semanas la concentración de este género baja sustancialmente.

Cuando se utilizan bacterias viables es necesario que puedan sobrevivir el paso por el estómago permanezcan activas. Para ello es importante utilizar las cepas que pertenecen a la población indígena aislada de la especie huésped animal para los que está destinada, pues, están adaptadas al medio ambiente del tracto gastrointestinal. El inóculo utilizado contribuyó a la colonización del yeyuno de los animales inoculados con las BAL (P₁) por parte del género *Lactobacillus* spp. porque permitió establecer estos microorganismos benéficos a nivel de intestino delgado, donde encontraron un lugar adecuado para su desarrollo y afincamiento. Además, el inóculo debe haber mostrado su poder competitivo, desplazando y reemplazando la microbiota láctica residente en el yeyuno porque los niveles de BAL totales en los terneros inoculados con las BAL fueron superiores a los encontrados en los animales controles. En los animales convencionales, el efecto barrera de la microbiota hace difícil la implantación de la cepa

con potencial probiótico y el establecimiento de la microbiota intestinal en el neonato puede ser influenciado pero el cambio de la microbiota intestinal estable de animales convencionales es más dificultoso (Jonsson, 1985). De esta manera, los animales jóvenes utilizados en el ensayo modificaron sensiblemente la cantidad de microorganismos benéficos presentes en la mucosa del yeyuno y esto puede explicar en parte algunos de los efectos benéficos detallados hasta ahora. A su vez, los animales tratados con las BAL aumentaron la expresión de IgA en esa misma región intestinal. Esto sería debido a una estimulación del sistema inmune y podría jugar un papel esencial en la protección de los animales contra enfermedades intestinales. La marcación anti-IgA es prominente en la lámina propia del intestino, entre las células epiteliales y en la luz de las criptas (Butler y col., 1971). El descenso general en la producción de IgA en materia fecal para los terneros a medida que pasa el tiempo está soportado por investigaciones anteriores (Heinrichs y col., 2009). En los lechones, los niveles de IgA total fecal disminuyó después de 14 días de edad y siguió disminuyendo hasta los 35 d a 56 d hasta el final de la experiencia (Scharek y col., 2005). Este incremento de la IgA a principios de la vida puede ser debido a la continua presencia de anticuerpos del calostro o debido a factores de estrés temprano. Las primeras 2 semanas de vida para los terneros jóvenes criados en guacheras son estresantes, incluyendo el nacimiento, la separación de la madre, el movimiento y/o transporte a la guachera, la introducción de una dieta líquida otorgada en botella o balde y el consumo de alimento balanceado iniciador, lo cual podría provocar un aumento en la actividad del sistema inmune humoral (Heinrichs y col., 2009). Los resultados favorables obtenidos luego de 5 semanas de ensayo ponen en evidencia, por un lado, el efecto del inóculo sobre las células del sistema inmune y por otro despiertan cierto interés en vislumbrar tanto el efecto que pudiera generar durante las primeras semanas de vida de los animales como los mecanismos utilizados por los microorganismos y el huésped. Estas incógnitas deberán ser motor de las nuevas investigaciones que deberán realizarse.

Por otro lado, debido a que el consumo y la ganancia de peso fueron adecuadas y el estado de salud de los animales fue bueno es improbable que el tratamiento con el inóculo microbiano haya generado, al igual que en los ensayos anteriores, algún efecto adverso sobre la salud de los animales. Además, los resultados obtenidos en el índice de

peso esplénico refuerzan la afirmación que los animales no mostraron signos de toxicidad y se mantuvieron en un estado adecuado de salud.

Muchas de las inconsistencias vistas en los efectos positivos obtenidos cuando se introduce BAL a la dieta probablemente podrían explicarse si se conocen las circunstancias más detalladas para cada situación de la alimentación y el enfoque más prometedor parece estar dirigido a la utilización de BAL en los animales recién nacidos, en animales tratados con antibióticos u otros animales con una microbiota intestinal temporalmente perturbada (Jonsson, 1985). El modelo experimental utilizado, en el cual se expuso a los animales a una situación de estrés nutricional resultó adecuado para hacer más evidente los efectos positivos que genera el inóculo y así darle consistencia a los fundamentos que fomentan su utilización durante la crianza de los terneros jóvenes.

5.4. Incorporación de bacterias ácido lácticas y lactosa a la dieta de terneros jóvenes y su efecto sobre la colonización intestinal de *Salmonella dublin* DSPV 595T y la invasión a los órganos internos de terneros alimentados con sustituto lácteo.

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 en animales de laboratorio (Casas y col., 1998; Salminen y col., 1998b; Maia y col., 2001; Moura y col., 2001; Frizzo y col., 2005) pero no se ha evaluado suficientemente en los animales de granja. Los terneros jóvenes son especialmente vulnerables a las enfermedades gastroentéricas durante las primeras semanas de vida y la utilización de un modelo experimental de gastroenteritis inducido por *Salmonella* puso a prueba el efecto benéfico del inóculo probiótico experimental en una situación de desbalance extremo en la microbiota intestinal.

Hay más de 2.500 diferentes serotipos de *Salmonella enterica*, y algunos de ellos son patógenos importantes de animales y seres humanos. A pesar de que los serotipos de *S. enterica* son genéticamente muy similares, difieren de manera significativa en la biología, especialmente en la gama de huéspedes y el espectro de enfermedad que producen (Pullinger y col., 2008). Así, causa fiebre entérica en los terneros y los bovinos adultos y también induce el aborto por invadir el sistema sanguíneo del feto. *Salmonella enterica* es un importante patógeno que causa diarreas y las infecciones

pueden tener secuelas sistémicas graves en función de factores propios del huésped y del serotipo que interviene (Pullinger y col., 2007). Los serotipos que son predominantemente aislados en una especie huésped en particular, aunque a veces pueden causar enfermedades en otras especies huéspedes, son clasificados como específicos de hospedador o de hospedador restringido, por ejemplo, *S. enterica* serovar Dublin (*Salmonella dublin*) está asociada con los bovinos (Pullinger y col., 2008). Es decir, aunque en un sentido estricto todos los agentes productores de enfermedad deberían ser considerados adaptados al huésped hay, sin embargo, diferencias epidemiológicamente importantes en la medida en que para algunos agentes sólo hay un huésped susceptible y para otros hay un espectro más o menos extenso de especies huéspedes definidas (Steinbach y col., 2000). El concepto de adaptación de *Salmonella* sp. se define sólo por la incidencia dependiente del hospedador de la enfermedad y no existe información sobre las formas en que pueden surgir tales diferencias en la incidencia. En teoría, estas diferencias pueden ser causadas por un grupo de especies adaptadas al ambiente de los respectivos hospedadores (Steinbach y col., 2000). Uno de los problemas en el control de *S. dublin* es la existencia de portadores persistentemente infectados que portan la bacteria en los nódulos linfáticos y órganos internos (Hansen y col., 2006). Estos animales, aunque uno los vea sanos, excretan el patógeno en forma continua o intermitente durante años en su materia fecal y leche con el riesgo de infectar a otros animales y contaminar el medio ambiente.

Un número importante de investigadores han generado modelos experimentales de salmonelosis utilizando la ruta oral en terneros y empleando a *Salmonella dublin* (Smith y Jones, 1967; Forbes y col., 1977; Nazer y Osborne, 1977; Groothuis y col., 1981; Masalski y col., 1987; Segall y Lindberg, 1991; Wallis y col., 1995; Steinbach y col., 1996; Deignan y col., 2000; Paulin y col., 2002). En líneas generales, en aquellos modelos de infección oral en donde se utilizan bajas cargas del patógeno, los modelos son más irregulares y sólo ante una inoculación elevada del patógeno los mismos han mostrado cuadros típicos y una evolución predecible, constante y homogénea de la enfermedad. Así, Masalski y col. (1987) informaron que los terneros inoculados con 6.10^8 UFC no mostraron signos clínicos claros de enfermedad y tampoco dispersaron en forma regular al patógeno mientras que los terneros inoculados con 2.10^{10} hasta 4.10^{10} UFC presentaron un cuadro clínico típico, con una diseminación más regular de

bacterias a través de las descargas nasales y las heces. Teniendo en cuenta estos antecedentes, durante el diseño del ensayo se plantearon 2 posibles alternativas, ambas con debilidades y fortalezas. Por un lado, el modelo generado con bajas cargas del patógeno simularía mejor la situación real ocurrida en el campo y daría más oportunidad al inóculo experimental de BAL de mostrar sus propiedades benéficas pero generaría respuestas muy variables en los terneros y el efecto protector sería por eso más difícil de medir en un número reducido de animales. Por otro lado, la elevada concentración del patógeno generaría un modelo más homogéneo y por ello más adecuado para medir efectos benéficos (menor variabilidad) pero ante una concentración del patógeno irreal y requiriendo una contundente respuesta del inóculo de BAL para que el efecto protector pueda ser visto. De esta manera, el modelo de salmonelosis utilizado en este trabajo fue diseñado teniendo en cuenta estas referencias y la inoculación de 2.10^{10} UFC/animal generó un modelo regular y homogéneo de salmonelosis aunque demandó un alto nivel de exigencia al inóculo de BAL para poder contrarrestar el efecto del patógeno. Aunque es dificultoso tener precisiones acerca de la cantidad de *Salmonella* que los terneros ingieren comúnmente en una situación de campo es muy poco probable que las cargas bacterianas sean tan elevadas como las utilizadas en este ensayo. Es por ello que los resultados obtenidos en un modelo exigente de enfermedad tienen mayor relevancia y pronostican un mejor accionar como herramienta profiláctica ante el patógeno en una crianza habitual en la guachera del tambo.

Después de 10 días de tratamiento con el inóculo de BAL, y justo antes del desafío con el patógeno, la relación *Lactobacillus*/coliformes fue superior a 1 en todos los grupos experimentales aunque fue mucho mayor en los terneros suplementados con el inóculo de BAL. Además el número de *Lactobacillus* sp. en el G-C fue menor que en los grupos suplementados con el probiótico. Bajo estas condiciones ecológicas del tracto intestinal el patógeno fue introducido para generar la enfermedad infecciosa.

Los agentes patógenos bacterianos tienen propiedades biológicas únicas, que les permitan colonizar las superficies mucosas, penetrar en ellas, crecer en el hospedador, impedir o evitar las defensas del huésped y dañar al hospedador; los productos bacterianos responsables de estos cinco requisitos biológicos son los factores determinantes de la patogenicidad (determinantes de la virulencia) (Smith, 2000). El efecto del patógeno sobre los animales pudo verse a partir del día posterior a la

inoculación (2^{do} día de infección) en donde los terneros presentaron temperaturas elevadas, debilidad en el tren posterior y el consumo de agua notoriamente aumentado, aunque se mantenían alertas y con un buen estado mental. A partir del día siguiente y hasta el final del ensayo el síndrome febril se instaló definitivamente y los animales presentaron, además, diarrea, deshidratación y el morro y las extremidades frías. En general, la infección oral de los animales dio lugar a la invasión y la diseminación sistémica de las *Salmonella* utilizada. El patógeno fue detectado en materia fecal a partir de las 24 h post-infección. El promedio de la concentración de *Salmonella* en los órganos internos fue algo mayor que el del contenido de las secciones intestinales, en donde el recuento del patógeno fue similar tanto para el intestino delgado como para el grueso. En términos generales, la bibliografía cita que 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 a una reacción proliferativa en el fondo de las criptas (enteritis regenerativa). El ciclo 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 de la submucosa 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 nódulos linfáticos mesentéricos, el hígado y el bazo (Jubb y col., 1988; Tizard, 1996; Robbins, 2000).

El patógeno fue detectado en el medio interno (sangre) de los terneros a las 4 h post-infección mientras que las lesiones intestinales fueron encontradas a las 32 h post-inoculación del patógeno. Bolton y col (1999) no pudieron llevar a cabo un estudio basado en el tiempo para medir la velocidad de la invasión inicial pero evaluaron que la invasividad de *S. dublin* fue claramente subestimada porque desde las 3 horas había pruebas del daño tisular inducido por *S. dublin* en el epitelio asociado al folículo linfoideo del intestino de los bovinos. El hígado, bazo y nódulos linfáticos mesentérico e ileocecal (órganos diana) fueron los órganos en los que se encontró al patógeno con

mayor frecuencia mostrando que *Salmonella* utilizó tanto la vía linfática como la sanguínea para su ingreso y multiplicación. Estos órganos diana también fueron los que mayores lesiones poseían. El ILMicro fue más sensible que el ILMacro para caracterizar las lesiones presentadas por los terneros y el ILMicro de los órganos diana fue útil para encontrar las diferencias generadas por el inóculo en la respuesta de los terneros ante la agresión del patógeno. Las lesiones encontradas en el hígado y el bazo se consideran aquí en conjunto porque son dos de los órganos diana donde suelen aparecer lesiones específicas. En el caso del hígado lo regular en los casos de campo es la presencia de una severa colangiohepatitis con fuerte infiltración mixta en el espacio porta y particularmente en el canalículo biliar con estasis biliar canalicular, gran desorden estructural en el lobulillo con sinusoides hiperémicos, dilatados y con invasión celular sinusoidal. Con alta regularidad aparecen los NPT dentro del lobulillos con una distribución errática dentro del mismo. En pocos casos la lesión necrótica no está presente pero aparece de modo llamativo la denominada “tromboembolia” de la vena centro lobulillar por la formación de un coágulo de fibrina intravascular que engloba a PMN piógenos. El bazo regularmente muestra una esplenitis hemorrágica severa con focos de NPT aleatoriamente distribuidos especialmente en la pulpa roja (Jubb y col., 1988; Tizard, 1996; Robbins, 2000). Considerando las lesiones encontradas en el hígado y el bazo en los animales de este ensayo se podría afirmar que las mismas tuvieron una participación prácticamente nula en todos los grupos experimentales mostrando lesiones leves y no patognomónicas (sin NPT). Esto estuvo en un todo de acuerdo con el IPE encontrado en los terneros, el cual fue similar al reportado en 2 de los ensayos de esta tesis en los que no se utilizó al patógeno. Las lesiones encontradas en el yeyuno fueron más moderadas que las encontradas en los casos de campo y en los grupos inoculados con BAL fueron leves y no patognomónicas si se tiene en cuenta que se ha hecho una descarga importante de *Salmonella*. En los casos de campo, las lesiones del íleon corresponden a una necrosis fibrinonecrotica y una eventual presencia de los NPT. Los resultados de la prueba muestran sólo necrosis en los terneros del G-C mientras que en los grupos inoculados con probióticos durante toda la serie de necropsias las lesiones fueron de poca importancia. La VIC es, en los casos de campo, uno de los órganos diana para el diagnóstico por lesiones histopatológicas de la infección, al igual que su nódulo linfático regional. Las lesiones en la VIC fueron típicas y tempranas en los animales del

G-C donde se encontró sólo necrosis en las primeras necropsias y necrosis con NPT en las últimas. Por otra parte, los resultados en el G-BAL-L fueron alentadores pues sólo se encontraron lesiones leves. Además, en el colon de todos los terneros tratados con el inóculo de BAL las lesiones fueron de tipo leve teniendo en cuenta la concentración de *Salmonella* utilizada. Las lesiones en los nódulos linfáticos mesentéricos en los casos de campo dependen especialmente de la agresividad de la cepa y del tiempo del proceso. Generalmente con cepas poco agresivas y con un curso de varios días las lesiones sólo son de tipo hemorrágico. Cuando la cepa es muy virulenta y el proceso es hiperagudo a menudo es el único órgano en el que se encuentran NPT (estando ausentes en el hígado y el bazo). En estos casos los nódulos se forman en el seno subcapsular como un manto más o menos continuo de células necróticas con PMN piógenos en una malla de fibrina (Jubb y col., 1988; Tizard, 1996; Robbins, 2000). En esta experiencia, en los grupos tratados con el inóculo de BAL la aparición del tipo de lesión encontrada fue siempre más tardía que en los animales del G-C y esto se debería correlacionar con lo encontrado en el yeyuno e íleon que son los sectores que drenan estos nódulos linfáticos. En el nódulo linfático ileocecal las lesiones encontradas en los casos de campo son más constantes siendo a veces el único órgano que muestra lesiones completas, especialmente en los casos hiperagudos. En esta experiencia, en los grupos tratados con el inóculo de BAL la aparición del tipo de lesión encontrada fue siempre más tardía que en los animales del G-C. En el caso del nódulo linfático mediastínico el nivel de lesión está en íntima relación con el grado de lesión septicémica pulmonar. El pulmón en los casos de campo generalmente se encuentra muy afectado especialmente por la septicemia con lesiones de neumonía intersticial generalizada y grave que, por el breve tiempo que llega a vivir el animal, rara vez llega a la hepatización gris o leucocitaria, quedándose en el modelo rojo o hemorrágico. Muchas veces la muerte del animal se produce por un fallo respiratorio grave (Jubb y col., 1988; Tizard, 1996; Robbins, 2000). Los resultados encontrados muestran que en los terneros de la experiencia el tipo de lesión encontrado sólo se limitó a una alveolitis. El término alveolitis se utiliza en patología para designar un proceso inflamatorio que sólo afecta la pared del tabique alveolar con edema del mismo junto a hiperemia de sus vasos. Puede aparecer algún exudado seroso en el interior del alvéolo junto a algunos macrófagos libres en el mismo. Esta lesión es leve, generalmente asintomática a diferencia de la

neumonía intersticial dónde la reacción inflamatoria lesiona gravemente a los tabiques alveolares, al epitelio alveolar funcional y a los tabiques interlobulillares. En el interior del alvéolo hay un exudado inicialmente edematoso con participación de fibrina, hasta la eritrodipádesis intraalveolar (modelo rojo o hemorrágico) o la leucodipádesis (modelo gris o purulento). Esto se debe a que el agente ingresa por vía sanguínea y compromete prácticamente a todo el lobulillo. La signología es la de una dificultad respiratoria evidente. No hay casi participación bronquial, salvo que el proceso sea de curso largo (más de siete días) donde pueden aparecer lesiones provocadas por bacterias oportunistas ingresadas por la vía aerógena que dan peribronquitis y bronquitis purulenta con posterior necrosis bronquial y formación de microabscesos (Jubb y col., 1988; Tizard, 1996; Robbins, 2000).

Aunque algunos de los terneros comenzaron a presentar debilidad en el tren posterior a partir de las 24 h post-inoculación, los animales desarrollaron enfermedad clínica a partir de las 36 h de inoculado el patógeno, momento en el cual alcanzaron una temperatura rectal de 40,5 °C. No obstante, a partir de las 48 h post-inoculación los terneros presentaron extremidades y morro frío y niveles de deshidratación importantes junto a la presencia de diarreas. Previo a ello, los animales aumentaron sustancialmente el consumo de agua. A pesar de los signos manifiestos de enfermedad los animales permanecieron alertas y con un buen estado mental durante todo el ensayo. Los datos de laboratorio relevantes que se obtuvieron a la par de estos signos clínicos mostraron niveles de neutrófilos en banda superiores a los normales al día siguiente de la inoculación del patógeno, y hasta el final del ensayo, junto a la aparición en sangre de células inmaduras como mielocitos y metamielocitos, que en condiciones normales no están presentes. Mientras que los neutrófilos y los monocitos sólo superaron los valores normales al día siguiente de la inoculación del patógeno los linfocitos permanecieron dentro de los valores normales hasta el día posterior al ingreso del patógeno, momento en el que disminuyeron hasta valores subnormales durante los días 13 y 14 del experimento. Esa misma disminución al final del ensayo fue evidenciada en los monocitos. Los resultados obtenidos muestran que el patógeno fue responsable de generar una fuerte disminución en los leucocitos mononucleares a partir del segundo día de la infección. Por otra parte, los resultados obtenidos en la serie eritrocítica

permanecieron dentro de los valores normales durante todo el ensayo (Dubreuil y Lapierre, 1997; Knowles y col., 2000; Mohri y col., 2007).

Los resultados muestran que, a pesar de la alta carga de *Salmonella* recibida por los terneros no hubo translocación al medio interno por parte del inóculo probiótico. Este hallazgo brinda una base sólida a la hora de evaluar la seguridad de las cepas utilizadas y confirma la inocuidad de las mismas. La translocación de otros grupos bacterianos ocurrió en todos los grupos experimentales en una intensidad superior a la encontrada en terneros que no fueron infectados en forma experimental como los estudiados en el primer ensayo de este trabajo de tesis. Estos resultados indican que, aunque la misma no fue inhibida por el tratamiento probiótico tampoco fue generada por el mismo y que el inóculo probiótico no fue responsable de la translocación de las poblaciones microbianas estudiadas. Además, es evidente que el quiebre del efecto barrera de la mucosa intestinal generado por el patógeno facilitó el ingreso de algunas poblaciones intestinales que en una situación de no-enfermedad sólo se hace evidente mostrando moderados niveles de translocación al medio interno.

Las cargas microbianas encontradas en las diferentes regiones intestinales fueron menores que las halladas en los órganos del medio interno cuando se analizó el patógeno utilizado. Sin embargo, cuando se tuvo en cuenta el resto de las poblaciones microbianas estudiadas se pudo apreciar que las mismas mostraron niveles superiores en el intestino que en el medio interno. De todas formas se pudo apreciar cierta afinidad de algunas poblaciones a translocar en situaciones extremas de desbalance intestinal generado por el patógeno. Así, mientras los coliformes mostraron niveles importantes en el medio interno, los *Lactobacillus* indígenas, que fueron encontrados en muy baja frecuencia (solamente en los grupos tratados con probióticos), manifestaron escasa intención por ingresar al medio interno en una situación de total disrupción del efecto barrera generado por la mucosa intestinal. Los *Enterococcus* ocuparon una posición intermedia entre las dos poblaciones mencionadas. En esta situación, los integrantes del inóculo no fueron detectados en el medio interno a lo largo de la infección por *Salmonella dublin*.

Los animales sometidos a un desafío externo o interno en su estado de salud generan una respuesta vigorosa activando tanto el sistema inmune innato como el adquirido y, este último, conduce finalmente al desarrollo de una respuesta inmune específica celular

y humoral, pero en el momento del desafío inicial la supervivencia del hospedador depende de la capacidad de la respuesta innata para luchar contra la causa de la enfermedad (Eckersall, 2000). Entre los sistemas evolucionados para contribuir a esta respuesta inmune innata no específica existen una variedad de reacciones de la respuesta de la fase aguda, que abarcan una amplia gama de respuestas patofisiológicas tales como la fiebre, la leucocitosis, las alteraciones hormonales, los oligoelementos del suero y la depleción de las proteínas musculares que se combinan para minimizar los daños al tiempo que mejora el proceso de reparación (Eckersall, 2000). Estas respuestas sistémicas a la enfermedad están acompañadas por un aumento en las concentraciones circulantes de una serie de proteínas plasmáticas que se conocen colectivamente como las proteínas de fase aguda (Godson y col, 1996; Eckersall, 2000). Aunque algunos de los parámetros hematológicos respondieron evidenciando la infección durante la etapa muy temprana, los parámetros bioquímicos convencionales no fueron lo suficientemente sensibles para evidenciarla y por ello no brindaron información relevante. Así, los resultados obtenidos tanto en los niveles de todas las enzimas hepáticas estudiadas, como en la bilirrubina, la urea, la creatinina y el fibrinógeno se encontraron dentro de los valores normales durante todo el experimento mostrando que no son útiles para estudiar la evolución de esta enfermedad durante procesos sobreagudos. Sin embargo, la haptoglobina resultó ser un indicador muy adecuado para evaluar la enfermedad durante su progreso debido a su alta sensibilidad (Deignan y col., 2000). En el presente estudio, la haptoglobina mostró un pico de concentración 2 días después de inoculado el patógeno y, como la misma refleja el grado de severidad de la infección, es posible que en los grupos inoculados con las BAL ese nivel de severidad haya sido menor pues la concentración de haptoglobina fue inferior en los animales tratados con el probiótico. Las proteínas de la fase aguda como la haptoglobina, el amiloide A sérico y la proteína C-reactiva, son proteínas plasmáticas que aumentan su concentración después de la infección, la inflamación o el trauma (Eckersall, 2000). Estas cumplen una serie de funciones específicas de defensa durante la reacción de fase aguda en las primeras etapas de la infección o la inflamación y después de un daño tisular; así la haptoglobina es una proteína que capta la hemoglobina libre de la circulación (Alsemgeest y col., 1995) para evitar los daños renales. La cuantificación de su concentración en el plasma o suero puede proporcionar información diagnóstica

valiosa en la detección, pronóstico y seguimiento de una enfermedad (Eckersall, 2000). La concentración plasmática de algunas de estas proteínas puede aumentar hasta 1000 veces y la magnitud de este aumento es altamente dependiente de las especies. Por ejemplo, la proteína C reactiva es una importante proteína de fase aguda en los seres humanos, pero no en el ganado vacuno. En los bovinos la concentración plasmática de haptoglobina cambia mucho durante la reacción de fase aguda (Alsemgeest y col., 1995). El análisis de las proteínas de la fase aguda se está convirtiendo en un procedimiento común en las investigaciones clínicas y experimentales de las enfermedades infecciosas en animales de granja y de compañía porque proporciona un medio para estimar el efecto combinado de la estimulación de citoquinas proinflamatorias en las funciones sistémicas (Eckersall, 2000).

La administración del inóculo probiótico no ha sido totalmente eficiente para contrarrestar la infección de la cepa *Salmonella dublin* para la concentración administrada. Aunque el tratamiento probiótico no fue capaz de posponer la llegada del patógeno a los órganos diana fue evidente que el inóculo modificó la respuesta de los animales ante el ataque del patógeno porque la menor severidad en el nivel de infección indicada por niveles menores de haptoglobina fue acompañada por lesiones microscópicas más leves en el grupo tratado con lactosa y BAL. Es poco probable que ello esté relacionado con un retraso en la colonización de las diferentes porciones intestinales o en una interferencia en la translocación del patógeno porque los niveles encontrados en esos lugares fueron similares entre grupos experimentales. Los nuevos trabajos deberían contemplar en su diseño la búsqueda de los mecanismos mediante los cuales estos agentes bioterapéuticos logran su efecto para tener un conocimiento más acabado de la respuesta mejorada de los terneros tratados con el inóculo probiótico.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

6.1. Efecto de la suplementación con tres bacterias ácido lácticas de origen bovino sobre la translocación bacteriana, la toxicidad oral aguda, la colonización intestinal, la performance de crecimiento y el estado sanitario

El inóculo utilizado no interfirió en el crecimiento de los animales y no produjo casos de diarrea en una etapa crítica del desarrollo de los terneros. Como no hubo casos de diarreas en ambos lotes no se pudo comprobar algún efecto favorable del inóculo ante esta situación. Es necesario realizar nuevas experiencias en donde se evalúe en detalle la performance del inóculo ante un desafío con patógenos productores de diarrea. El principal hallazgo de este estudio fue que el inóculo de bacterias ácido lácticas de origen bovino era capaz de superar las barreras biológicas del tracto gastrointestinal, alojarse y permanecer en el intestino de los terneros sin translocar a los órganos del medio interno. La generación de mutantes resistentes a rifampicina facilitó la enumeración y aislamiento de los integrantes del inóculo y permitió diferenciarlo fácilmente de la microbiota indígena intestinal. Además, permitió verificar la ausencia del inóculo en los sitios extraintestinales. La administración del inóculo no produjo efectos adversos sobre el estado de salud general, el crecimiento y el desarrollo de los animales del experimento, lo cual demostró la inexistencia de toxicidad oral aguda. La ausencia de diarrea y la sobrevivencia normal de los individuos, junto a la ausencia de translocación al medio interno por parte de los microorganismos utilizados, sugieren que las cepas utilizadas no son patogénicas y probablemente sean seguras para ser utilizadas como aditivo alimentario en la dieta de los terneros. Por su origen bovino es posible utilizar este microorganismo como un probiótico, aunque deberían hacerse estudios posteriores para comprobar su efectividad para controlar patógenos bacterianos.

La utilización del inóculo, en las condiciones que se realizó el experimento, no tuvo influencia sobre la performance de crecimiento. Es posible que el excelente estado sanitario en que se encontraban los animales y la ausencia de condiciones estresantes durante la crianza hayan impedido al inóculo expresar sus efectos benéficos. De todas maneras, este inóculo microbiano de origen bovino podría actuar como un antagonista una vez instalado en el intestino y por ello sería interesante investigar el efecto del tratamiento probiótico sobre la colonización y translocación de un patógeno primario

causante de enfermedad en los terneros jóvenes para verificar el posible efecto protector del mismo. Además, se debería determinar con precisión un intervalo máximo entre inoculaciones que permitan mantener una carga bacteriana razonable y la permanencia de los microorganismos en el tracto gastrointestinal después de finalizado el tratamiento. Aunque habría que hacer pruebas específicas, el inóculo utilizado manifestó cierto grado de inocuidad al no producir reacciones adversas desde el punto de vista clínico.

6.2. Influencia del inóculo de BAL y el suero de queso sobre la performance de crecimiento y el estado sanitario de los terneros

Muchos de los problemas afines a la performance de los terneros jóvenes están directamente relacionados con los fallos en la digestión y la absorción de los nutrientes ocasionados por las bacterias patógenas productoras de diarreas. Sin embargo, la diarrea de tipo nutricional es la que frecuentemente antecede y predispone al ternero al síndrome de diarrea generado por microorganismos patógenos. El inóculo microbiano se puso a prueba en un modelo experimental diseñado para que los terneros jóvenes, alimentados con sustituto lácteo y una alta cantidad de suero de queso, estuvieran más expuestos a desbalances a nivel intestinal. En este contexto, los microorganismos que integraron el inóculo demostraron su accionar benéfico y podrían utilizarse para prevenir algunos tipos de diarrea de origen nutricional. La única variable que se modificó entre los grupos fue la incorporación del inóculo microbiano en la dieta de los terneros tratados. Es evidente que los microorganismos que integran el inóculo modificaron, de alguna manera, los patrones del flujo de nutrientes en el intestino, lo cual tuvo efectos benéficos sobre la utilización del alimento por parte de los animales. Los terneros inoculados habrían aprovechado mejor la lactosa y las proteínas del suero de queso, lo cual se manifestó con una mejor performance de crecimiento. Esta observación justifica el empleo del inóculo junto al suero de queso durante la crianza de los terneros destetados tempranamente. Es necesario realizar nuevas experiencias en donde se evalúen, en detalle, los efectos del inóculo junto a la lactosa frente a un desafío con patógenos primarios productores de diarrea.

6.3. Incorporación de bacterias ácido lácticas y lactosa a la dieta de terneros jóvenes y su efecto sobre la performance de crecimiento y el balance microbiano intestinal

En los experimentos realizados se determinó que el inóculo utilizado es capaz de adherirse y permanecer en el tracto gastrointestinal. Estos son parámetros adecuados para medir la potencial actividad probiótica de las cepas. La utilización del inóculo mejoró la performance de crecimiento de los terneros y contribuyó positivamente sobre el estado sanitario al disminuir el índice de consistencia fecal. Además, manifestó inocuidad al no producir reacciones adversas desde el punto de vista clínico. El inóculo probiótico aumentó la expresión de IgA en el yeyuno de los terneros; esta estimulación del sistema inmune podría jugar un papel esencial en la protección de los animales contra enfermedades intestinales. La utilización del inóculo junto a la lactosa produjo mejoras en la performance de crecimiento (diferencias en los pesos y en la conversión alimenticia). El inóculo microbiano fue capaz de mantener una carga microbiana estable de *Lactobacillus* spp. y la lactosa mantuvo estable los recuentos de esta población microbiana en una etapa crítica del desarrollo de los animales. La utilización de ambas herramientas puede contribuir a mejorar el estado sanitario en la crianza de los terneros.

6.4. Incorporación de bacterias ácido lácticas y lactosa a la dieta de terneros jóvenes y su efecto sobre la colonización intestinal de *Salmonella dublin* DSPV 595T y la invasión a los órganos internos de terneros alimentados con sustituto lácteo

La administración del inóculo probiótico no ha sido totalmente eficiente para contrarrestar la infección de la cepa *Salmonella dublin* para la concentración administrada, no obstante es importante resaltar los siguientes aspectos: 1-El inóculo probiótico no interferiría en el mecanismo de ingreso del patógeno al medio interno. 2-El porcentaje de lesiones completas presentes en toda la serie de necropsias ha sido siempre menor en los grupos tratados y especialmente en el grupo de probióticos más lactosa. 3-La severidad en el nivel de infección, indicada por la menor concentración de haptoglobina, fue menor en los animales suplementados con probióticos. 4-La aparición de las lesiones, al momento de realizar las necropsias, se ve claramente diferenciada; mientras que en el grupo control surgen a las pocas horas de la infección y son

constantes; en los animales inoculados con el probiótico son más tardías e inconstantes y, además, son de menor intensidad en el grupo de probiótico más lactosa. 5-El inóculo probiótico estaría demostrando capacidad para modificar la respuesta de los individuos ante la agresión del patógeno, a pesar de la alta dosis de *Salmonella* recibida.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdala, A.A.; Zimmerman, G.; Calvinho, L.F.; Gianre, V.R.; Vottero, D.; Andreo, N.; Quaino, O. y Fernández, F. (2001) Evaluación de la eficacia de un probiótico incorporado a un sustituto lácteo y a leche entera, en la crianza de terneros. *Rev. Med. Vet.* 83: 196-198.
- Abe, F.; Ishibashi, N. y 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. y 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. 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.
- Alsemgeest, S.P.M.; Jonker, F.H.; Taverne, M.A.M.; Kalsbeek, H.C.; Wensing, Th. y Gruysl, E. (1995) Serum amyloid-a (SAA) and Haptoglobin (HP) plasma concentrations in newborn calves. *Theriogenology* 43: 381-387.
- Allori, C.; Agüero, G.; Ruiz-Holgado, De A.P.; Nader, De O.M. y 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.
- Atkinson, R.L.; Kratzer, F.H. y Stewart, G.F. (1957) Lactose in animal and human feeding: a review. *J. Dairy Sci.* 40: 1114-1132.
- Bechman, T.J.; Chambers, J.V. y Cunningham M.D. (1977) Influence of *Lactobacillus acidophilus* on the performance of young calves. *J. Dairy Sci.* 61(Suppl. 1): 74.
- Bengmarck, S. (1998) Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut* 42: 2-7.
- Berg, R.D. (1995) Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends Microbiol.* 3: 149-154.
- Berg, R.D. (1996) The indigenous gastrointestinal microbiota. *Trends Microbiol.* 4: 430-435.
- Blood, D.C., Henderson, S.A. y Radostits, O.M. (1986) *Medicina Veterinaria*. 6a. ed., Ed. Interamericana, México. pp. 58.

- Blum, S.; Álvarez, S.; Haller, D.; Pérez, P. y 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.
- Brackelsberg, C.A.; Nolan, L.K. y 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. y 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.
- Butler, J.E.; Winter, A.J. y Wagner, G.G. (1971) Symposium: Bovine immune system. *J. Dairy Sci.* 54: 1309-1340.
- Butler, J.E.; Sinkora, M.; Wertz, N.; Holtmeier, W. y Lemke, C.D. (2006) Development of the neonatal B and T cell repertoire in swine: implications for comparative and veterinary immunology. *Vet. Res.* 37: 417-441.
- Casas, I.A.; Edens, F.W. y 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.
- Collins, F.M. y Carter, P.B. (1978) Growth of salmonellae in orally infected germfree mice. *Infect. Immun.* 21: 41-47.
- Collins, J.K.; Thornton, G. y Sullivan, G.O. (1998) Selection of probiotic strains for human applications. *Int. Dairy J.* 8: 487-490.
- Council Directive 70/524/EEC. (1988) Additives linked to a person responsible for putting them into circulation and authorized on a provisional basis. Annex B.
- Cruywagen, C.W.; Jordaan, I. y 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.
- Davis, C.L. y Drackley, J.K. (2001) Desarrollo, nutrición y manejo del ternero joven. Intermédica, Buenos Aires.
- Deignan, T.; Alwan, A.; Kelly, J.; McNair, J.; Warren, T. y O'Farrelly, C. (2000) Serum haptoglobin: an objective indicator of experimentally-induced *Salmonella* infection in calves. *Res. Vet. Sci.* 69: 153-158.
- 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. y 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.
- Dubos, R.J y Schaedler, 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.
- Dubreuil, P y Lapierre, H. (1997) Biochemistry reference values for Quebec lactating dairy cows, nursing sows, growing pigs and calves. *Can. J. Vet. Res.* 61: 235-239.
- 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. y 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.
- Eckersall, P.D. (2000) Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Revue Méd. Vét.* 151: 577-584.
- Ellinger, D.K.; Muller, L.D. y Glantz P.J. (1980) Influence of feeding fermented colostrum and *Lactobacillus acidophilus* on fecal flora of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 63: 478-482.
- European Commision (2003) Opinion on the use of certain micro-organisms as additives in feedingstuffs. p 1-8.
- 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.
- FASS (Federation of Animal Science Societies) (1998) Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching. First rev. ed. Savoy IL: Federation of Animal Science Societies. pp. 80-84.
- Fischer, J.E. y Sutton, T.S. (1949) Effects of lactose on gastrointestinal motility: a review. *J. Dairy Sci.* 32: 139-162.
- Flipse, R.J.; Huffman, C.F.; Webster, H.D. y Duncan, C.W. (1950a) Carbohydrate utilization in the young calf. I. Nutritive value of glucose, corn syrup and lactose as carbohydrate sources in synthetic milk. *J. Dairy Sci.* 33: 548-556.
- Flipse, R.J.; Huffman, C. F.; Duncan, C.W. y Webster, H.D. (1950b) Carbohydrate utilization in the young calf. II. The nutritive value of starch and the effect of lactose on the nutritive values of starch and corn syrup in synthetic milk. *J. Dairy Sci.* 33: 557-564.
- Fooks, L.J.; Fuller, R. y Gibson, G.R. (1999) Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *Int. Dairy J.* 9: 53-61.
- Forbes, D.; Oakley, G.A. y Mackenzie, J.A. (1977) Experimental *Salmonella dublin* infection in calves. *Vet. Rec.* 101: 220-224.
- Fox, S.M. (1988) Probiotics: intestinal inoculants for production animals. *Vet. Med.-US* 83: 806-810.
- Frizzo, L.S.; Peralta, C.; Zbrun, V.; Bertozzi, E.; Soto, L.; Marti, E.; Dalla Santina, R.; Sequeira, G. y 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. y 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: 69-80.
- Frizzo, L.S.; Zbrun, M.V.; Bertozzi, E.; Soto, L.P.; Sequeira, G.; Martí E.; Lajmanovich, R. y Rosmini, M.R. (2007) *Lactobacillus casei* DSPV 318T

- capacity to colonize and remain in mouse gastrointestinal tract. *J. Anim. Vet. Adv.* 6: 1158-1166.
- 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 y Hall, pp. 1-8.
- Fuller, R. (1997) Introduction. En Fuller (Ed.) *Probiotics 2: Applications and practical aspects*, Londres, Chapman y 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. y 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. y Hugas, M. (1998) Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. *J. Appl. Microbiol.* 84: 125-132.
- Gibson, G.R. y 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.; Rutherford, K.J. y Cross, M.L. (2001) Protection against translocating *Salmonella typhimurium* infection in mice by feeding the immunoenhancing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* strain HN001. *Med. Microbiol. Immunol.* 190: 97-104.
- Gilliland, S.E.; Bruce, B.B.; Bush, L.J. y Staley, T.E. (1980) Comparison of two strains of *Lactobacillus acidophilus* as dietary adjuncts for young calves. *J. Dairy Sci.* 63: 964-972.
- Godson, D.L.; Campos, M.; Attah-Poku, S.K.; Redmond, M.J.; Cordeiro, D.M., Sethi, M.S.; Harland, R.J. y Babiuk, L.A. (1996) Serum haptoglobin as an indicator of the acute phase response in bovine respiratory disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 51: 277-292.
- Goldin, B.R. y Gorbach, S.L. (1992) Probiotics for humans. En Fuller (Ed.) *Probiotics, The Scientific Basis*. Londres, Chapman y Hall, pp. 355-376.
- Gonçalves G.D.; Dos Santos G.T.; Rigolon L.P.; Damasceno J.C.; Ribas N.P.; Rodríguez Da Veiga D. y Martins E.N. (2000) Influência da adição de probióticos

- na dieta sobre o estado sanitário e desempenho de bezerros da raça Holandesa. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. v.37 n.1 São Paulo. Vers. elec.. en: www.scielo.org
- Gotcheva, V.; Hristozova, E.; Hristozova, T.; Guo, M.; Roshkova, Z. y Angelov, A. (2002) Assessment of potential probiotic properties of lactic acid bacteria and yeast strains. Food Biotechnol. 16: 211-225.
- Groothuis, D.G.; Van Miert, A.S. y Schotman, A.J. (1981) Zinc concentration in plasma during experimental *Salmonella dublin* infection and endotoxin induced fever in calves. Vet. Rec. 109: 176-177.
- Gusils, C.; Bujazha, M. y González, S. (2002) Preliminary studies to design a probiotic for use in swine feed. Interciencia 27: 409-413.
- Hansen, K.R.; Nielsen L.R. y Lind, P. (2006) Use of IgG avidity ELISA to differentiate acute from persistent infection with *Salmonella* Dublin in cattle. J. Appl. Microbiol. 100: 144-152.
- Hatch, R.C.; Thomas, R.O. y Thayne, W.V. (1973) Effect of adding *Bacillus acidophilus* to milk fed to baby calves. J. Dairy Sci. 56 (Suppl. 1): 682.
- Havenaar, R.; Ten Brink, B. y Huis In 'T Veld, J.H.J. (1992) Selection of strains for probiotic use. En Fuller, R. (Ed.) Probiotics, The Scientific Basis. Londres, Chapman y Hall, pp. 209-224.
- Heinrichs, A.J.; Jones, C.M.; Elizondo-Salazar, J.A. y Terrill S.J. (2009) Effects of a prebiotic supplement on health of neonatal dairy calves. Livest. Sci. 125: 149-154.
- Heyman, M. y Ménard, S. (2002) Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology. CMLS. Cell. Mol. Life Sci. 59: 1151-1165.
- Higginbotham, G.E. y Bath, D.L. (1993) Evaluation of *Lactobacillus* fermentation cultures in calf feeding systems. J. Dairy Sci. 76: 615-620.
- Holzapfel, W.H.; Haberer, P.; Snel, J.; Schillinger, U. y 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 y Hall. pp. 182-185.
- Hudault, S.; Ducluzeau, R.; Dubos, F.; Raibaud, P.; Ghnassia, J.C. y 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, p. 75-82.
- Hudault, S.; Liévin, V.; Bernet-Camard, M.F. y 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.
- Ishihara, N.; Chu, D.C.; Akachi, S. y Jujena, L.R. (2001) Improvement of intestinal microflora balance and prevention of digestive and respiratory organ diseases in calves by green tea extracts. Livest. Prod. Sci. 68: 217-229.
- Isolauri, E.; Juntunen, M.; Rautanen, T.; Sillanaukee, P. y Koivula, T. (1991) Human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus* GG) promotes recovery from acute diarrhoea in children. Pediatrics 88: 90-97.
- Isolauri, E.; Salminen, S. y 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. y 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. y Hartman, D.A. (1984) Calf mortality in Virginia dairy herd improvements herds. J. Dairy Sci. 67: 908-918.
- Jaster, E.H.; McCoy G.C. y Fernando, R.L. (1990) Dietary fat in milk or milk replacers for dairy calves raised during the winter. J. Dairy Sci. 73: 1843-1850.
- Jenny, B.F.; Vandijk, H.J. y 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. y 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.

- Jonsson, E. (1985) Lactobacilli as probiotics to pigs and calves. A microbiological approach. Doctoral Thesis. Department of Animal Nutrition and Management. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala.
- Jonsson, E. y Olsson, I. (1985) The effect of performance, health and faecal microflora of feeding *Lactobacillus* strains to neonatal calves. Swedish J. Agric. Res. 15: 71-76.
- Jubb, K.V.F.; Kennedy, P.C. y Palmer, N. (1988) Patología de los animales domésticos. 3e. Montevideo, Hemisferio Sur.
- Karney, T.L.; Jonson, M.C. y Ray, B. (1986) Changes in the lactobacilli and coliform populations in the intestinal contents of calves from birth to weaning. J. Anim. Sci. 63 (Suppl. 1): 446-447.
- Klaenhammer, T.R. (1988) Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie 70: 337-349.
- Knowles, T.G.; Edwards, J.E.; Bazeley, K.J.; Brown, S.N.; Butterworth, A. y Warriss, R.D. (2000) Changes in the blood biochemical and haematological profile of neonatal calves with age. Vet. Rec. 147: 593-598.
- 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.
- Kurzak, P.; Ehrmann, M.A. y 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.
- Lebedev, K.A. y Ponyakina, I.D. (2006) Immunophysiology of epithelial cells and pattern-recognition receptors. Hum. Physiol. 32: 224-234.
- Lee, D.J.; Drongowski, R.A.; Coran, A.G. y Harmon, C.M. (2000) Evaluation of probiotic treatment in a neonatal animal model. Pediatr. Surg. Int. 16: 237-242.
- Lilly, D.M. y Stillwell, R.H. (1965) Probiotics growth promoting factors produced by microorganisms. Science 147: 747-748.
- Lloyd, A.B.; Cumming, R.B. y 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.

- Locascio, M.; de Ruiz Holgado, A.P.; Perdigón, G. y Oliver, G. (2001) Enteric bifidobacteria: isolation from human infants and challenge studies in mice. *Can. J. Microbiol.* 47: 1048-1052.
- Lukás, F.; Koppová, I.; Kudrna, V. y Kopečný, J. (2007) Postnatal development of bacterial population in the gastrointestinal tract of calves. *Folia Microbiol.* 52: 99-104.
- McCracken, V.J. y Lorenz R.G. (2001) The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cell. Microbiol.* 3: 1-11.
- Maia, O.B.; Duarte, R.; Silva, A.M.; Cara, D.C. y 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.
- Marteau, P.; Minekus, M.; Havenaar, R. y 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.
- Matsuzaki, M.; Takizawa, S. y Ogawa, M. (1997) Plasma insulin, metabolite concentrations, and carcass characteristics of Japanese Black, Japanese Brown, and Holstein Steers. *J. Anim. Sci.* 75: 3287-3293.
- Masalski, N.; Belchev, D.; Dimitrov, A.; Kaloianov, I. y Kolev, V. (1987) Experimental *Salmonella dublin* infection in calves. *Vet Med Nauki.* 24: 3-10. Abstract en Inglés.
- McDonough, P.L.; Fogelman, D.; Shin, S.J.; Brunner, M.A. y 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. y Fedorka-Cray, P.J. (2002) Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin. Infect. Dis.* 34(Suppl 3): S93-S106.
- Metchnikoff, E. (1903) Estudios acerca de la naturaleza humana. Editorial Americalee, Buenos Aires.
- Metchnikoff, E. (1906) Ensayos optimistas. Editor Orientación Integral Humana, Buenos Aires.

- Meyer, P.M.; Vaz Pires, A.; Vagadlo, A.R.; Correia De Simas, J.M. y 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. y 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. (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.
- Mohri, M.; Sharifi, K. y Eidi, S. (2007) Hematology and serum biochemistry of Holstein dairy calves: age related changes and comparison with blood composition in adults. *Res. Vet. Sci.* 83: 30-39.
- Monti, G. y Tarabla, H.D. (1999) Efecto de la suplementación con una formulación comercial de probióticos, sobre la incidencia de diarreas y ganancia de peso corporal de terneros Holando Argentino. *Vet. Arg.* 16: 97-101.
- Mordenti, A. (1986) Probiotics and new aspects of grow promoters in pig production. *Informatore Zootecnico* 32: 69-72.
- Morrill, J.L.; Dayton, A.D. y Mickelsen R. (1977) Cultured milk and antibiotics for young calves. *J. Dairy Sci.* 60: 1105-1109.
- Morrill, J.L.; Morrill, Z.J.M.; Feyerherm, A.M. y Lasters J.F. (1995) Plasma proteins and a probiotic as ingredients in milk replacer. *J. Dairy Sci.* 78: 902-907.
- Moura, L.N.; Neumann, E.; Vieira, L.Q. y 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. y 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 y Hall, pp. 187-207.
- Nazer, A.H. y Osborne, A.D. (1977) Experimental *Salmonella dublin* infection in calves. *Br. Vet. J.* 133: 388-398.

- Nousiainen, J. y 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.
- Novik, G.I.; Samartsev, A.A.; Astapovich, N.I.; Kavrus, M.A. y Mikhalyuk, A.N. (2006) Biological activity of probiotic microorganisms. Appl. Biochem. Microbiol. 42: 166-172.
- Odeón, A.C. (2001) Diarrea neonatal de los terneros. Etiopatogenia, tratamiento y control.
http://www.inta.gov.ar/barcarce/info/documentos/ganadería/bovinos/sanidad/enf_dig/diarreaneon.htm
- Oropeza Aguilar, M.I.; Posadas Manzano, E.; Cervantes Sánchez, J.M. y Ortiz Naranjo, O. (1998) Prevención de afecciones gastrointestinales mediante el uso de probióticos en becerros Holstein lactantes. Veterinaria México. 29: 197-201.
- Ortigue, I.; Martin, C. y Durand, D. (1996) Circadian changes in net nutrient fluxes across the portal-drained viscera, the liver and the hindquarters in preruminant calves. J. Anim. Sci. 74: 895-907.
- Ortigue-Marty, I.; Hocquette, J.F.; Bertrand, G.; Martineau, C.; Vermorel, M. y Toullec, R. (2003) The incorporation of solubilized wheat proteins in milk replacers for veal calves: effects on growth performance and muscle oxidative capacity. Reprod. Nutr. Dev. 43: 57-76.
- Ouwehand, A.C.; Kirjavainen, P.V.; Shortt, C. y Salminen, S. (1999) Probiotics: mechanisms and established effects. Int. Dairy J. 9: 43-52.
- Oyofe, B.A.; Deloach, J.R.; Corrier, D.E.; Norman, J.O.; Ziprin, R.L. y Mollenhauer, H.H. (1989) Effect of carbohydrates on *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chickens. Avian Dis. 33: 531-534.
- Ozawa, K.; Yabu-Uchi, K.; Yamanaka, K.; Yamashita, Y.; Nomura, S. y Oku, I. (1983) Effect of *Streptococcus faecalis* BIO-4R on intestinal flora of weanling piglets and calves. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1513-1518.
- Parker, R.B. (1974) Probiotics, the other half of antibiotic story. Anim. Nutr. Health 29: 4-8.

- Pascual, M.; Garriga, M. y Monfort, J.M. (1996) Los probióticos en la alimentación animal. Eurocarne 44: 91-96.
- Paulin, S.M.; Watson, P.R.; Benmore, A.R.; Stevens, M.P.; Jones, P.W.; Villarreal-Ramos, B. y Wallis, T.S. (2002) Analysis of *Salmonella enterica* serotype-host specificity in calves: avirulence of *S. enterica* serotype Gallinarum correlates with bacterial dissemination from mesenteric lymph nodes and persistence *in vivo*. Infect. Immun. 70: 6788-6797.
- Perdigón, G.; Fuller, R. y 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. y Medici, M. (2002) Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. Eur. J. Clin. Nutr. 56: S21-S26.
- Plummer, S.F.; Garaiova, I.; Sarvotham, T.; Cottrell, S.L.; LE Scouiller, S.; Weaver, M.A.; Tang, J.; Dee, P. y 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. y Peo, E.R. (1980) Effects of microbial feed additives on performance of starter and growing-finishing pigs. J. Anim. Sci. 51: 577-581.
- Pullinger, G.D.; Paulin, S.M.; Charleston, B.; Watson, P.R.; Bowen, A.J.; Dziva, F.; Morgan, E.; Villarreal-Ramos, B.; Wallis, T.S. y Stevens, M.P. (2007) Systemic translocation of *Salmonella enterica* Serovar Dublin in cattle occurs predominantly via efferent lymphatics in a cell-free niche and requires type III secretion system 1 (T3SS-1) but Not T3SS-2. Infect. Immun. 75: 5191-5199.
- Pullinger, G.D.; Dziva, F.; Charleston, B.; Wallis, T.S. y Stevens, M.P. (2008) Identification of *Salmonella enterica* Serovar Dublin-Specific sequences by subtractive hybridization and analysis of their role in intestinal colonization and systemic translocation in cattle. Infect. Immun. 76: 5310-5321.
- Quigley, J. (1998) Nota acerca de Terneros #42 - ¿Qué son "scours" (diarrea neonatal)?
www.calfnotes.com
- Quigley, J. (2001) Calf Note #39 – Using a refractometer. www.calfnotes.com

- Rada, V.; Vlková, E.; Nevoral, J. y Trojanová, I. (2006) Comparison of bacterial flora and enzymatic activity in faeces of infants and calves. *FEMS Microbiol. Lett.* 258: 25-28.
- Raibaud, P. (1992) Bacterial interactions in the gut. En: Fuller R. *Probiotics Scientific Basis*, Londres, Chapman y Hall, pp. 9-28.
- Reid, G. (1999) The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3763-3766.
- Reid, G. y 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. y 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.
- Robbins (2000) *Patología funcional y estructural*. 6e. Madrid, McGraw Hill-Interamericana.
- Roberts, F.H.S. y O'Sullivan, P.J. (1950) Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. *Austr. J. Agric. Res.* 1: 99-102.
- Roberts, T. (1989) Human illness costs of foodborne bacteria. *Am. J. Agric. Econ.* 71: 468-474.
- Rodríguez Armesto, R.; Peralta, C.; Ochoteco, M.; Zimmermann, R.; Marini, R. y Otero J.L. (1996a) Salmonellosis septicémica en terneros lactantes: nueva presentación para una vieja enfermedad (primera parte). *Therios* 25: 251-260.
- Rodríguez Armesto, R.; Peralta, C.; Ochoteco, M.; Zimmermann, R.; Marini, R. y Otero J.L. (1996b) Salmonellosis septicémica en terneros lactantes: nueva presentación para una vieja enfermedad (segunda parte). *Therios* 25: 287-299.
- Rodríguez Armesto, R. (2004) Necropsia: su importancia diagnóstica a campo. En CD room. FCV-UNL.
- Rogelj, I.; Matijas, B.B.; Majhenic, A.C. y Stojkovic, S. (2002) The survival and persistence of *Lactobacillus acidophilus* LF221 in different ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* 76: 83-91.

- Rojas, J.; Schweigert, B.S. y Rupel, I.W. (1948) The utilization of lactose by the dairy calf fed normal or modified milk diets. *J. Dairy Sci.* 31: 81-87.
- Rosmini, M.R.; Sequeira, G.J.; Guerrero-Legarreta, I.; Martí, L.E.; Dalla-Santina, R.; Frizzo, L. y 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: 181-191.
- Ross, R.; Galvin, M.; McAuliffe, O.; Morgan, S.; Ryan, M.; Twomey, D.; Meaney, W. y Hill, C. (1999) Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Anton. Leeuw.* 76: 337-346.
- Rotimi, V.O. y Duerden, B.I. (1981) The development of the bacterial microbiota in normal neonates. *J. Med. Microbiol.* 14: 51-62.
- Saarela, M.; Mogensen, G.; Fonden, R.; Mättö, J. y Maittila-Sandholm, T. (2000) Probiotic bacteria: safety functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84: 197-215.
- Salminen, S.; Deighton, M.A.; Benno, Y. y Gorbach, S.L. (1998a) Lactic acid bacteria in health and disease. En: *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspect.* S. Salminen y 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. y Rouland, I. (1998b) Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Brit. J. Nutr.* 80: S147-S171.
- Salminen, S.; Ouwehand, A.; Benno, Y. y Lee, Y.K. (1999) Probiotics: how should they be defined? *Trends Food Sci. Tech.* 10: 107-110.
- Salminen, S. e Isolauri, E. (2006) Intestinal colonization, microbiota, and probiotics. *J. Pediatr.* 149: S115-S120.
- Salveti, N.R.; Gimeno, E.J.; Lorente, J.A. y Ortega, H.H. (2004) Expression of cytoskeletal proteins in the follicular wall of induced ovarian cysts. *Cells Tissues Organs* 178: 117-125.
- Salveti, N.R.; Muller, L.A.; Acosta, J.C.; Gimeno, J.E. y Ortega, H.H. (2007) Estrogen receptors α and β and progesterone receptors in ovarian follicles of cows with cystic ovarian disease. *Vet. Pathol.* 44: 373-378.

- 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.
- Segall, T. y Lindberg, A.A. (1991) Experimental oral *Salmonella dublin* infection in calves. A bacteriological and pathological study. *J. Vet. Med. B* 38: 169-185.
- Scharek, L.; Guth, J.; Reiter, K.; Weyrauch, K.D.; Taras, D.; Schwerk, P.; Schmidt, M.F.G.; Wieler, L.H. y Tedin, K. (2005) Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* on development of the immune system of sows and piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 105: 151-161.
- Schillinger, U. y Lucke, F.K. (1989) Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1901-1906.
- Schingoethe, D. (1976) Whey utilization in animal feeding: a summary and evaluation. *J. Dairy Sci.* 59: 556-570.
- Schneider, R.; Rosmini, M.R.; Hermann, M. y Vogel, R. (2004) Identificación de bacterias lácticas componentes de la microbiota típica de los terneros criados en condiciones artificiales. *Revista FAVE-Ciencias Veterinarias* 3: 7-15.
- Schwab, C.G.; Moore, J.J.111, Hoyt, P.M. y Prentice J.L. (1980) Performance and fecal flora of calves fed a nonviable *Lactobacillus bulgaricus* fermentation product. *J. Dairy Sci.* 63: 1412-1423.
- Shu, Q. y 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.
- Slomiany, B.L.; Sarosiek, Y. y Slomiany, A. (1987) Gastric mucus a the mucosal barrier. *Digest. Dis. Sci.* 5: 125-145.
- Smith, H.W. y Jones, J.E. (1967) Observations on experimental oral infection with *Salmonella dublin* in calves and *Salmonella choleraesuis* in pigs. *J. Pathol. Bacteriol.* 93: 141-156.
- Smith, J.L. y Palumbo, S.A. (1981) Microorganisms as food additives. *J. Food Protect.* 44: 936-955.

- Smith, H. (2000) Questions about the behavior of bacterial pathogens *in vivo*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 355: 551-564.
- Smoragiewicz, W.; Bieleka, M.; Babuchowski, A. y Dubeau, H. (1993) Les Probiotiques. Can. J. Microbiol. 39: 1089-1095.
- Soto, L.P.; Frizzo, L.S.; Bertozzi, E.; Diaz A.; Martí, L.E.; Dalla Santina, R.; Sequeira, G.J. y Rosmini, M.R. (2009) Milk evaluation as growth and cold preservation medium of a probiotic inoculum for young calves. J. Anim. Vet. Adv. 8: 1353-1360.
- Soto, L.P.; Frizzo, L.S.; Bertozzi, E.; Avataneo, E.; Sequeira, G.J. y Rosmini, M.R. (2010) Molecular microbial analysis of *Lactobacillus* strains isolated from the gut of calves for potential probiotic use. Vet. Med. Int. En prensa.
- Stavric, S.; Gleeson, T.M. y 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.
- Steinbach, G.; Koch, H.; Meyer, H. y Klaus, C. (1996) Influence of prior infection on the dynamics of bacterial counts in calves experimentally infected with *Salmonella dublin*. Vet. Microbiol. 48: 199-206.
- Steinbach, G.; Lauterbach, L. y Methner, U. (2000) Studies of the phenomenon of host adaptation in *Salmonella*. J. Vet. Med. B 47: 707-719.
- Sullivan, Å.; Barkholt, L. y 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.
- Tannock, G.W. (1995) Microecology of the gastrointestinal tract in relation to lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 5: 1059-1070.
- Timmerman, H.M.; Koning, C.J.M.; Mulder, L.; Rombouts, F.M. y Beynen, A.C. (2004) Monostrain, multistrain and multispecies probiotics -a comparison of functionality and efficacy. Int. J. Food Microbiol. 96: 219-233.
- Timmerman, H.M.; Mulder, L.; Everts, H.; van Espen, D.C.; van der Wal, E.; Klaassen, G.; Rouwers, S.M.G.; Hartemink, R.; Rombouts, F.M. y Beynen, A.C. (2005)

- Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. *J. Dairy Sci.* 88: 2154-2165.
- Tizard, I.R. (1996) *Inmunología Veterinaria*. México, McGraw Hill-Interamericana.
- Toullec, R. y Formal, M. (1998) Digestion of wheat protein in the preruminant calf: ileal digestibility and blood concentrations of nutrients. *Anim. Feed Sci. Tech.* 73: 115-130.
- Trevisi, P.; De Filippi, S.; Modesto, M.; Mazzoni, M.; Casini, L.; Biavati, B. y Bosi, P. (2007) Investigation on the ability of different strains and doses of exogenous Bifidobacteria, to traslocate in the liver of weaning pigs. *Livest. Sci.* 108: 109-112.
- Vaughan, E.E.; Hilig, H.G.H.; Zoetendal, E.G.; Satokari, R.; Collins, J.K.; Akkermans, A.D.L. y 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. y Perdigón, G. (2000) Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria. *Biocell* 24: 223-232.
- Vlková, E.; Trojanová, I. y Rada, V. (2006) Distribution of Bifidobacteria in the gastrointestinal tract of calves. *Folia Microbiol.* 51: 325-328.
- Vrese, M. de y Schrezenmeir, J. (2002) Probiotics and non-intestinal infectious conditions. *Brit. J. Nutr.* 88(Suppl. 1): S59-S66.
- Wallis, T.S.; Paulin, S.M.; Plested, J.S.; Watson, P.R. y Jones, P.W. (1995) The *Salmonella dublin* virulence plasmid mediates systemic but not enteric phases of salmonellosis in cattle. *Infect. Immun.* 63: 2755-2761.
- Woods, A. y Ellis, C.R. (1994) *Laboratory Histopathology. A Complete Reference*. Longman Group Limited. Londres.
- Zhou, J.S.; Shu, Q.; Rutherford, K.J.; Prasad, J.; Gopal, P.K. y Gill H.S. (2000) Acute oral toxicity and bacterial translocation studies on potentially probiotic strains of lactic acid bacteria. *Food Chem. Toxicol.* 38: 153-161.
- Ziemer, C.H.J. y 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.