

# PROBIÓTICOS NATIVOS PARA TERNEROS BAJO SISTEMA DE CRÍA INTENSIVA Y SEMI-INTENSIVA: SELECCIÓN DE CEPAS Y ENSAYO DE PERSISTENCIA EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL

Fernández S<sup>1</sup>, Fraga M<sup>2</sup>, Silveyra E<sup>1</sup>, Rabaza A<sup>2</sup>, Pla M<sup>3</sup>, Zunino P<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Av Italia 3318.  
<sup>2</sup>Unidad de Salud Animal, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, La Estanzuela. Ruta 50, km 11, Colonia.  
<sup>3</sup>Unidad de Lechería, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, La Estanzuela. Ruta 50, km 11, Colonia.

## RESUMEN

El uso de microorganismos nativos con capacidad probiótica es una herramienta alternativa para el tratamiento y prevención de diversas patologías animales, como la diarrea neonatal de terneros (DNT). Los probióticos son seleccionados siguiendo una serie de criterios que permiten determinar *in vitro* e *in vivo* el potencial probiótico a partir de una colección de cepas. El objetivo de este estudio fue evaluar la colonización y persistencia en el tracto gastrointestinal de terneros de 4 cepas de *Lactobacillus* spp. nativas seleccionadas. La evaluación de la persistencia implicó un ensayo *in vivo* de administración oral y cuantificación en heces por qPCR de las bacterias administradas. El estudio se realizó con 15 terneros (1 mes de vida), divididos en 5 grupos de 3 animales, de los cuales 4 grupos fueron de animales tratados con 4 cepas distintas y 1 grupo fue el grupo control. Se determinó que todas las cepas tuvieron una buena capacidad colonizadora, y particularmente una logró persistir en los 3 animales tratados hasta 5 días luego de finalizado el período de administración. Este resultado indica que las cepas fueron capaces de llegar de forma viable al intestino, siendo éste un requisito necesario para que puedan ejercer un efecto beneficioso en el hospedero.

## SUMMARY

The use of native microorganisms with probiotic capacity is an alternative tool for the treatment and prevention of various animal diseases, such as neonatal calf diarrhea (NCD). The selection of probiotic strains is based on different *in vitro* and *in vivo* assays, which predict their potential within a collection of strains. The objective of this study was to assess the colonization and persistence

of four native *Lactobacillus* spp. strains in the gastrointestinal tract of calves. The assessment of enteric persistence involved an *in vivo* assay with oral administration of probiotics and quantification in feces of the administered bacteria with qPCR. The study was conducted using 15 calves (1 month old) which were divided into five groups of three animals, four of which were treated with four different strains and the other one was the control group. It was determined that all strains showed a good colonizing ability, and particularly one of them managed to persist in the three treated animals until five days after the end of the administration period. This result indicates that the strains were able to reach the intestine viable, indicating that they could be promising candidates for the design of probiotics for the control of NCD.

## INTRODUCCIÓN

La demanda mundial de lácteos se encuentra en continuo crecimiento y para satisfacerla es necesario aumentar las poblaciones de bovinos en producción (FAO 2006). Esto ha hecho que en los últimos años se hayan incrementado los sistemas intensivos con el fin de mejorar los rendimientos en una menor área dedicada a la ganadería y en base a estrategias productivas sustentables (Alvarez et al. 2008, Basset-Mens et al. 2009). Estos sistemas separan tempranamente a los terneros de sus madres y estos son criados artificialmente desde aproximadamente las primeras 24 horas de nacidos (Ventura et al. 2013). Estos factores generan estrés en los animales y dificultan la adquisición de una microbiota nativa saludable, lo cual facilita la colonización de patógenos promoviendo enfermedades como la diarrea neonatal de terneros (DNT, Signorini et al. 2012). Los probióticos han surgido como una alternativa promisoriosa al uso de antibióticos en estos sis-



temas, y en general, los resultados obtenidos sugieren que los probióticos pueden tener un efecto benéfico importante sobre la nutrición y la salud animal (Chaucheyras-Durand et al. 2010). Se denomina probiótico a un monocultivo o un cultivo mixto "vivo" de microorganismos que tienen efectos beneficiosos sobre animales o humanos al ser consumido (FAO/WHO, 2002). Una serie de criterios son utilizados para evaluar las cepas y poder determinar su potencial probiótico previo a ensayos in vivo dirigidos a evaluar el efecto de la administración sobre el huésped. Un importante requisito para predecir un efecto benéfico en la salud y bienestar del hospedero, es que los probióticos puedan colonizar y sobrevivir en el intestino (Ouwehand et al. 2002).

## OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la capacidad de colonización y persistencia en el tracto gastrointestinal de terneros de cepas nativas de *Lactobacillus* spp. seleccionadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas bacterianas

Las cepas utilizadas fueron aisladas a partir de heces de terneros sanos criados al pie de la madre, utilizando agar MRS y Rogosa, selectivos para bacterias ácido lácticas (BAL) y lactobacilos, respectivamente. Las cepas identificadas como *Lactobacillus* spp. fueron caracterizadas in vitro en sus propiedades potencialmente probióticas y las 4 cepas más promisorias fueron seleccionadas para evaluar colonización y persistencia in vivo. Dentro de las características potencialmente probióticas se encuentra: resistencia a pH bajo y sales biliares, formación de biofilm, efecto antimicrobiano frente a *E. coli*, adhesión a mucus y a la línea células Caco-2. Dos de estas cepas pertenecen a la especie *L. jhonsonii* (cepas 1.1 y 1.6), otra pertenece a la especie *L. amylovorus* (cepa 8.7) y la última a *L. reuteri* (cepa 1.3B).

### Animales y alojamiento

El experimento se realizó en el tambo de INIA-La Estanzuela (Ruta 50, km 11, Colonia), en un área apartada para la crianza en esta-

ca. En total se utilizaron 15 terneros machos holando que se criaron desde su nacimiento hasta el fin del ensayo. En primera instancia los terneros recibieron dos dosis de calostro artificial (The Saskatoon Colostrum Company Ltd, Canada) en las primeras 12h de nacimiento, y en los siguientes días se comprobó que la transferencia pasiva de anticuerpos había sido suficiente mediante refractometría de una muestra de sangre. Los animales fueron alimentados con leche en mamadera dos veces al día (4 litros/día) hasta los cinco días de vida y luego se colocaron en estaca con baldes donde se mantuvo la cantidad de leche y se siguieron los mismos horarios de alimentación, pero se agregó agua y ración dos veces al día.

## Diseño experimental

Los animales fueron divididos al azar en cinco grupos de tres, constituyendo cuatro tratamientos con cuatro cepas distintas y un grupo control. Para minimizar la incidencia de diarreas durante el período experimental, se decidió esperar al mes de vida para comenzar con la administración de los probióticos. Las cepas liofilizadas en el laboratorio ( $1 \times 10^9$  UFC) en una matriz de leche descremada, eran reconstituidas en agua destilada estéril y fueron administradas en forma oral una vez por día durante cinco días consecutivos. Se tomaron muestras de materia fecal de la ampolla rectal en forma diaria desde el primer día de administración (día 0) hasta un día después de la última dosis (día 5), y luego a los días 7 y 10. Las muestras fueron congeladas inmediatamente a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su procesamiento.

### Cuantificación de los probióticos por qPCR

Para poder inferir la capacidad de las cepas de colonizar y permanecer en el tracto gastrointestinal se utilizó la técnica de qPCR para cuantificar en las heces las especies de bacterias administradas. Los primers utilizados para la detección de *L. jhonsonii* fueron los descritos por Furet y col. (2004), y para la detección de *L. reuteri* y *L. amylovorus* los primers fueron diseñados en este trabajo. Para el análisis cuantitativo, los Ct (ciclo umbral de amplificación) de cada muestra fueron comparados con los Ct de curvas standard realizadas con diluciones del ADN genómico de las cepas utilizadas. De esta forma los resultados se pueden expresar en número de bacterias/mg materia fecal.

## RESULTADOS

En los animales del grupo control se pudo observar que las especies evaluadas se mantuvieron relativamente constantes durante el ensayo. En cuanto al tratamiento con la cepa 1.1 se observó que, con respecto al día 0, dos de los tres animales mostraron un aumento significativo en el número de *L. johnsonii* en sus heces, pero luego de finalizado los 5 días de administración solo en uno de estos animales se mantuvo el aumento. La cepa 1.6 también pertenecía a la especie *L. johnsonii* y su administración también provocó un aumento en el número de bacterias de esta especie en dos animales luego de la primera administración, y en este caso ambos animales mantuvieron esa condición luego de la última dosis. La administración de la cepa 1.3B, perteneciente a la especie *L. reuteri*, indujo un aumento significativo en el número de bacterias de esa especie en los tres animales y en todos este aumento se mantuvo en el tiempo. Por otro lado, el tratamiento con la cepa 8.7, perteneciente a la especie *L. amylovorus*, también indujo un aumento en el número de bacterias de esta especie en los tres animales pero solo un animal mantuvo esa condición luego de finalizado el periodo de administración.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Una de las características más importantes de las bacterias probióticas es su capacidad de pasar a través del tracto gastrointestinal superior y colonizar el intestino medio (Bunesova 2012). En este estudio se determinó que las cuatro cepas estudiadas presentaron, en mayor o menor medida, una buena capacidad colonizadora. La persistencia es otra característica frecuentemente buscada ya que se considera deseable que los efectos de la administración de las cepas se mantengan en el tiempo. La cepa 1.3B fue la cepa que presentó más capacidad de persistencia, lo cual la hace promisoría para futuros ensayos. Este estudio le da continuidad al trabajo previo de evaluación in vitro de las cepas y es un paso más para la caracterización del potencial probiótico dirigido al manejo de la DNT.

Como conclusión se puede determinar que las cuatro cepas tuvieron capacidad de colonizar el tracto gastrointestinal de terneros

aunque en forma variable, lo cual sugiere una buena correspondencia entre la caracterización in vitro y los criterios de selección de las cepas. Por otro lado una de las cepas mostró una muy buena capacidad de persistencia, mostrándola como muy promisoría para futuros ensayos in vivo dirigidos a evaluar su potencial como herramienta terapéutica para el control de la DNT.

Este trabajo fue financiado por un proyecto FPTA-INIA (325). La Lic. Sofía Fernández cuenta con una Beca de Doctorado otorgada por la ANII.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez A, Del Corral J, Solís D, Pérez, JA. (2008). Does intensification improve the economic efficiency of dairy farms. *J. Dairy Sci.* 91:3693-3698.
- Basset-Mens C, Ledgard S, Boyes M. (2009). Eco-efficiency of intensification scenarios for milk production in New Zealand. *Ecol. Econ.* 68:1615-1625.
- Bunešová V, Domig KJ, Killer J, Vlková E, Kopečný J, Mrázek J, Ročková Š, Rada V. (2012). Characterization of bifidobacteria suitable for probiotic use in calves. *Anaerobe.* 18:166-8.
- Chaucheyras-Durand F, Durand H. (2010). Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial Microbes.* 1:3-9
- FAO/WHO (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Working Group Report 2002. Rome and Geneva: Food and Agricultural Organization of the United Nations/World Health Organization.
- FAO (2006). World agriculture: towards 2030/2050. Interim report, Global Perspective Studies Unit. Roma, Italia: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Furet JP, Quénee P, Tailliez P. (2004). Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *Int J Food Microbiol.* 97: 197-207.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 279-289.
- Signorini ML, Soto LP, Zbrun MV, Sequeira GJ, Rosmini MR, Frizzo LS. (2012). Impact of probiotic administration on the health and fecal microbiota of young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials of lactic acid bacteria. *Res Vet Sci* 93:250-258
- Ventura BA, Von Keyserlingk MAG, Schuppli CA, Weary DM. (2013). Views on contentious practices in dairy farming: The case of early cow-calf separation. *J. Dairy Sci.* 96:6105-6116.