



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

*Laboratorio de Análisis de Alimentos, Instituto de Ciencias  
Veterinarias del Litoral, Universidad Nacional del Litoral, Consejo  
Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Icivet-Litoral  
UNL-CONICET)*

**“Utilización de microorganismos benéficos para reducir  
la diseminación de patógenos alimentarios durante la  
crianza de terneros”**

**Autor: Diego Martín Astesana.**

**Directora: Dra. Lorena Paola Soto.**

**Co-Director: Dr. Laureano Sebastián Frizzo.**

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

**2018**

## **PRODUCCIÓN CIENTÍFICA**

### **PRESENTACIONES A CONGRESOS Y JORNADAS**

2014-ASTESANA, D.M.; ZIMMERMANN, J.A.; BINCI, A.; SEQUEIRA, G.J.; ROSMINI, M.R.; ZBRUN, M.V.; SOTO, L.P. Produccion de Macrocapsulas liofilizadas para el mantenimiento de la Viabilidad de Probioticos Destinados a Terneros. Argentina. Rosario. Libro. Resumen. Congreso. Sociedad de Biologia de Rosario XVI Congreso y XXXIV Reunion Anual. Sociedad de Biologia de Rosario.

2015- ASTESANA, D.M.; BLAJMAN, J.E.; FUHR, E.M; ROMERO SCHARPEN, A.; ZIMMERMANN, J.A.; FUSARI, M.L.; BINCI, A.; ROSMINI, M.R.; SOTO, L.P. Liofilizacion de macrocapsulas probioticas para terneros lactantes. Argentina. Santa Fe. Libro. Resumen. Congreso. III Congreso Bioquimico del Litoral XVI Jornadas Argentinas de Microbiologia.

2016- D.M. Astesana, E. Rossler, A. Romero Scharpen, A.P. Berisvil, P. Ariel, L.E. Martí, M.V. Zbrun, L.P. Soto. SURVIVAL OF ENCAPSULATED PROBIOTIC STRAINS DESTINED TO CALVES UNDER SIMULATED GASTROINTESTINAL CONDITIONS. 2016-V Simposio Internacioal de Bacterias Lácticas.

2017- Astesana, Diego Martín; Romero Scharpen, Analía; Rosler, Eugenia; Fusari, Marcia Lucia; Zimmermann, Jorge Alberto; Sirini, Noelí Estefania; Berisvil, Ayelén Patricia. Rosmini, Marcelo Raúl. SUPERVIVENCIA DE CEPAS PROBIÓTICAS ENCAPSULADAS, DESTINADAS A TERNEROS JÓVENES, DURANTE EL ALMACENAMIENTO A DIFERENTES TEMPERATURAS. II Reunión Transdisciplinaria en CIENCIAS AGROPECUARIAS 2017. XVIII Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas 2017. Facultad de Ciencias Veterinarias – UNR. V Jornada Latinoamerican III Jornadas de Ciencia y Tecnología 2017. Facultad de Ciencias Agrarias – UNR.

2017. Supervivencia de cepas probióticas encapsuladas destinadas a terneros jóvenes frente condiciones gastrointestinales simuladas. Astesana, D.M.; Zbrun, M.V.; Olivero, C.R.; Signorini, M.L.; Martí, E.L.; Sequeira, G.J.; Soto, L.P. V JORNADA DE DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN.

Astesana, D M (2017)

## ARTÍCULOS PUBLICADOS

2018. Astesana, D. M., Zimmermann, J. A., Frizzo, L. S., Zbrun, M. V., Blajman, J. E., Berisvil, A. P., Romero-Scharpen A., Signorini M.L., Rosmini M.R. y Soto, L. P. Development and storage studies of high density macrocapsules containing *Lactobacillus* spp. strains as nutritional supplement in young calves. *Revista Argentina de microbiología*.

## **AGRADECIMIENTOS**

Durante estos años son muchas las personas e instituciones que han participado en este trabajo, y a quienes quiero expresar mi reconocimiento y gratitud.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias y al Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral, por haber proporcionado el lugar físico para el desarrollo de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por otorgarme una beca y posibilitar mi formación académico-profesional.

A mi directora Dra. Lorena P. Soto y mi Co-Director Dr. Laureano S. Frizzo por tener siempre la puerta abierta para resolver dudas, por su apoyo constante y la gran confianza depositada en mí, y también por animarme y alentarme en cada una de las fases de la investigación.

A los profesores Dr Marcelo Rosmini, MSc. Enrique Martí, Dr. Gabriel Sequeira, Dr. Marcelo Signorini, y Dra. Ma. Virginia Zbrun por ofrecerme sus conocimientos, experiencia profesional y su amistad.

A Jesi, Anita, Aye, Beto, Caro, Colo, Euge, Guille, Lara, Maqui y Pitu, por los momentos compartidos no solo como compañeros de trabajo sino como amigos.

A mi mujer Elisabet por estar conmigo y apoyarme a lo largo de estos años.

A mi familia por brindarme su cariño y apoyo incondicional, por enseñarme a tomar las decisiones y a no rendirme.

A todos las personas que han pasado por mi vida y me han dejado algo de ellos que me ha hecho mejor a lo largo de los años. A todos mi eterno agradecimiento.

<b>Índice</b>	<b>Página</b>
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
I. Índice de Abreviaturas .....	ix
II. Índice de Tablas. ....	xi
III. INDICE DE FIGURAS. ....	xiii
IV. RESUMEN.....	xviii
1. Introducción.....	1
1.1. Seguridad de la Cadena Agroalimentaria .....	2
1.2. Historia y aspectos generales del género <i>Campylobacter</i> .....	4
1.3. Epidemiología.....	5
1.3.1. Antecedentes.....	5
1.3.2. Reservorio.....	8
1.3.3. Transmisión al humano .....	9
1.3.4. Enfermedad en el humano .....	10
1.3.5. Enfermedad en los animales .....	11
1.4. Utilización de Antibióticos para prevenir la transmisión de patógenos .....	11
1.5. Estrategias encaminadas a disminuir la incidencia de patógenos alimentarios en producción primaria.....	14
1.5.1. Definición de Probiótico.....	14
1.5.2. Mecanismos de acción de los probióticos .....	14
1.5.3. Beneficios de la utilización de probióticos en bovinos .....	18
1.6. Conservación de probióticos.....	20
1.6.1. Encapsulación.....	20
1.6.2. Técnicas utilizadas para la encapsulación de microorganismos.....	21
1.6.3. Materiales utilizados para encapsular bacterias probióticas.....	22
1.6.4. Secado de Cápsulas .....	26
2. Hipótesis y Objetivos .....	29
2.1. Hipótesis .....	30
2.2. Objetivo general.....	30
2.3. Objetivos específicos .....	30
3. Materiales y Métodos .....	31
3.1. Evaluación de la viabilidad de cepas probióticas conservadas en cápsulas secadas mediante liofilización .....	32
3.1.1. Microorganismos .....	32
3.1.2. Producción de Macrocápsulas .....	32
3.1.3. Supervivencia de microorganismos probióticos encapsulados frente a condiciones gastrointestinales simuladas .....	39

3.1.4.	Producción de macrocápsulas con alta densidad de probióticos .....	41
3.1.5.	Supervivencia de microorganismos conservados en CAP11 frente a condiciones gastrointestinales simuladas .....	43
3.2.	Evaluación del efecto de microorganismos benéficos sobre la performance y microbiota intestinal de terneros jóvenes durante la crianza convencional de terneros jóvenes.....	45
3.2.1.	Animales y alimentación .....	45
3.2.2.	Diseño Experimental .....	46
3.2.3.	Inóculo bacteriano .....	46
3.2.4.	Selección de cepas resistentes a rifampicina. ....	46
3.2.5.	Preparación y administración del inóculo .....	47
3.2.6.	Recuentos de la microbiota fecal.....	47
3.2.7.	Medición de parámetros de rendimientos y medidas corporales.....	48
3.2.8.	Consistencia Fecal .....	48
3.2.9.	Análisis de la dinámica poblacional de la microbiota predominante en el intestino de los terneros jóvenes por DGGE .....	49
3.2.10.	Extracción de ADN de las muestras de materia fecal.....	49
3.2.11.	Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 50	
3.2.12.	Preparación de los geles, electroforesis y tinción .....	53
3.2.13.	Identificación y sección de bandas desde un gel de DGGE.....	54
3.2.14.	Purificación y secuenciación de los productos de PCR.....	54
3.2.15.	Análisis de los componentes mayoritarios de la microbiota.....	54
3.2.16.	Análisis estadístico .....	54
3.3.	Generación del modelo experimental de infección por <i>Campylobacter jejuni</i> en terneros jóvenes .....	55
3.3.1.	Microorganismos .....	55
3.3.2.	Inhibición de <i>Campylobacter jejuni in vitro</i> .....	55
3.3.3.	Animales e Instalaciones .....	56
3.3.4.	Diseño del experimento .....	56
3.3.5.	Preparación del inóculo y administración .....	57
3.3.6.	Composición de los alimentos.....	57
3.3.7.	Detección de <i>Campylobacter jejuni</i> en materia fecal.....	58
3.3.8.	Análisis estadístico .....	58
3.4.	Evaluación del efecto de microorganismos benéficos sobre terneros jóvenes infectados con <i>Campylobacter jejuni</i> . ....	58
3.4.1.	Animales.....	58
3.4.2.	Composición del alimento .....	59
3.4.3.	Diseño del experimento .....	59

3.4.4.	Preparación y administración de microorganismos probióticos.....	59
3.4.5.	Preparación y administración del Patógeno .....	59
3.4.6.	Análisis microbiológico en materia fecal .....	59
3.4.7.	Registro de signos clínicos .....	60
3.4.8.	Hemograma .....	60
3.4.9.	Análisis de la dinámica poblacional de la microbiota predominante en el intestino de los terneros jóvenes por DGGE .....	61
3.4.10.	Análisis estadístico .....	61
3.5.	Evaluación de la diseminación del patógeno utilizando modelos probabilísticos.....	61
3.5.1.	Animales e instalaciones .....	61
3.5.2.	Microorganismos .....	62
3.5.3.	Preparación y administración del Patógeno .....	62
3.5.4.	Diseño del experimento .....	62
3.5.5.	Análisis microbiológico en materia fecal .....	63
3.5.6.	Análisis estadístico .....	63
4.	Resultados.....	64
4.1.	Evaluación de la viabilidad de cepas probióticas conservadas en cápsulas secadas mediante liofilización .....	65
4.1.1.	Efecto del tipo de cápsulas sobre la viabilidad celular.....	65
4.1.2.	Efecto de los crioprotectores a 4°C y TA .....	67
4.1.3.	Efecto protector del glicerol a -20°C .....	69
4.1.4.	Supervivencia de células sin encapsular y encapsuladas en soluciones gástricas simuladas .....	69
4.1.5.	Viabilidad microbiana en cápsulas concentradas 11 log (CAP11).....	70
4.1.6.	Supervivencia de células sin encapsular y encapsuladas en soluciones gástricas simuladas .....	71
4.2.	Evaluación del efecto de microorganismos benéficos sobre la performance y microbiota intestinal de terneros jóvenes durante la crianza convencional de terneros jóvenes.....	74
4.2.1.	Recuentos microbiológicos .....	74
4.2.2.	Performance y estatus sanitario .....	76
4.2.3.	Análisis DGGE.....	78
4.3.	Generación del modelo experimental de infección por <i>Campylobacter jejuni</i> en terneros jóvenes. ....	85
4.3.1.	Inhibición de <i>Campylobacter jejuni in vitro</i> .....	85
4.3.2.	Recuento microbiano .....	85
4.3.3.	Sintomatología Clínica .....	87

4.4.	Evaluación del efecto de microorganismos benéficos sobre terneros jóvenes infectados con <i>Campylobacter jejuni</i> .....	88
4.4.1.	Peso de los terneros .....	88
4.4.2.	Efecto del tratamiento sobre la temperatura de los animales antes y durante la infección con el patógeno .....	91
4.4.3.	Efecto del tratamiento sobre el score de materia fecal .....	93
4.4.4.	Efecto del tratamiento sobre las poblaciones microbianas fecales de E. coli, levaduras y <i>Lactobacillus</i> en terneros jóvenes antes de la infección con <i>Campylobacter jejuni</i> NCTC 11168.....	94
4.4.5.	Detección de <i>Campylobacter jejuni</i> NCTC 11168 en materia fecal .....	96
4.4.6.	Parámetros sanguíneos en terneros jóvenes infectados con <i>Campylobacter jejuni</i> NCTC 11168. ....	97
4.4.7.	Análisis de la dinámica poblacional de la microbiota intestinal predominante en terneros jóvenes. ....	100
4.5.	Evaluación de la diseminación del patógeno utilizando modelos probabilísticos.....	104
4.5.1.	Detección de <i>Campylobacter</i> en materia fecal y proporción de animales infectados.....	104
4.5.2.	Temperatura Corporal y recuento microbiano.....	105
5.	Discusión .....	108
5.1.	Evaluación de la viabilidad de cepas probióticas conservadas en cápsulas secadas por liofilización. ....	109
5.1.1.	Viabilidad bacteriana durante el almacenamiento.....	109
5.1.2.	Viabilidad bacteriana durante la digestión gastrointestinal simulada. ...	111
5.1.3.	Evaluación de la viabilidad bacteriana durante el almacenamiento y condiciones gastrointestinales simuladas en cápsulas con 11 logUFC. ....	113
5.2.	Evaluación del efecto de microorganismos benéficos sobre la performance y microbiota intestinal de terneros jóvenes durante la crianza convencional de terneros jóvenes.....	116
5.3.	Generación del modelo experimental de infección por <i>Campylobacter jejuni</i> en terneros jóvenes. ....	123
5.3.1.	Inhibición in vitro .....	123
5.3.2.	Modelo de infección de <i>Campylobacter</i> .....	124
5.4.	Evaluación del efecto de microorganismos benéficos sobre terneros jóvenes infectados con <i>Campylobacter jejuni</i> . ....	125
5.5.	Evaluación de la diseminación del patógeno utilizando modelos probabilísticos.....	133
6.	CONCLUSIONES.....	138
7.	BIBLIOGRAFÍA .....	141

## **I. Índice de Abreviaturas**

AB Alimento Balanceado

AC Altura de la cruz

BAL Bacteria Ácido Lácticas

CA Consumo de alimento

CAP11 Macrocápsulas concentradas 11 log

CC: Cápsula concentrada

CC10X: Cápsula concentrada 12,5 veces.

CC5X Cápsula Concentrada 5 veces.

CF Consistencia fecal

CL: Células Libres

Con12,5X Cápsulas control concentradas 12,5 veces.

DSPV Departamento de Salud Pública

EA Eficiencia de alimentación

ELC Extracto libre de Células

ELCn Extracto Libre de Células Neutralizado

ELCsn Extracto libre de Células Sin Neutralizar

ETAs Enfermedades transmitidas por los alimentos

Gly12,5X Cápsulas con glicerol concentradas 12,5 veces.

INTA Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

ITA Ingesta total de alimento

JGS: Jugo Gástrico Simulado

JIS: Jugo Intestinal Simulado

NMS Nivel Mínimo Sugerido

MCCDA Medio modificado agar carbón-cefoperazona-desoxicolato

MRS: Man, Rogosa y Sharpe

MS: Materia Seca

OMS Organización Mundial de la Salud

PBS Buffer fosfato salino

PC peso corporal

Per12,5X Cápsulas con permeado concentradas 12,5 veces.

PT perímetro torácico

RC: Cápsula por reincubación

SENASA Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

Astesana, D M (2017)

TA: Temperatura Ambiente

UFC: Unidad Formadora de Colonia

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

DGGE Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización.

## II. Índice de Tablas.

<b>Tabla 1.</b> Lista de la OMS de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevas herramientas de control. ....	13
<b>Tabla 2.</b> Materiales utilizados en la encapsulación de bacterias probióticas.....	23
<b>Tabla 3.</b> Composición del medio desarrollado en el Laboratorio de Análisis de Alimentos, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral, Consejo Nacional del Investigaciones Científicas y Técnicas (LAB-ICIVET-CONICET).....	43
<b>Tabla 4.</b> Poblaciones microbianas estudiadas, medios y condiciones de cultivo utilizados.....	48
<b>Tabla 5.</b> Mezcla utilizada en la reacción de PCR para la amplificación del 16S ADNr. ....	51
<b>Tabla 6.</b> Primers empleados para la amplificación de ADN de la comunidad de bacterias presentes en la materia fecal de los terneros.....	51
<b>Tabla 7.</b> Solución Stock de Mix para PCR.....	52
<b>Tabla 8.</b> Condiciones utilizadas para amplificar el ADNr 16S utilizando los primers GC-HDA1 y HDA2.....	52
<b>Tabla 9.</b> Poblaciones microbianas estudiadas, medios y condiciones de cultivo utilizados.....	60
<b>Tabla 11.</b> Recuentos microbianos previo y posterior al proceso de liofilización y durante el almacenamiento a diferentes temperaturas (temperatura ambiente y refrigeración) durante 84 d en diferentes tipos de cápsulas.....	66
<b>Tabla 12.</b> Recuento microbiano después de liofilizado (0 d) y después de 84 días (84 d) frente diferentes condiciones de almacenamiento (temperatura ambiente, refrigeración (4°C) y congelación (-20°C)) en los diferentes tipos de cápsulas y el tiempo en el que la viabilidad celular se mantiene por encima del nivel mínimo sugerido (NMS) en la cápsula. ....	72
<b>Tabla 13.</b> Tasa de recuperación de inóculo probiótico administrado en macrocápsulas	76
<b>Tabla 14.</b> Porcentaje (%) de identidad de secuencias parciales de 16S ADNr con secuencias presentes en la base de datos del NCBI.....	82
<b>Tabla 15.</b> Detección de <i>Campylobacter jejuni</i> en materia fecal de terneros infectados con <i>C. jejuni</i> NCTC 1168 con una dosis única de 10 Log UFC (G-C10), terneros infectados con <i>C. jejuni</i> NCTC 1168 con una dosis única de 6 Log UFC (G-C6) y terneros no infectados (G-C). ....	86

<b>Tabla 16.</b> Microbiota en materia fecal de terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de $10^{11}$ UFC/ternero e infectados con <i>C.jejuni</i> NCTC 11168 (G-PC), de terneros no suplementados pero infectados con <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 (G-CP) y de terneros no suplementados y no infectados con <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 (G-C) .....	95
<b>Tabla 17.</b> Detección de <i>Campylobacter jejuni</i> en materia fecal de terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de $10^{11}$ UFC/ternero e infectados con <i>C.jejuni</i> NCTC 11168 (G-PC), de terneros no suplementados pero infectados con <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 (G-CP) y de terneros no suplementados y no infectados con <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 (G-C). .....	97
<b>Tabla 18.</b> Porcentaje (%) de identidad de secuencias parciales de 16S ADNr con secuencias presentes en la base de datos del NCBI.....	103

### III. INDICE DE FIGURAS.

<b>Figura 1.</b> Reservorios y vías de transmisión asociadas con las especies de <i>Campylobacter</i> termotolerantes.....	10
<b>Figura 2.</b> Mecanismos de acción de los probióticos. Adaptado de Probióticos y salud humana, revista MediCiego (Fernández, 2013).....	15
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática de la producción de macrocápsulas. (A) Cápsulas reincubadas (RC). (B) Cápsulas concentradas (CC). (C) Cápsulas con crioprotector (Gly12,5X: cápsulas concentradas 12,5X con glicerol; Per12,5X cápsulas concentradas 12,5X con permeado de suero; Con12,5X: cápsulas de control 12,5X sin crioprotectores).....	34
<b>Figura 4.</b> Diseño experimental para la producción y conservación de cápsulas en diferentes condiciones de temperatura. RC: cápsulas reincubadas; CC: Cápsulas concentradas. CC5X: cápsulas concentradas 5X con respecto al cultivo en volumen inicial; CC12,5X: cápsulas concentradas 12,5X con respecto al cultivo en volumen inicial; TA: almacenamiento de cápsulas a temperatura ambiente; 4 °C: almacenamiento de las cápsulas en condiciones de refrigeración.....	36
<b>Figura 5.</b> Diseño experimental para la producción y conservación de cápsulas en diferentes condiciones de temperatura. TA: almacenamiento de cápsulas a temperatura ambiente; 4 °C: almacenamiento de las cápsulas en condiciones de refrigeración.....	38
<b>Figura 6.</b> Digestión <i>in vitro</i> de microorganismos probióticos encapsulados y células sin encapsular en soluciones gástricas e intestinales simuladas. JGS: jugo gástrico simulado. JIS: Jugo intestinal simulado. ....	41
<b>Figura 7.</b> Digestión <i>in vitro</i> en soluciones gástricas e intestinales simuladas de las CAP11. JGS: jugo gástrico simulado; JIS: jugo intestinal simulado. ....	44
<b>Figura 8.</b> Sistema de crianza a estaca con corredera. Se observa que el ternero se encontraba unido a través de una cadena a un cable guía. ....	45
<b>Figura 9.</b> Diferentes tipos de cápsulas. A) Cápsulas reincubadas recubiertas con quitosano (RC R); Cápsulas reincubadas sin recubrimiento con quitosano (RC NR). B) Cápsulas concentradas recubiertas con quitosano (CC R); Cápsula concentrada sin recubrimiento con quitosano (CC NR). C) Cápsulas con crioprotectores (Gly12,5X: cápsulas concentradas 12,5X con glicerol; Per12,5X:	

cápsulas concentradas 12,5X con permeado de suero; Con12,5X: cápsulas de control 12,5X sin crioprotectores).....	65
<b>Figura 10.</b> Efecto de las sustancias crioprotectoras durante el proceso de liofilización. Las letras en minúsculas representan la diferencia de recuento microbiana entre las cápsulas dentro de cada etapa del proceso. Las letras mayúsculas representan diferencia de recuento en las cápsulas entre las distintas etapas del proceso.....	67
<b>Figura 11.</b> Viabilidad bacteriana de cápsulas hechas con diferentes medios crioprotectores almacenados a 4°C (figura A) y almacenadas a TA (figura B.). La línea punteada representa el NMS. ....	68
<b>Figura 12.</b> Viabilidad bacteriana de cápsulas Gly12,5X almacenadas a -20°C. La línea punteada representa el NMS.....	69
<b>Figura 13.</b> Pérdida de viabilidad de <i>L. casei</i> y <i>L. plantarum</i> encapsulados (Gly12,5X) y sin encapsular (CSE) en condiciones gástricas simuladas durante 6 h. La imagen muestra el desvío estándar ( $\pm$ ). CGS: condiciones gástricas simuladas. ....	70
<b>Figura 14.</b> Recuento microbiano de cápsulas almacenadas a -20 °C, 4 ° C y TA durante 84 días. La línea punteada representa el NMS. Datos representados como media $\pm$ desviación estándar.....	71
<b>Figura 15.</b> Pérdida de viabilidad de <i>L. casei</i> y <i>L. plantarum</i> encapsulados (Gly12,5X) y sin encapsulados (CSE) en condiciones gástricas simuladas durante 6 h. La imagen muestra la media y el desvío estándar ( $\pm$ ). ....	72
<b>Figura 16.</b> Recuento microbiano de las poblaciones de BAL e inóculo bacteriano (A), Levaduras (B) y Coliformes (C) en el grupo probiótico (G-P) y grupo control (G-C). ....	75
<b>Figura 17.</b> Score de materia fecal de los terneros tratado con probióticos (G-P) y no tratados con probióticos (G-C) durante las 8 semanas de ensayo. ....	76
<b>Figura 18.</b> Peso (A), Perímetro tracio (B) y Altura (C) de los terneros tratado con probióticos (G-P) y no tratados con probióticos (G-C) durante las 8 semanas de ensayo. ....	77
<b>Figura 19.</b> (A) Ganancia de peso y (B) Eficiencia de consumo de los terneros del G-C y G-P durante 8 semanas de ensayo. ....	78
<b>Figura 21.</b> Dendrograma de los perfiles DGGE de la comunidad bacteriana de la materia fecal de los terneros tratado con probióticos (G-P) y no tratados con probióticos (G-C) en el día 0 de ensayo. ....	79

- Figura 22.** Dendrograma de los perfiles DGGE de la comunidad bacteriana de la materia fecal de los terneros tratado con probióticos (G-P) y no tratados con probióticos (G-C) en el día 30 de ensayo. .... 79
- Figura 23.** Dendrograma de los perfiles DGGE de la comunidad bacteriana de la materia fecal de los terneros tratado con probióticos (G-P) y no tratados con probióticos (G-C) en el día 51 de ensayo. .... 80
- Figura 24.** DGGE de ADN extraído de la materia fecal de los terneros tratado con probióticos (G-P) y no tratados con probióticos (G-C). (A) día 0 G-C, (B) día 0 G-P, (C) día 30 G-C, (D) día 30 G-P día, (E) día 51 G-C y (F) día 51 G-P. (P) patrón con bacterias de referencia (*L. plantarum* DSPV 354T, *L. salivarius* DSPV 001, *L. casei* DSPV 318T, *C. jejuni* C173 y *S. enteritidis* 421E)..... 81
- Figura 25.** Áreas de inhibición producida por los ELCsn y ELCn de *L. casei* DSPV 318T y *L. plantarum* DSPV 354T sobre *C. jejuni* NCTC 11168. .... 85
- Figura 26.** Promedio diario de la temperatura rectal de los terneros infectados con *C. jejuni* NCTC 1168 con una dosis única de 10 Log UFC (G-C10), terneros infectados con *C. jejuni* NCTC 1168 con una dosis única de 6 Log UFC (G-C6) y terneros no infectados (G-C). La flecha indica el día en el cual se realizó la inoculación con el patógeno. Las líneas punteadas indican los límites inferior y superior de los valores normales de temperatura. .... 87
- Figura 27.** Score de materia fecal de los terneros infectados con *C. jejuni* NCTC 1168 con una dosis única de 10 Log UFC (G-C10), terneros infectados con *C. jejuni* NCTC 1168 con una dosis única de 6 Log UFC (G-C6) y terneros no infectados (G-C)..... 88
- Figura 28.** Peso de los terneros del grupo suplementado con BAL e infectado con *Campylobacter* (G-P), grupo infectado con *Campylobacter* y no suplementado con probióticos (G-C10) y los terneros del grupo no suplementado con probiótico y no infectado con *Campylobacter* (G-C). .... 89
- Figura 29.** Ganancia de peso de los terneros del grupo suplementado con BAL e infectado con *Campylobacter* (G-PC), grupo infectado con *Campylobacter jejuni* y no suplementado con probióticos (G-CP) y los terneros del grupo no suplementado con probiótico y no infectado con *Campylobacter jejuni* (G-C). .... 90
- Figura 30.** Eficiencia de alimentación de los terneros del grupo suplementado con BAL e infectado con *Campylobacter* (G-PC), grupo infectado con *Campylobacter jejuni*

y no suplementado con probióticos (G-CP) y los terneros del grupo no suplementado con probiótico y no infectado con *Campylobacter jejuni* (G-C)..... 90

**Figura 31.** Promedio de temperatura de los terneros del grupo suplementado con BAL e infectado con *Campylobacter* (G-PC), grupo infectado con *Campylobacter jejuni* y no suplementado con probióticos (G-CP) y los terneros del grupo no suplementado con probiótico y no infectado con *Campylobacter jejuni* (G-C). La flecha indica el día en el cual se realizó la inoculación con el patógeno. Las líneas punteadas indican los límites inferior y superior de los valores normales de temperatura. .... 91

**Figura 32.** Temperatura de los terneros del grupo suplementado con BAL e infectado con *Campylobacter* (G-PC) (A), grupo infectado con *Campylobacter jejuni* y no suplementado con probióticos (G-CP) (B) y los terneros del grupo no suplementado con probiótico y no infectado con *Campylobacter jejuni* (G-C) (C). Las líneas punteadas indican los límites inferior y superior de los valores normales de temperatura. .... 93

**Figura 33.** Score de materia fecal de los terneros del grupo suplementado con BAL e infectado con *Campylobacter* (G-PC), grupo infectado con *Campylobacter jejuni* y no suplementado con probióticos (G-CP) y los terneros del grupo no suplementado con probiótico y no infectado con *Campylobacter jejuni* (G-C). .... 94

**Figura 34.** Parámetros sanguíneos (serie eritrocítica) en terneros infectados con *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 (G-CP), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de  $10^{11}$  UFC e infectados con *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 (G-PC) y no suplementados (G-C). 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. La flecha indica el día de la infección con el patógeno. A) Hematocrito. B) Eritrocitos. C) Hemoglobina..... 98

**Figura 35.** Parámetros sanguíneos (serie leucocítica) en terneros infectados con *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 (G-CP), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de  $10^{11}$  UFC e infectados con *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 (G-PC) y no suplementados (G-C). 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. La flecha indica el día de la infección con el patógeno. A) Leucocitos totales. B) Linfocitos. C) Monocitos. D) Granulocitos..... 99

- Figura 36.** Dendrograma de los perfiles DGGE de la comunidad bacteriana de la materia fecal de los terneros tratado con probióticos e infectados con *Campylobacter* (G-PC) terneros infectados con *Campylobacter* (G-CP) y grupo control (G-C). ..... 100
- Figura 37.** DGGE de ADN extraído de la materia fecal de los terneros suplementado con BAL e infectado con *Campylobacter jejuni* (G-PC), grupo infectado con *Campylobacter jejuni* y no suplementado con probióticos (G-CP) y los terneros del grupo no suplementado con probiótico y no infectado con *Campylobacter* (G-C). (A) día 0 G-C, G-PC y G-CP, (B) día 21 G-C, G-PC y G-CP, (C) día 42 G-C, G-PC y G-CP. (P) patrón con bacterias de referencia (*L. plantarum* DSPV 354T, *L. salivarius* DSPV 001, *L. casei* DSPV 318T, *C. jejuni* C173 y *S. enteritidis* 421E). ..... 101
- Figura 38.** Recuento microbiano vs proporción de animales infectados con *Campylobacter* durante 42 días de ensayo. .... 105
- Figura 39.** Recuento microbiano de *Campylobacter jejuni* y temperatura corporal de los terneros durante 42 días de ensayo. T1, ternero al cual se inoculo  $10^{10}$  UFC (A). T2, T3, T4 terneros que compartían el grupo. Las líneas punteadas representan los límites fisiológicos de temperatura. .... 107

#### IV. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un inóculo de bacterias ácido lácticas (BAL) indígenas con capacidad probiótica capaz de mejorar el estado sanitario y la performance de terneros jóvenes criados artificialmente.

Primero se evaluó la metodología de conservación mediante la encapsulación. El objetivo puntual de esta parte del estudio fue desarrollar una metodología de producción de cápsulas grandes, del tamaño del balanceado suministrado a los terneros, con el fin de poder adicionar el probiótico en el alimento seco. Para este estudio se utilizaron dos cepas probióticas (*L.casei* DSPV 318T, *L. plantarum* DSPV 354T). De estos estudios se obtuvo un protocolo de producción de macrocápsulas de un volumen de 1 ml compuestas de alginato de calcio y un crioprotector que pueden conservar la viabilidad bacteriana por encima del nivel mínimo sugerido a temperatura de refrigeración y congelación por un mínimo de 84 días.

Se realizaron 3 estudios *in vivo* en terneros para evaluar las propiedades probióticas del inóculo probiótico encapsulado. En el primer estudio se estudió el efecto de la suplementación del inóculo probiótico sobre la performance de los terneros. La utilización del inóculo encapsulado, en las condiciones que se realizó el ensayo, no tuvo influencia sobre la performance de crecimiento y salud de los animales, sin embargo modificó la microbiota intestinal aumentando las especies bacterianas benéficas. En el segundo ensayo se realizó un modelo de infección para aprender sobre el comportamiento de *Campylobacter jejuni* NNCTC 11168 en los terneros. El tercer ensayo se evaluó al mismo inóculo probiótico frente a un desafío frente a este patógeno. Aunque el probiótico no fue capaz de contrarrestar la infección por *C. jejuni* si fue capaz de disminuir su excreción en la materia fecal de los terneros en los primeros días de la infección.

## **ABSTRACT**

The objective of this work is the development of an inoculum of lactic acid bacteria (LAB) with probiotic capacity to improve the health status and performance of young calves artificially bred.

In the first place, the conservation methodology was evaluated by encapsulation. The specific objective of this part of the study was the development of a methodology for the production of macrocapsules, with a similar size of the food started supplied to the calves, in order to be able to add the probiotic in the dry food. For this study two probiotic strains were used (*L. casei* DSPV 318T, *L. plantarum* DSPV 354T). From these studies we obtained a protocol for the production of macrocapsules with a volume of 1 ml composed of calcium alginate and a cryoprotectant that can preserve bacterial viability above the minimum suggested level at refrigeration temperature and freezing for a minimum of 84 days.

Subsequently, 3 *in vivo* studies were performed on calves to evaluate the probiotic properties of the encapsulated probiotic inoculum. In the first study, the effect of probiotic inoculum supplementation on calf performance was studied. The use of the encapsulated inoculum, under the conditions that the test was carried out, had no influence on the performance of growth and health of the animals, however it modified the intestinal microbiota increasing the beneficial bacterial species. In the second trial, an infection model was developed to learn about the behavior of *Campylobacter jejuni* NNCTC 11168 in calves. The third trial was evaluated with the same probiotic inoculum in a challenge against this pathogen. Although the probiotic was not able to counteract the infection by *C. jejuni*, it was able to decrease its excretion in the fecal matter of the calves in the first days of infection.

**Palabras clave: bacterias ácido lácticas - probióticos – *Campylobacter jejuni***

# 1. Introducción



### **1.1.Seguridad de la Cadena Agroalimentaria**

La alimentación del ser humano ha sido un eje central durante su evolución, ya sea para cubrir sus requerimientos biológicos o para su progreso y desarrollo económico.

Desde su origen hasta el periodo neolítico los hombres fueron cazadores y recolectores nómadas. Cada individuo se encargaba de su alimentación, a la cual destinaban gran parte de su tiempo y en la cual ejercía las funciones de obtención de materias primas hasta su consumo (De Heinzelin y col. 1999).

A partir del período neolítico, el hombre se volvió sedentario y vivió uno de los primeros grandes cambios sociales en su historia. La ganadería y la agricultura surgen en este período y con ellos aparece la distribución del trabajo, llevando a la especialización de los trabajadores en diversas tareas que no sólo involucraban la alimentación. Como consecuencia de esto el humano comienza a dedicarle tiempo a otras actividades que no están relacionadas con la alimentación. Surge en este periodo el arte culinario con diversificación de la forma de preparar los alimentos y con ella surgen nuevas enfermedades relacionadas a la alimentación.

En las últimas décadas el aumento progresivo de la población mundial debido a las mejoras en las condiciones de vida produjo un aumento en las necesidades alimenticias de la población. Para satisfacer a los consumidores la producción de alimentos ha evolucionado convirtiéndose en un sistema complejo que se caracteriza por un proceso de sucesivos pasos como la obtención de la materia prima, la transformación, distribución, comercialización y la llegada del alimento al consumidor. Este encadenamiento productivo se denomina cadena agroalimentaria y cada etapa de esta, funciona en forma integrada con las demás para alcanzar un objetivo en común que es la eficiencia y seguridad de los alimentos. A pesar que la utilización de tecnología en la cadena agroalimentaria ha aumentado la producción de alimentos nuevos factores atentan contra la inocuidad de los alimentos (Frizzo y col., 2013).

El actual sistema de producción de alimentos se ha desarrollado en respuesta a la demanda de la población. La urbanización y la modificación del estilo de vida de la población, han llevado a cambios en los hábitos de consumo aumentando el número de personas que compran y comen alimentos preparados en lugares públicos. La globalización ha potenciado la demanda de una mayor variedad de alimentos haciendo la cadena alimentaria mundial cada vez más larga y compleja (OMS 2002). El

incremento de la cantidad de alimentos exigidos por los mercados ha sido una de las causas más importantes para mejorar la tecnología aplicada en la productividad de la cadena alimentaria, y que ha logrado mejorar la cantidad y calidad de los productos.

A pesar de los avances en la materia de producción de alimentos, los organismos oficiales de control siguen decomisando importantes volúmenes de alimentos por pérdidas de calidad, riesgo sanitario o por estar involucrados en brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs), lo cual no se condice con los avances logrados (Gustavsson y col., 2012; ONU, 2012). Las fallas que se dan en diferentes eslabones de la cadena alimentaria son variadas, caracterizándose por la responsabilidad que tienen en las mismas el recurso humano poco calificado y los elevados costos que provocan (Frizzo y col., 2013).

El suministro de alimentos inocuos fortalece las economías nacionales, el comercio, el turismo, contribuye a la seguridad alimentaria y nutricional, sirviendo de fundamento para el desarrollo sostenible. La estrecha relación entre la salud y el desarrollo económico debe tenerse asimismo en cuenta en el contexto de unos sistemas de inocuidad de los alimentos más globalizados (OMS 2012). Por este motivo los organismos estatales de control trabajan para mejorar la calidad de los productos alimentarios mejorando la seguridad de los mismos. La seguridad alimentaria se puede definir como "el conjunto de acciones o actividades que se realizan en el flujo de producción de alimentos, desde la producción de materias primas hasta el consumo del producto elaborado, tendientes a garantizar que el mismo cumpla con las propiedades de ser inocuo, nutritivo, íntegro y legítimo".

El gran problema que enfrentan las cadenas agroalimentarias son las enfermedades transmitidas por los alimentos. Estas enfermedades son generalmente de carácter infeccioso o tóxico y son causadas por bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas que penetran en el organismo a través del agua o los alimentos contaminados. Teniendo en cuenta que cada eslabón de la cadena es interdependiente y muchos peligros se diseminan desde la misma producción primaria a lo largo de toda la cadena de producción resulta compleja la eliminación de los diferentes peligros (patógenos) antes del consumo y este encadenamiento favorece la contaminación cruzada en los sitios de la góndola y el hogar.

La contaminación de los canales de bovinos por *Campylobacter* termotolerantes, representa el ejemplo más común de contaminación a lo largo de la cadena agroalimentaria, siendo este patógeno el peligro microbiológico que más se encuentra

implicado en brotes de ETAs tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (Moore y col., 2005). Este microorganismo se elimina relativamente fácil a través de una correcta cocción en el hogar. Sin embargo la eliminación o disminución de *Campylobacter* termotolerantes en los sistemas productivos primarios presenta una gran dificultad, lo que hace imposible impedir la contaminación de las canales en el frigorífico (Zbrun y col., 2013). Estos inconvenientes llevan, por un lado, a tomar medidas durante la comercialización y manipulación final previa a la cocción para disminuir la contaminación cruzada y por otro lado a la búsqueda de medidas de intervención que reduzcan significativamente la carga del patógeno en puntos anteriores de la cadena de producción.

En el caso de los peligros químicos, la utilización de antibióticos suele ser el más común. Los antibióticos son utilizados como una estrategia en la prevención de problemas sanitarios durante la producción primaria y aunque han posibilitado el incremento significativo de la producción de alimentos en su etapa primaria, los problemas que han generado han sido importantes y existe una fuerte presión de los consumidores y organismos de control para prohibir su uso (Rosmini y col., 2004). La Unión Europea ha dado pasos importantes en este sentido (UE, 2003). Es por ello que se vienen estudiando desde hace unos años diferentes estrategias alternativas a los antibióticos enfocadas a mejorar la inocuidad desde la producción primaria de alimentos, las cuales tienen por finalidad reducir la diseminación de patógenos alimentarios a través de su cadena de producción. Hay una asociación directa entre el manejo ante mortem y la carga microbiana de las materias primas alimentarias de origen animal y existen estrategias pre-faena que permiten reducir la contaminación de estas materias primas, lo cual está íntimamente relacionadas con las condiciones de seguridad alimentaria del alimento que se obtendrá a partir de ellas (Frizzo y col., 2013).

## **1.2. Historia y aspectos generales del género *Campylobacter***

El primer aislamiento de *Campylobacter* fue realizado en 1909, en muestras provenientes de abortos ovinos por McFadyean y Stockman. En 1931 se describe la especie más estudiada y predominante en gastroenteritis humana, *Campylobacter jejuni*, a partir de muestras de origen vacuno en animales afectados por diarrea (Jones y col., 1931). En 1938 se realizó el primer aislamiento de una infección en humanos por *Campylobacter*, proviene del estudio de un brote, asociado al consumo de leche en

Estados Unidos. Posteriormente, el desarrollo y la utilización de medios de cultivo selectivos han llevado al reconocimiento de *Campylobacter* como una de las principales causas de enfermedades diarreicas en países desarrollados (Blaser y col., 1978).

Las bacterias pertenecientes al género *Campylobacter* son bacilos delgados Gram negativos con un tamaño que oscila entre 0,5 - 0,8  $\mu\text{m}$  de longitud y 0,2 - 0,5  $\mu\text{m}$  de ancho. Su morfología puede variar entre vibriónica (bacilos curvados), espirilar, en forma de "S" durante el crecimiento en fase logarítmica y cocoide o esféricos a medida que los cultivos envejecen (Rosler 2014). Son bacterias móviles, con uno o más flagelos en uno o ambos extremos de la célula. Los flagelos son responsables de su movimiento característico en forma de sacacorchos o zig-zag (Rossler, 2014).

Las especies de *Campylobacter* crecen en ambientes microaerofílicos, necesitan 3-5% de  $\text{O}_2$ , 2-10% de  $\text{CO}_2$  y 85%  $\text{N}_2$  (Rossler, 2014). Todas las especies pueden desarrollar a 37°C, pero existen especies termotolerantes cuya temperatura óptima de crecimiento es 42°C. Entre las especies termotolerantes de *Campylobacter* se encuentran aquellas que son patogénicas para el hombre (EFSA, 2010).

El género *Campylobacter* comprende 17 especies y 6 subespecies, de las cuales las detectadas con más frecuencia en enfermedades humanas son *C. jejuni* (subespecie *jejuni*) y *C. coli*. En pacientes con enfermedades diarreicas también se han aislado otras especies, como *C. lari* y *C. upsaliensis*, pero son menos frecuentes (Kaakoush y col., 2015).

### **1.3. Epidemiología**

#### **1.3.1. Antecedentes**

Según la Organización mundial de la salud (OMS) *Campylobacter* termotolerantes es una de las cuatro principales causas mundiales de enfermedad diarreica y está considerada como la causa bacteriana más frecuente de gastroenteritis en el mundo. *Campylobacter* es considerada como el primer agente etiológico de diarrea en el ser humano en los países desarrollados y el segundo o tercero en los países en vías de desarrollo (FAO/ WHO, 2009). Es muy probable que esto sea debido a deficiencias en el diagnóstico etiológico de las diarreas en estos últimos países.

En la última década se ha reportado un aumento en la incidencia global de campilobacteriosis (Kaakoush y col., 2015). La Red de Vigilancia Activa de las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos de EE.UU. informó que entre el año

1996 y 2012 hubo una incidencia anual de 14,3 cada 100.000 habitantes para la infección por *Campylobacter* termotolerantes (Gilliss y col., 2013). En el año 2012 se produjo un aumento del 14% en la incidencia de campilobacteriosis en comparación con el período 2006-2008 en los EE.UU. (Kaakoush y col., 2015). Además, este microorganismo fue la principal causa de gastroenteritis asociada a viajes entre 2004 y 2009 en ese país, representando el 41,7% de los casos de diarrea (3.445 de 8.270 casos notificados) (Kendall y col., 2012). Por otro lado, se estimaron que los costos anuales de la campilobacteriosis serían de 1.700 millones de dólares en los Estados Unidos (Hoffmann y col., 2012).

En México, *C. jejuni* fue la causa más común de gastroenteritis aguda en lactantes y preescolares en 2006 y 2007 (aislada en 15,7% de los 5.459 casos) (Larrosa-Haro y col., 2010). La campilobacteriosis es también muy común en los niños de Guatemala, con tasas de incidencia de 185,5 a 1288,8 cada 100.000 niños (Benoit y col., 2013).

Por otro lado, en la Unión Europea se informó que en los últimos años la campilobacteriosis humana se ha convertido en la zoonosis más frecuentemente reportada (EFSA, 2013). La incidencia de infecciones por *Campylobacter* termotolerantes fue de 29,9 cada 100.000 habitantes en 2009 (con las menores incidencias en Finlandia y Suecia y las más altas en Bulgaria) (Havelaar y col., 2013). Hacia 2011 los casos de campilobacteriosis ascendieron a 220.200 con una tasa de incidencia de 50,3 casos cada 100.000 personas (EFSA, 2013). Tras más de una década de una tendencia ascendente y un coste estimado de 2,4 billones de euros al año, actualmente las notificaciones por campilobacteriosis humana se han estabilizado en Europa (EFSA, 2015).

La campilobacteriosis es la infección transmitida por los alimentos más notificada en Australia, con 16.968 casos notificados (112,3 casos cada 100.000 casos notificados de infección alimentaria) en 2010 (OzFoodNet Working group 2009 OzFoodNet Working group 2012). En 2010, la prevalencia de infecciones por *Campylobacter* termotolerantes aumentó un 6% en comparación con los datos de 2008 y 2009 (OzFoodNet Working group, 2009; OzFoodNet Working group, 2012).

Los datos más recientes de Oriente Medio muestran que las especies de *Campylobacter* termotolerantes son una causa importante y creciente de gastroenteritis en esta región. Por ejemplo, la incidencia anual de campilobacteriosis en Israel aumentó de 31,04 casos cada 100.000 habitantes en 1999 a 90,99 casos

cada 100.000 habitantes en 2010, siendo los niños menores de 2 años en donde se da la mayor incidencia (356,12 casos cada 100.000 habitantes) (Dayan y col., 2010; Kaakosush y col., 2015).

Los datos de un número limitado de países en África han indicado que la infección por *Campylobacter* termotolerantes es más prevalente en la población pediátrica. Un estudio de 10 años (1997-2007) encontró que *C. jejuni* y *C. coli* se detectaron en el 21% (415/1.941 niños) de niños hospitalizados con diarrea, representando el primero el 85% de todos los casos de campilobacteriosis (Mason y col., 2010).

En la India, un estudio realizado en un período comprendido entre enero de 2008 y diciembre de 2010, arrojó que el 7% (222/3.186 pacientes) de los pacientes hospitalizados con gastroenteritis eran positivos para las especies de *Campylobacter* termotolerantes, representando *C. jejuni* un 70% de los aislamientos. La campilobacteriosis también ha sido la causa más común de diarrea en niños menores de 5 años en esa región (Mukherjee y col., 2013).

En Argentina, según los datos del Sistema Nacional de Vigilancia del Ministerio de Salud de la Nación, las diarreas agudas ocurren en una tasa de 1.575 casos cada 100.000 personas y *Campylobacter* termotolerantes es el cuarto agente etiológico en orden de importancia según casos reportados (Boletín de Vigilancia, Ministerio de Salud Argentina, 2016). Sin embargo, la prevalencia de la enfermedad es posible que esté subestimada debido a que el diagnóstico etiológico de las diarreas en nuestro país es muy bajo y no todos los laboratorios de análisis tienen la capacidad para aislar a *Campylobacter* termotolerantes (Zbrun y col., 2013).

Las diferencias en la incidencia y el número de casos reportados de diferentes países o regiones dentro del mismo país pueden variar sustancialmente (Kaakoush y col., 2015). Es probable que estas variaciones surjan, en parte, de las diferencias en la sensibilidad de las metodologías de detección, sesgo de vigilancia, prácticas y disponibilidad de reservorios naturales para las especies de *Campylobacter* termotolerantes en estas regiones. Además, los casos notificados de infecciones por *C. jejuni* y *C. coli* probablemente representan sólo la punta del iceberg debido a la subnotificación (Wagenaar y col., 2013).

Otro factor que se ha hipotetizado para influir en la prevalencia de infecciones por *Campylobacter* es la inmunidad a nivel de población (Havelaar y col., 2009). Ello refiere a la respuesta inmune del huésped contra una infección dentro de una población

que puede proporcionar protección contra la transmisión de una infección y/o enfermedad para individuos no protegidos. A nivel de población, esto puede tener impactos en la epidemiología y en la evaluación del riesgo de campilobacteriosis (Havelaar y col., 2009).

La infección por *Campylobacter jejuni* es una de las enfermedades infecciosas más extendidas del siglo pasado y lo que va del actual. Los datos expuestos anteriormente indican que la incidencia y prevalencia de campilobacteriosis ha aumentado en los países desarrollados y en desarrollo en los últimos 10 años. El dramático aumento en América del Norte, Europa y Australia es alarmante, y los datos de partes de África, Asia y Medio Oriente indican que la campilobacteriosis es endémica en estas áreas (Havelaar y col., 2009).

### **1.3.2. Reservorio**

Las especies de *Campylobacter* termotolerantes son habitantes normales del tracto intestinal de los animales domésticos o salvajes, incluyendo los animales utilizados para la producción de alimentos (bovinos, porcinos, aves de corral y ovinos) siendo los animales una fuente potencial de contaminación del ambiente, el agua y los alimentos (Humphrey col., 2007).

Los animales adquieren *Campylobacter* a través del agua, el alimento, del medio ambiente contaminado por parte de los operarios, aves salvajes, roedores y moscas entre otros (ICMSF, 1998). Una vez que el animal se contagia, los animales eliminan *Campylobacter* a través de la materia fecal, contaminando el agua, el alimento y la cama (ICMSF, 1998).

Hasta ahora, las campilobacteriosis humanas se han atribuido en gran medida a las aves de corral (Chatre y col., 2010), y en varios estudios se ha demostrado una asociación significativa entre las infecciones por *Campylobacter* termotolerantes y el manejo o consumo de carne de aves de corral mal cocida (Corry y Atabay 2001). Sin embargo, el número de casos de infección por *Campylobacter* relacionado al ganado bovino por exposición directa a heces, consumo de carnes mal cocidas o ingestión de leche cruda es cada vez más frecuente (Chatre y col., 2010).

Se estima que alrededor del 70,9% de los casos humanos se atribuyeron al consumo de carne de pollos, el 19,3% al consumo de carne de bovinos y el 8,6% al contacto con perros (Kittl y col., 2013). Varios investigadores han reportado que la

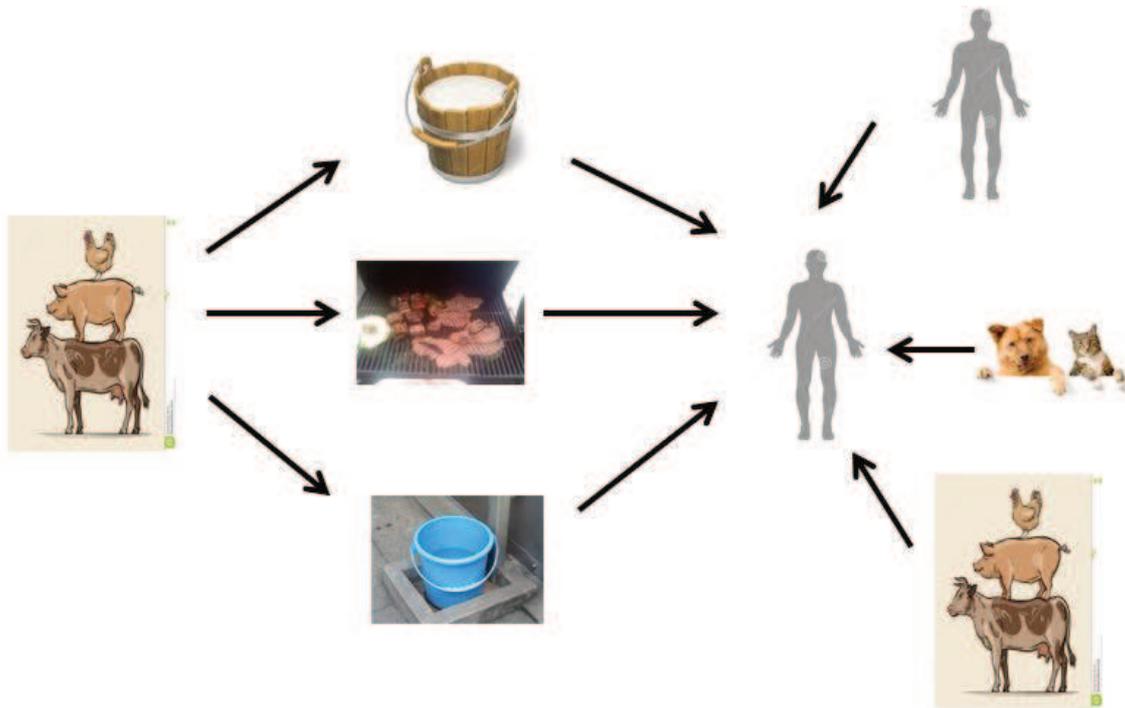
prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en los rodeos de ganado bovino puede llegar a ser del 89% (Stanley y Jones 2003; Bywater y col., 2004; Englen y col., 2007). Chatre y col. (2010) realizaron un ensayo de prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en diferentes categorías de bovinos y encontraron que la prevalencia en terneros fue del 39,1%, en bovinos jóvenes fue del 6% y en vacas sacrificadas fue del 4,6%. Resultados similares fueron descritos por Stanley y Jones (2003), que encontraron que la prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes fue hasta 100 veces más alta en terneros que en ganado adulto.

El inicio de la cadena agroalimentaria de la carne bovina comienza con la cria de terneros en sistemas extensivos donde el contacto entre animales no es tan estrecho. Una vez realizado el destete un número alto de estos animales son llevados a sistemas de engordes a corral donde el espacio se encuentra limitado y conviven un gran número de animales en un espacio reducido. Además, el origen de los animales suele resultar de diferentes áreas geográficas. El reagrupamiento con animales provenientes de otras áreas y que eliminen *Campylobacter* termotolerantes en sus heces lleva a que los terneros se infectan primero horizontalmente y luego se reinfectan constantemente mediante el contacto con un ambiente contaminado por sus propias heces o de fuentes externas como el alimento o el agua. Por ello, la prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes suele ser mas elevada en los sistemas intensivos de crianza de bovinos. En un estudio realizado en animales en feedlot se indicó que más del 80 % del ganado contenía *Campylobacter* termotolerantes (Inglis y col., 2003).

### **1.3.3. Transmisión al humano**

La causa más común por la cual el humano contrae *Campylobacter* termotolerantes (figura 1) esta dada por el consumo de carne crudas o insuficientemente cocidas, o indirectamente por contaminación cruzada de alimentos preparados o listos para el consumo por medio de utensilios de cocina o superficies contaminadas con *Campylobacter* termotolerantes (Chai y col., 2008).

El humano también se puede infectar a través del consumo de aguas contaminadas o la ingestión de leche cruda (Peterson, 2003). Por otro lado, el contacto directo con personas, animales de consumo o mascotas infectadas con *Campylobacter* termotolerantes pueden ser causa de transmisión del agente (Chatre y col., 2010).



**Figura 1** Reservorios y vías de transmisión asociadas con las especies de *Campylobacter* termotolerantes

#### 1.3.4. Enfermedad en el humano

La dosis infecciosa necesaria de *Campylobacter* termotolerantes para los seres humanos es baja y se estima que se necesitan entre 800-1000 UFC para causar enfermedad (Nachamkin y Blases 1998).

La enfermedad que este microorganismo causa es una enteritis inflamatoria que afecta inicialmente el intestino delgado y posteriormente el colon y el recto (Black y col., 1988). Existen dos mecanismos por los cuales *Campylobacter* termotolerantes puede inducir la enfermedad. El primero es mediante la adhesión del microorganismo al intestino y la producción de toxinas que alteran la capacidad de reabsorción del fluido intestinal provocando la diarrea (Wassenaar, 1997). El segundo, es mediante la invasión y replicación dentro de la mucosa intestinal acompañada por una respuesta inflamatoria que resulta en una diarrea sanguinolenta o diarrea inflamatoria. Esta última sugiere que la infección puede provocar un fuerte daño intestinal (Wassenaar, 1997).

Los síntomas son diarrea, fiebre, dolor abdominal y dolor de cabeza (Altekruse y col., 1999). El período de incubación puede ser variable de 1 a 11 d (Havelaar y col., 2000). La enteritis tiene una duración de una semana aproximadamente y generalmente se autolimita (Havelaar y col., 2000). La bacteria se elimina con las heces durante 2 o 3 semanas después de cesar los síntomas (Kapperud y col., 1992). Sin embargo, han sido

descriptas pero de manera infrecuente (Borch y col., 2002) un número de complicaciones postdiarréicas (infecciones y secuelas extraintestinales). Estas pueden ser: infección en las vías urinarias, meningitis, endocarditis, peritonitis, aborto, artritis reactiva y Síndrome de Guillain-Barré (Altekruse y col., 1999).

### **1.3.5. Enfermedad en los animales**

La campilobacteriosis gastrointestinal, causada por especies de *Campylobacter* termotolerantes, pueden afectar a mascotas (perros y gatos), animales de consumo (bovinos, ovinos, porcinos y pollos parrilleros) y animales silvestres. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son más graves en los animales jóvenes que en los adultos (Merck 2002).

En las mascotas como en los perros, los síntomas más comunes son la diarrea cargada de mucosidad, líquida, con o sin sangre que dura de 3 a 7 d, disminución del apetito y ocasionalmente vómitos. En algunos animales puede observarse la presencia de diarrea intermitente durante un periodo mayor a las dos semanas o incluso meses. Las lesiones mas comunes que se pueden observar suelen ser congestión y edema de colon con reducción de la altura del epitelio y engrosamiento de la mucosa por hiperplasia de las glándulas epiteliales (Merck 2002).

En los animales de consumo como los terneros, *C. jejuni*. causa una diarrea mucoide, con presencia ocasional de sangre y fiebre. La enfermedad puede ser leve y resultar inapreciable, sin fiebre y puede manifestarse sólo con apatía leve y heces blandas con ocasionales hebras de moco. A la necropsia se puede observar una enteritis catarral difusa o hemorrágica grave en el yeyuno e íleon (Radostis y col., 1999).

### **1.4. Utilización de Antibióticos para prevenir la transmisión de patógenos**

Los antibióticos han sido una importante herramienta, desde su aparición, tanto para la prevención como el tratamiento de diferentes enfermedades infecciosas en animales y el hombre. La incorporación de antibióticos, en los alimentos balanceados de terneros, para disminuir la aparición de patógenos y como factores de crecimiento es una práctica muy difundida en las explotaciones agropecuarias (Noori y col., 2016). Se ha comprobado que la utilización de antibióticos favorece la performance productiva de los terneros mejorando la conversión alimenticia, la ganancia de peso y reduciendo las diarreas (Signorini y col., 2012; Bayatkouhsar y col., 2013).

Sin embargo, esta práctica presenta algunos inconvenientes. Por un lado, muchos de los antibióticos utilizados en los sistemas de producción animal pertenecen a la misma familia de los antibióticos que son utilizados en medicina humana. Por otro lado, la utilización indiscriminada de antibióticos lleva a la aparición de cepas resistentes a dichos fármacos. Esta situación dificulta la antibiótico terapia, tanto en animales como en humanos, para aquellos patógenos que son zoonóticos, ocasionando grandes pérdidas económicas en los sistemas productivos (Abe y col., 1995) y graves problemas de salud en los consumidores (Bayatkouhsara y col., 2013). Debido a estos problemas, los organismos oficiales de control de algunos países han restringido la utilización de antibióticos en la producción primaria. Desde 2006, la Unión Europea instauró la total prohibición del uso de antibióticos promotores de crecimiento en la alimentación animal (EFSA, 2007). En nuestro país, el Servicio Nacional de Sanidad y calidad Agroalimentaria, prohibirá a partir de enero de 2019 el uso y comercialización de alimentos comerciales que posean medicamentos para la alimentación de animales de consumo (SENASA, 2015).

A nivel mundial, el aumento en la proporción de cepas de *Campylobacter* termotolerantes resistentes a los agentes antimicrobianos se ha dado de manera acelerada (Enberg y col., 2001; Moore y col., 2006; Alfredson y Korolik, 2007; Luangtongkum y col., 2009) lo que pone en evidencia la necesidad de un sistema de control en el uso de antibióticos en medicina veterinaria y un sistema de vigilancia para estos microorganismos.

El 27 de febrero de 2017 la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó la primera lista de «patógenos prioritarios» resistentes a los antibióticos, en la cual se incluyeron las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana. Esta lista se divide en tres categorías según la peligrosidad para la salud humana y la resistencia a los antibióticos: Prioridad Crítica (aquellas bacterias que poseen resistencia a un elevado número de antibióticos como los carbapenémicos y las cefalosporinas de tercera generación), Alta y Media (aquellas bacterias con farmacorresistencia creciente y porque provocan enfermedades comunes) (Tabla 1).

**Tabla 1** Lista de la OMS de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevas herramientas de control.

Prioridad Crítica	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <i>Acinetobacter baumannii</i>, resistente a los carbapenémicos</li> <li>2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, resistente a los carbapenémicos.</li> <li>3. Enterobacteriaceae, resistentes a los carbapenémicos, productoras de betalactamasas de espectro extendido (ESBL).</li> </ol>
Prioridad Alta	<ol style="list-style-type: none"> <li>4. <i>Enterococcus faecium</i>, resistente a la vancomicina.</li> <li>5. <i>Staphylococcus aureus</i>, resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina.</li> <li>6. <i>Helicobacter pylori</i>, resistente a la claritromicina.</li> <li>7. <b><i>Campylobacter spp.</i></b>, resistente a las fluoroquinolonas.</li> <li>8. Salmonellae, resistentes a las fluoroquinolonas.</li> <li>9. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>, resistente a la cefalosporina, resistente a las fluoroquinolonas</li> </ol>
Prioridad Media	<ol style="list-style-type: none"> <li>10. <i>Streptococcus pneumoniae</i>, sin sensibilidad a la penicilina</li> <li>11. <i>Haemophilus influenzae</i>, resistente a la ampicilina</li> <li>12. <i>Shigella spp.</i>, resistente a las fluoroquinolonas</li> </ol>

La prohibición de antibióticos en los alimentos de los animales de consumo podría tener repercusiones sobre la salud pública, ya que la supresión de estas sustancias con actividad antimicrobiana puede provocar un aumento en la incidencia de determinadas enfermedades en los animales y su consiguiente transmisión a los consumidores. Sin embargo, estos inconvenientes podrían paliarse si se encuentran alternativas eficaces al uso de los antibióticos, es decir, suplementos alimenticios que ejerzan un efecto positivo sobre la producción animal y que no signifiquen un riesgo para la salud humana, animal o para el ambiente.

## **1.5. Estrategias encaminadas a disminuir la incidencia de patógenos alimentarios en producción primaria**

### **1.5.1. Definición de Probiótico**

Los probióticos se definen como “microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio al hospedador” (Hill y col., 2014). Para que ejerzan su efecto beneficioso se sugiere que los probióticos deben estar presentes a un nivel mínimo (NMS) de  $10^6$  o  $10^7$  UFC/g en el alimento a consumir (Tian y col., 2015) o una ingesta diaria de  $10^8$  UFC (Lopez-Rubio y col., 2006).

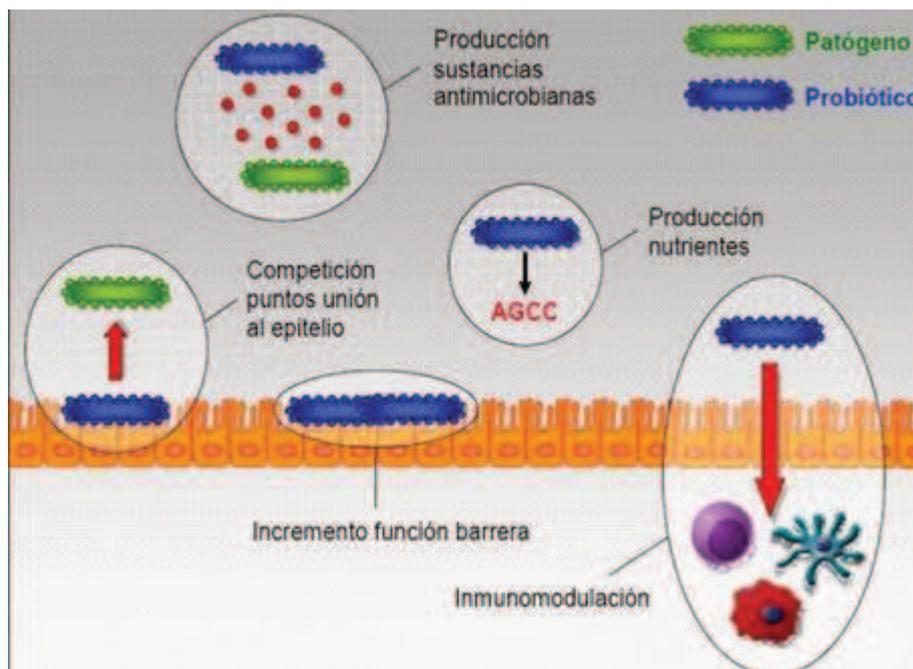
### **1.5.2. Mecanismos de acción de los probióticos**

Los probióticos tienen diferentes mecanismos de acción dentro de los cuales los más importantes son: la competencia por la adhesión a receptores del epitelio intestinal y por los nutrientes, la producción de sustancias antimicrobianas, la estimulación de la inmunidad innata y específica, la mejora de la función de la barrera intestinal y la producción de nutrientes importantes para la función intestinal.

#### **A. Competencia por la adhesión a receptores del epitelio intestinal y por nutrientes**

Para poder ejercer su efecto perjudicial los microorganismos patógenos necesitan unirse a la mucosa intestinal. La capacidad de unión de las bacterias en la superficie de la mucosa depende de la presencia de proteínas de unión al moco en la pared celular (Jensen y col., 2014). Además, el lipopolisacárido bacteriano (LPS) y la sustancia polimérica extracelular (EPS) también fueron reportados como una sustancia vital en el proceso de unión (Santander y col., 2014).

Los microorganismos probióticos tienen la capacidad de competir por estos sitios de unión, y actúan como una barrera defensiva evitando que el epitelio quede disponible para los microorganismos patógenos y reduciendo de esta manera el efecto nocivo de los patógenos (Yirga, 2015).



**Figura 2.** Mecanismos de acción de los probióticos. Adaptado de Probióticos y salud humana, revista MediCiego (Fernández, 2013)

### **B. Producción de sustancias antimicrobianas**

Los microorganismos probióticos producen diversas sustancias que poseen actividad antimicrobiana, las cuales inhiben el crecimiento de microorganismos indeseables. Estas sustancias pueden ser bacteriocinas, ácidos orgánicos, diacetilo y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Las bacteriocinas son proteínas (> 10 kDa) o péptidos pequeños (<10 kDa) con actividad antibacteriana que son producidas por los microorganismos y pueden tener efecto bactericida o bacteriostático y difieren mucho de los antibióticos (metabolitos secundarios) en cuanto a su modo de acción y estructura química (Dobson y col., 2012). El modo de acción de las bacteriocinas varía desde la formación de poros en la membrana celular hasta la actividad de nucleasas contra blancos de ADN y ARN. Las colicinas formadoras de poro son proteínas grandes producidas por bacterias Gram-negativas cuyo tamaño varía desde 449 hasta 629 aminoácidos. Las colicinas con actividad nucleasa tienen un tamaño más variable desde 178 hasta 777 aminoácidos (Muñoz, 2003).

En un principio se creía que las bacteriocinas presentaban acción sobre bacterias filogenéticamente cercanas a la cepa productora (Klaenhammer, 1988). Sin embargo, en la actualidad se ha encontrado evidencia experimental de que presentan acción frente a cepas distanciadas filogenéticamente de las cepas productoras (Pasteris y col., 2014).

Estudios realizados por Line y col. (2008) reportaron que el empleo de una bacteria láctica productora de una bacteriocina redujo la presencia de *Campylobacter spp.* a niveles no detectables cuando se administró en la dieta de pollos parrilleros en una sola dosis.

El mal uso de las bacteriocinas puede generar cepas resistentes a las mismas. Dyke y col. (1998) llevaron a cabo estudios con BAL y demostraron la generación de cepas resistentes a la actividad de bacteriocinas después de haber expuesto a una cepa sensible a 25 ciclos de crecimiento sucesivo en presencia de la bacteriocina. La resistencia a las bacteriocinas puede estar relacionada con cambios en la membrana y en la pared celular, como alteraciones en el potencial eléctrico, fluidez, composición lipídica de la membrana y carga o grosor de la pared celular (Mantovani y Russel, 2001), o incluso una combinación de todos estos factores mencionados. Estos cambios pueden ocurrir después de la exposición celular a concentraciones bajas de bacteriocinas o como parte de una respuesta adaptativa a algún otro estrés (Van Schaik y col., 1999). El tratamiento con una combinación de bacteriocinas podrían reducir la incidencia de resistencia (Bouttefroy y Milliere, 2000; Vignolo y col., 2000).

La producción de  $H_2O_2$  por las bacterias ácido lácticas puede prevenir el crecimiento de patógenos transmitidos por los alimentos y también puede ser beneficioso en la conservación de los alimentos (Dahiya y Speck, 1968). Se ha demostrado que las bacterias ácido lácticas que producen  $H_2O_2$  inhiben el crecimiento de microorganismos psicrotróficos y patógenos a temperaturas de refrigeración. La mayoría de las especies de *Lactobacillus* son capaces de formar peróxido de hidrógeno al oxidar el lactato. El efecto bactericida del  $H_2O_2$  se atribuye a su potente acción oxidante de los lípidos de membrana y la destrucción de la estructura básica de las proteínas (Reis y col.2012).

El diacetilo es un compuesto producido por bacterias lácticas fermentadoras del citrato (Hugenholtz 1993). Posee un efecto antimicrobiano a elevadas concentraciones, mientras que a bajas puede ser metabolizado por algunos microorganismos. El diacetilo inhibe el desarrollo de microorganismos Gram negativos al interaccionar con el metabolismo de la arginina e impedir la utilización de este aminoácido (Jay, 1982).

Los microorganismos probióticos, a través de la producción de de ácidos orgánicos (principalmente ácido láctico, acético y propiónico), pueden disminuir el pH de su entorno. Este pH no es tolerado por ciertos microorganismos patógenos por lo

cual se reduce significativamente su velocidad de multiplicación y mueren al no encontrar un ambiente adecuado (Fuller, 1989).

### **C. Estimulación de la inmunidad innata y específica**

Los microorganismos probióticos tienen la capacidad de alertar el sistema inmunológico y estimular la producción de inmunoglobulinas específicas de tipo A (Rinne y col., 2005) o activar las células K (natural Killer) (Ogawa y col., 2006) y, a través de estas, rechazar microorganismos patógenos. Además los probióticos actúan sobre los leucocitos intestinales aumentando su capacidad fagocítica, inducen la proliferación de linfocitos B y estimulan la producción de citoquinas como la interleuquina IL-10 (Kitazawa y col., 2001; Gill y col., 2001).

### **D. Mejora de la función de la barrera intestinal**

El tracto gastrointestinal es la mayor superficie del cuerpo del ternero en continuo contacto con el medio externo, lo cual lo hace de por sí propenso a trastornos producidos por la llegada de agentes patógenos. Sin embargo cuenta con distintos mecanismos que tratan de prevenir la entrada de compuestos o agentes potencialmente perjudiciales para el organismo.

Para este cometido, la monocapa epitelial y el revestimiento de moco que la recubre, junto con las uniones estrechas que mantienen unidos a los enterocitos, forman una barrera física que previene la entrada a la lámina propia de microorganismos potencialmente patógenos y de antígenos lumbinales. Por otro lado, la inmunoglobulina (Ig) A, secretada por el intestino, además de bloquear la unión de microorganismos patógenos al epitelio, evita por tanto su posterior acceso a la lámina propia intestinal, es también capaz de aglutinar bacterias y virus en unos grandes complejos que son atrapados en la barrera de moco y eliminados en las heces.

En los procesos inflamatorios del intestino, la integridad de la barrera epitelial se encuentra alterada permitiendo el paso de antígenos desde lumen a la pared intestinal, desencadenando la respuesta del sistema inmune. Las bacterias probióticas podrían facilitar la reversión de esta situación y normalizar la permeabilidad intestinal mejorando así la respuesta inflamatoria intestinal (Shiba y col., 2003). Ishikawa y col. (2003) describieron que la utilización de *Lactobacillus casei* y *Clostridium butyricum* promueven la proliferación de las células epiteliales intestinales en experimentos realizados en ratas mejorando de esta forma la protección del intestino.

### **E. Producción de nutrientes importantes para la función intestinal**

La microbiota de los animales cumple un papel importante durante la digestión. Algunos de ellos intervienen en la producción de algunas vitaminas como la riboflavina (vitamina B2), piridoxina (vitamina B6), ácido fólico, cobalamina (vitamina B12), y biotina (conocida también como vitamina H). Además participan en la fermentación de carbohidratos de la dieta que no han sido digeridos en el intestino delgado y participa en la asimilación de oligoelementos.

Por otro lado los probióticos como lactobacilos y bifidobacterias poseen la enzima  $\beta$ -galactosidasa por lo cual tienen la capacidad de degradar la lactosa produciendo ácido láctico. Esto resulta beneficioso en aquellos individuos que carecen de la enzima  $\beta$ -galactosidasa y por lo tanto no pueden digerir la lactosa (Síndrome de intolerancia a la lactosa). En estos, la lactosa es fermentada por la microbiota intestinal produciendo ácidos grasos y gas que ocasionan dolor abdominal, flatulencias y diarrea. Con la adición de probióticos en la dieta se reduce la presencia de esta sintomatología.

#### **1.5.3. Beneficios de la utilización de probióticos en bovinos**

La intensificación de los sistemas productivos bovinos aumenta las condiciones de estrés en los animales, ocasionando desórdenes en la composición de la microbiota intestinal, reduciendo la resistencia natural a la colonización de microorganismos patógenos y, de esta forma, aumentando las enfermedades diarreicas (Mulder y col., 1997). La utilización de probióticos durante la alimentación de terneros se basa en las propiedades que se les atribuyen para mejorar la eficiencia de conversión alimenticia y como promotores del crecimiento (Rosmini y col., 2004).

La posibilidad de que los terneros adquieran la microbiota autóctona natural en los sistemas de crianza artificial está disminuida, lo que conduce a que el intestino sea fácilmente colonizado por patógenos, siendo los más comunes *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. La suplementación temprana con probióticos en los terneros puede modificar la microbiota intestinal, e instaurar una población de microorganismos benéficos que disminuya la presencia de patógenos y de enfermedades diarreicas en los terneros (Soto y col., 2014).

La diarrea neonatal del ternero es causada con mayor frecuencia por *E. coli* enterotoxigénica y *S. dublin* los cuales producen alta morbilidad y mortalidad en los

rumiantes jóvenes. La administración oral de probióticos disminuye la incidencia y la gravedad de las diarreas causadas por estos patógenos en los terneros. Además ayuda a una recuperación más rápida y con menos secuelas en los terneros (Rodríguez-Palacios y col., 2004; Soto y col., 2016). Agarwal y col. (2002) obtuvieron una reducción de la incidencia de diarrea en terneros alimentados con leche fermentada por bacterias ácidas lácticas mixtas. Von Buenau y col. (2005) informaron que la administración de *E. coli* Nissle tuvo efectos en la profilaxis y tratamiento de la diarrea neonatal en terneras. En terneros jóvenes, la incorporación de levaduras vivas en el grano, redujo el número de días con diarrea (Galvão y col., 2005).

La administración de sustitutos lácteos mal preparados conducen a la aparición de diarreas nutricionales. La administración de probióticos es capaz de mantener una carga microbiana estable de bacterias benéficas, disminuir la presencia de diarreas osmóticas causada por exceso de lactosa y de esta forma mejorar el estado de salud de los terneros (Frizzo y col., 2011).

La utilización de probióticos estimula el desarrollo del sistema inmunológico y de esta forma puede prevenir la colonización del tubo digestivo por parte de microorganismos patógenos (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).

Además de la disminución de la incidencia de diarrea, los probióticos también pueden reducir la mortalidad de los terneros (Timmerman y col., 2005). Por otro lado los probióticos pueden ser una alternativa a la utilización de antibióticos como promotor del crecimiento en terneros jóvenes (Signorini y col., 2012) y mejorar la performance productiva (Frizzo y col., 2011; Bayatkouhsara y col., 2013). Se ha observado que la administración de bacterias probióticas y levaduras en terneros jóvenes mejora el desarrollo ruminal y el aumento de peso (Adams y col., 2008).

La aplicación de microorganismos probióticos aumenta las poblaciones de bacterias ruminales cultivables y microorganismos celulolíticos (Chaucheyras-Durand y col., 2008) y de esta manera aumentan la digestibilidad de las fibras (Guedes y col., 2008; Marden y col., 2008).

Los probióticos pueden ser una alternativa para reducir los niveles de microorganismos patógenos zoonóticos. El bovino es el principal reservorio de *E. coli* O157:H7 (Lejeune y Wetzel, 2007), desempeñando un papel importante en la

epidemiología de las infecciones humanas (Griffin y Tauxe, 1991). Se ha demostrado que una adición diaria de *E. coli* productora de colicina E7 en el alimento reduce el desprendimiento fecal del serotipo O157:H7 en bovinos (Schamberger y col., 2004). Algunos autores han administrado *L. acidophilus* y mostraron una reducción de la secreción fecal de *E. coli* O157 (Brashears y col., 2003; Younts-Dahl y col., 2004; Peterson y col., 2007; Tabe y col., 2008).

La utilización de probióticos en la producción primaria contribuye a mejorar el estado de salud de los terneros, que en un futuro formarán parte de la alimentación humana, a lo largo de la cadena productiva siendo clave tanto desde el punto de vista productivo como desde el punto de vista de salud pública. Además, la utilización de probióticos responde a una tendencia mundial que promueve la alimentación saludable con mayor calidad nutritiva y libre de residuos de antibióticos.

## **1.6. Conservación de probióticos**

Para poder ejercer su efecto beneficioso sobre el hospedador es necesario que los probióticos lleguen viables a su sitio de acción. La conservación de los microorganismos probióticos tiene como objetivo mantener la viabilidad y la estabilidad de las características propias de cada cepa. No todas las cepas responden de igual forma al mismo método, incluso algunas especies son variables al mismo proceso. Es necesario administrar los microorganismos benéficos al poco tiempo de nacidos los animales para facilitar el establecimiento de una microbiota estable y equilibrada, que podría mejorar el estado sanitario de los terneros. Varios factores como el proceso de producción, las condiciones de almacenamiento y las bio-barreras del hospedador, desafían inevitablemente la supervivencia de las bacterias probióticas. Poder proporcionarles protección contra estos factores es muy importante cuando se los produce en forma industrial. La encapsulación es una técnica muy eficaz que puede ser utilizada con éste fin.

### **1.6.1. Encapsulación**

La encapsulación se puede definir como un proceso por el cual se retienen los microorganismos dentro de una matriz de gel porosa o dentro de una membrana semipermeable que contiene un núcleo líquido (Sultana y col., 2000). Esta técnica

brinda protección a los probióticos contra bacteriófagos y factores perjudiciales que afectan la supervivencia durante la congelación, la liofilización y el almacenamiento (Mortazavian y col., 2007). Además la encapsulación brinda ventajas adicionales, como una mayor resistencia a las condiciones gástricas e intestinales simuladas (Lian y col., 2003), También ejercen protección al contacto con el oxígeno, para aquellos microorganismos que son anaerobios estrictos (Soto y col., 2011).

Las técnicas de encapsulación se clasifican en dos grupos, teniendo en cuenta el tamaño de la cápsula de polímero producido; macroencapsulación y microencapsulación (John y col., 2011). La macroencapsulación es el atrapamiento de células en perlas poliméricas de tamaño que varía de pocos milímetros a centímetros (Gentile y col., 1995; John y col., 2011). Por otra parte, la microencapsulación produce perlas en el intervalo de tamaño de 1 µl a 1000 µl (Byrd y col., 2005; Heidebach y col., 2012).

Cuando esta tecnología de inmovilización es aplicada a los cultivos adicionados a los alimentos para humanos, se debe sortear el inconveniente de producir un tamaño de perla imperceptible al paladar. La manera más común de formar las perlas es adicionando el cultivo mezclado con alginato de sodio en forma de gotas a una solución de CaCl<sub>2</sub>. En este caso el tamaño de la perla generada depende del tamaño del orificio del elemento dispensador logrando diámetros entre 0,3 a 3 mm (Doleyres y Lacroix, 2005). Las formulaciones farmacéuticas probióticas para terneros, tales como cápsulas, pastillas y gránulos, son de mayor tamaño, adecuadas para el animal a inocular. La encapsulación con alginato es una técnica que podría utilizarse para generar cápsulas de gran tamaño que facilite la conservación y administración de la cepa probiótica a terneros jóvenes.

### **1.6.2. Técnicas utilizadas para la encapsulación de microorganismos**

La mayor parte de las investigaciones sobre encapsulación se lleva a cabo usando las metodologías de extrusión o emulsión.

#### **1.6.2.1. Técnica de extrusión**

La técnica de extrusión es la metodología de encapsulación más utilizada debido a su simplicidad, bajo costo y a sus condiciones de formulación que garantizan una alta viabilidad celular (Krasaekoopt y col., 2003). En esta técnica los microorganismos se mezclan con una solución hidrocoloide y posteriormente se agregan por goteo a una solución de agente gelificante. El tamaño de las cápsulas es regulado por el tamaño del

orificio de salida del elemento dispensador y la distancia que recorre la gota hasta el agente gelificador. Algunos inconvenientes que presenta la técnica es la ineficiencia en la producción de cápsulas menores de 500  $\mu\text{m}$  de diámetro, el requerimiento de soluciones de polímero de viscosidad baja a moderada y la necesidad de boquillas de diámetro relativamente grande (Reis y col., 2006). Sin embargo es una técnica que se adapta bien para la producción de cápsulas de un tamaño mayor a 500  $\mu\text{m}$  de diámetro, por lo cual se adaptan bien para la producción de macrocápsulas.

#### **1.6.2.2. Técnica de emulsión**

En la técnica de emulsión un volumen determinado de la fase dispersa (célula-polímero) se agrega a un gran volumen de aceite (fase continua). Generalmente se utilizan aceites vegetales como fase continua. Esta mezcla es homogenizada para formar una emulsión agua en aceite con la ayuda de un tensioactivo y agitación. La fase acuosa es inmovilizada por la adición de un agente gelificante. El tamaño de las cápsulas formadas dependerá de la velocidad de adición de la fase dispersa y de la velocidad de agitación. Posteriormente, las cápsulas se separan a través de filtración o centrifugación. A través de esta técnica se pueden producir microesferas por debajo de los 300  $\mu\text{m}$  de diámetro (Burgain y col., 2011).

El principal inconveniente de la técnica de emulsificación es la toxicidad potencial de disolventes orgánicos para los microorganismos encapsulados. Aunque los aceites son menos tóxicos que los disolventes orgánicos, la eliminación del aceite de las microesferas puede ser más difícil en comparación con los disolventes orgánicos. Además, su uso en la emulsificación también aumenta el costo total del proceso (Krasaekoopt y col., 2003).

#### **1.6.3. Materiales utilizados para encapsular bacterias probióticas**

Los materiales más utilizados para encapsular microorganismos probióticos son enumerados en la tabla 2. La elección del material a utilizar debe reunir ciertas características. Los materiales ideales deben poseer baja higroscopicidad para evitar la aglomeración, deben poseer baja viscosidad a altas concentraciones, debe brindar protección frente a condiciones adversas como el pH, oxígeno o humedad y deben poseer capacidad de emulsificar, estabilizar y no reaccionar con los microorganismos.

Ademas no deben poseer sabor o alguna característica que influya en el consumo, deben permitir una liberación adecuada de los mismos en su sitio de acción y ser de bajo costo.

**Tabla 2.** Materiales utilizados en la encapsulación de bacterias probióticas

Material	Origen
Alginato	Algas marinas
Quitosano	Animales
Goma Gelano, Goma Xantano	Bacterias
Proteínas de la leche, Gelatina	Proteínas animales
Almidón Resistente	Plantas

### 1.6.3.1. Alginato

El Alginato es un polisacárido coloidal que se obtiene de las algas pardas (*Laminaria*) y está compuesto de ácidos  $\beta$ -D-manurónico y  $\alpha$ -L-gulurónico. El Alginato de sodio es ampliamente utilizado para la encapsulación debido a su facilidad de preparación y manipulación, no toxicidad, biocompatibilidad y bajo costo (Krasaekoopt y col., 2003). Además el alginato es biotecnológicamente interesante debido a su capacidad de pasar de estado líquido a gel en presencia de cationes multivalentes (ej. calcio) independientemente de la temperatura, lo que hace del alginato una matriz de inmovilización disponible para microorganismos. Sin embargo, el alginato presenta algunas desventajas como la sensibilidad al medio ácido (Mortazavian y col., 2008) por lo cual podría presentar dificultades para mantener una protección adecuada frente a las condiciones del estómago. Además, las cápsulas obtenidas son muy porosas, lo cual puede resultar en un inconveniente cuando el objetivo es proteger los microorganismos de su entorno (Gouin, 2004). Sin embargo, estos defectos pueden compensarse mezclando el alginato con otros compuestos poliméricos, recubriendo las cápsulas por otro compuesto o aplicando una modificación estructural del alginato usando diferentes aditivos (Krasaekoopt y col., 2003). El almidón suele mezclarse comúnmente con el alginato con lo que se mejora la eficacia de la encapsulación probiótica (Sultana y col., 2000; Sun y Griffiths, 2000; Krasaekoopt y col., 2003). Otra alternativa es el recubrimiento de las cápsulas con quitosano, lo cual mejora la viabilidad de los microorganismos encapsulados (Nualkaekula y col., 2012).

### **1.6.3.2. Goma de Gelano y Goma de Xantano**

La goma de gelano es un polisacárido microbiano derivado de *Pseudomonas elodea* que está constituido por una unidad repetitiva de cuatro monómeros que son glucosa, ácido glucurónico, glucosa y ramnosa (Chen y col., 2007). La goma de gelano es completamente soluble en agua fría o caliente y posee una excelente estabilidad al calor y pH, manteniendo la viscosidad de la solución en temperaturas que van desde 0°C hasta 100°C y en un pH de 1 a 13. La goma de gelano es utilizada en muchos productos como espesante, estabilizante y como agente para mantener suspensiones (Sanderson, 1981).

La goma de xantano es un polisacárido extracelular producido por la bacteria *Xanthomonas campestris*. Este polisacárido se utiliza convencionalmente como estabilizante, espesante, gelificante, de suspensión, dispersante, así como agente de mantenimiento de liberación en las industrias alimentaria y farmacéutica. La utilización de goma de xantano proporciona una excelente protección de los probióticos frente ambientes ácidos. Además, esta sustancia es ideal para combinar con alginato. Albertini y col. (2010) utilizaron esta combinación y lograron una mejor viabilidad de los microorganismos tanto en jugo gástrico simulado como en sal biliar.

Se ha utilizado una mezcla de goma de xantano-goma de gelano para encapsular bacterias probióticas y esta combinación presenta alta resistencia en condiciones ácidas comparada el alginato de sodio (Sultana y col., 2000; Sun y Griffiths, 2000).

### **1.6.3.3. Quitosano**

El quitosano, es una sustancia natural que se obtiene de las conchas de crustáceos como cangrejos y camarones mediante un tratamiento químico o microbiológico (Sashiwa y Aiba, 2004). Es un polisacárido lineal compuesto de unidades de glucosamina que pueden polimerizarse por medio de una formación de enlaces cruzados en presencia de aniones y polianiones.

El quitosano se disuelve fácilmente en pH ácido por lo que generalmente no se utiliza para encapsular (De Vos y col., 2010). Sin embargo se utiliza asociado con otro polímero, normalmente como material de recubrimiento de las cápsulas, proporcionando una mejor protección y mejorando la viabilidad de los microorganismos (Krasaekoopt y col. 2004). Esto lo ha convertido en un material prometedor para el

recubrimiento debido a su naturaleza no tóxica, su biocompatibilidad, su abundancia en la naturaleza, su facilidad de manejo y su biodegradabilidad (Sashiwa y Aiba, 2004).

#### **1.6.3.4. Almidón resistente**

El almidón es un polisacárido que consiste en un gran número de unidades de glucosa unidas entre sí por enlaces glucosídicos. El almidón resistente es el almidón que no es digerido por las enzimas pancreáticas (amilasas) en el intestino delgado y puede alcanzar el colon donde será fermentado (Sajilata y col., 2006; Anal y Singh, 2007). La resistencia del almidón a la digestión está influenciada por la naturaleza de la asociación entre los polímeros de almidón. Además, niveles altos de amilosa en el almidón se asocian con tasas de digestibilidad más lentas (Nugent y col., 2005). Esta especificidad proporciona una buena característica de administración entérica que es una mejor liberación de las bacterias probióticas en el intestino grueso (Kumer y col., 2007). Además, al no ser digerido por el hospedador pero si por la microbiota del colón, el almidón resistente posee una función prebiótica que favorecería el desarrollo de la microbiota (Mortazavian y col., 2008). Finalmente, el almidón resistente es una superficie ideal para la adherencia de las bacterias probióticas a los gránulos de almidón (Anal y Singh, 2007) y esto puede aumentar el suministro de probióticos en un estado viable y metabólicamente activo al intestino (Crittenden y col., 2001). Kleessen y col., 1997 mejoraron la viabilidad de microorganismos probióticos encapsulándolos en una matriz de almidon resistente Los almidones forman películas fuertes, resistentes y flexibles, pero son difíciles de dispersar en agua y pueden gelificar muy rápidamente. Estos almidones tienen la ventaja de ser seguros, no tóxicos y de fácil disponibilidad, pero tienen la desventaja de ofrecer baja protección contra la oxidación durante el almacenamiento (Pérez-Leonard y col., 2013).

#### **1.6.3.5. Gelatina**

La gelatina es una proteína derivada de la hidrólisis parcial del colágeno. La gelatina es una goma proteica, que hace un gel termorresistente y se usa para la encapsulación probiótica, sola o en combinación con otros compuestos. Debido a su naturaleza anfótera, es un excelente candidato para la cooperación con polisacáridos aniónicos tales como la goma de gelano.

Hyndman y col. (1993) encapsularon *Lactococcus lactis* con gelatina mezclado con diisocianato de tolueno y lograron cápsulas fuertes y mejores valores de viabilidad que en su forma no encápsulada. Kumar y col. (2007) han encapsulado con éxito *Lactobacillus lactis* para incorporarlo en matrices alimentarias.

#### **1.6.3.6. Proteínas de la leche**

Las proteínas de la leche son vehículos naturales para las bacterias probióticas y debido a sus propiedades estructurales y físico-químicas, pueden ser usadas como un sistema de entrega (Livney, 2010). Por ejemplo, las proteínas tienen excelentes propiedades de gelificación y esta especificidad ha sido explotada recientemente para encapsular bacterias probióticas (Heidebach y col., 2009). Los resultados de estos estudios son prometedores y el uso de proteínas de la leche resulta interesante debido a su biocompatibilidad (Livney, 2010). Reid y col. (2005) comprobaron que las bacterias encapsuladas de *Lactobacillus rhamnosus* en una matriz de proteína de suero de leche tuvieron mayor supervivencia comparado con las bacterias no encápsuladas.

#### **1.6.4. Secado de Cápsulas**

Las cápsulas se pueden manejar y almacenar fácilmente durante mucho tiempo, sobre todo si se almacenan en forma seca. Las técnicas más comunes usadas para el secado de cápsulas son el secado por spray y la liofilización. Si bien estas tecnologías se vienen aplicando durante un largo periodo de tiempo para secar probióticos, el secado de inóculos encápsulados es un concepto relativamente nuevo (Martín y col., 2015).

##### **1.6.4.1. Secado por spray**

Es una tecnología que nos permite, por un lado, producir y secar microcápsulas en una sola etapa y, por otro lado, secar cápsulas elaboradas por otras técnicas. El proceso demanda tres etapas básicas: la formación de suspensión o emulsión entre el material central y el de pared, la homogenización y la aspersion. La emulsión o suspensión se atomiza dentro de una corriente de aire caliente. Al evaporarse el agua los sólidos remanentes forman una cápsula rodeando a la sustancia de interés por atracción másica, la exclusión instantánea del agua mantiene la temperatura del centro por debajo de los

100°C. La recolección de las microcápsulas obtenidas se realiza mediante ciclones (Anal y Singh, 2007).

El secado por spray presenta la ventaja de ser una técnica relativamente barata (consume de 6 a 10 veces menos energía que el proceso liofilización) y posee una mayor productividad ya que puede ser operado de forma continua, comparada con otras tecnologías. Sin embargo esta técnica presenta la desventaja de que la elevada temperatura utilizada durante el proceso disminuye la viabilidad celular debido a la rápida deshidratación, así como a las tensiones térmicas y de oxígeno que sufren las bacterias (Knorr, 1998; Ross y col., 2005; Anal y Singh, 2007).

#### **1.6.4.2. Liofilización**

La liofilización es un proceso que tiene como objetivo separar el agua (u otro solvente) de una disolución mediante congelación y posterior sublimación del hielo a presión reducida. Varios autores han estudiado la liofilización de las cápsulas como medida para prolongar la viabilidad bacteriana (Mortazavian y col., 2007; Rokka y Rantamäki 2010; Dianawati y col., 2013). El proceso de liofilización consiste en tres etapas: congelación, secado principal y secado secundario. En esta técnica, el disolvente se congela y se elimina mediante sublimación (Solanki y col., 2013).

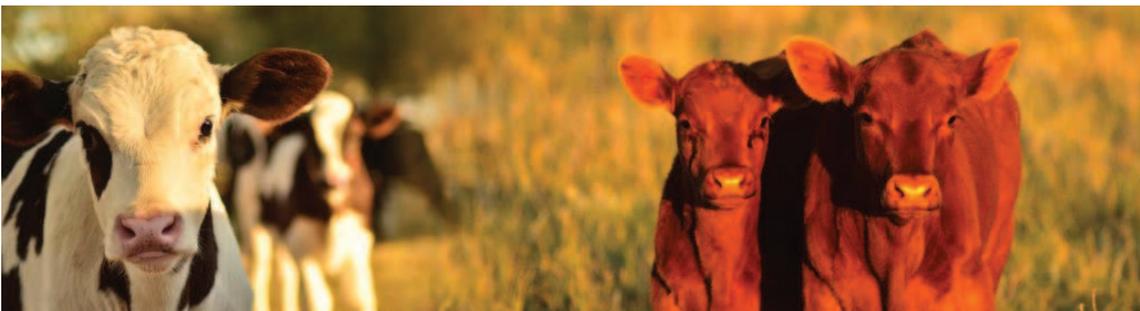
Estas etapas son puntos críticos para la viabilidad bacteriana (Coulibaly y col., 2010). La etapa de congelación produce la formación de cristales de hielo que causan daños en la membrana celular. Además se pueden desnaturalizar proteínas sensibles durante la liofilización, disminuyendo la viabilidad bacteriana (Jagannath y col., 2010). La liofilización es relativamente más eficaz que el secado por pulverización para superar las limitaciones asociadas con la alta temperatura en el secado por pulverización (Dolly y col., 2011). Sin embargo, las lesiones por frío sobre los microorganismos son comunes y, por lo tanto, el uso de crioprotectores es necesario para la liofilización y esto aumentará el costo para un proceso ya energéticamente costoso. Otras limitaciones de la liofilización incluyen los altos costos de capital y operación debido a las bajas temperaturas, alto vacío y largos tiempos de residencia requeridos (Chen y Wang, 2007).

Varios crioprotectores han sido añadidos durante el proceso de formación de las cápsulas para proteger a los probióticos de las etapas de congelación y secado. El mecanismo de los crioprotectores consiste en su acumulación dentro de las células,

reduciendo la diferencia osmótica entre los ambientes internos y externos (Kets y col., 1996). Dentro de los crioprotectores se encuentran la leche en polvo desnatada (Miao y col., 2008; Heidebach y col., 2009; Ming y col., 2009), proteínas del suero de queso (Weinbreck col., 2010; Ying col., 2010), glucosa, maltodextrina, manitol (Ndoye, y col., 2007), glicerol (Gbassi y col., 2009; Weng y col., 2011, Martin-Dejardin y col., 2013), trehalosa y lactosa, entre otros. Los crioprotectores también se pueden añadir a los medios de cultivo antes de la fermentación para ayudar en la adaptación de los probióticos a ese medio ambiente (Capela y col., 2006; Basholli-Salih y col., 2014).

A partir de las problemáticas mencionadas, resulta de interés el estudio de microorganismos benéficos autóctonos, su conservación y su evaluación *in vivo* como alternativa de suplementación en la dieta de terneros para mejorar la performance, la sanidad animal y la seguridad de los alimentos que a partir de ellos se obtienen.

## 2. Hipótesis y Objetivos



## **2.1. Hipótesis**

La utilización de microorganismos benéficos evita la diseminación de patógenos alimentarios durante la producción primaria. La disminución de la incidencia de las enfermedades que causan esos patógenos contribuirá a garantizar la seguridad de los alimentos de origen bovino.

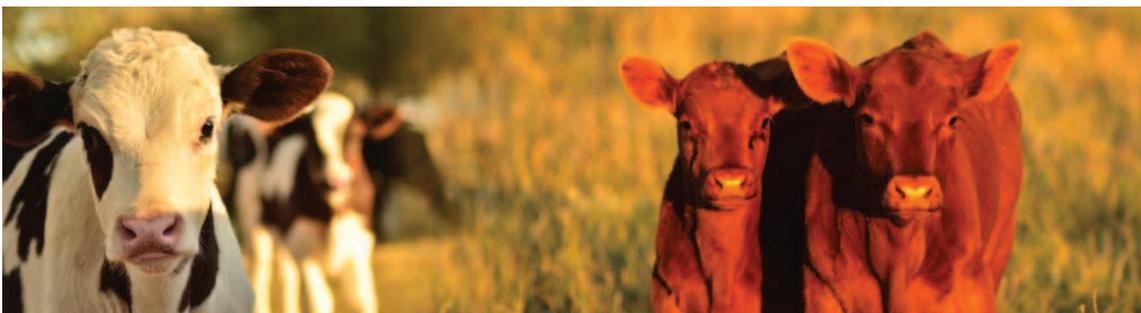
## **2.2. Objetivo general**

Contribuir al desarrollo social y económico de las explotaciones agropecuarias durante la producción primaria de alimentos, a través del empleo de microorganismos benéficos que disminuyan la diseminación de patógenos alimentarios y permitan garantizar la sustentabilidad de los modelos productivos y la inocuidad de las materias primas generadas.

## **2.3. Objetivos específicos**

1. Evaluar la viabilidad un inóculo de BAL de origen bovino conservado en macrocápsulas liofilizadas bajo diferentes condiciones de almacenamiento a través del tiempo.
2. Evaluar el efecto del inóculo de BAL de origen bovino, conservado mediante encapsulación, sobre la performance y la microbiota intestinal de terneros lactantes en una crianza artificial.
3. Generar un modelo experimental de infección por *Campylobacter jejuni* en terneros jóvenes.
4. Evaluar la capacidad de un inóculo de bacterias ácido lácticas (BAL) bovinas para evitar o disminuir la diseminación de *Campylobacter jejuni* durante la crianza intensiva de terneros verificando su accionar en el modelo experimental de infección.
5. Evaluar la importancia del empleo de microorganismos benéficos sobre la diseminación del patógeno a lo largo de toda la cadena agroalimentaria bovina utilizando modelos probabilísticos y destacando su impacto en Salud Pública.

### **3. Materiales y Métodos**



### **3.1. Evaluación de la viabilidad de cepas probióticas conservadas en cápsulas secadas mediante liofilización**

#### **3.1.1. Microorganismos**

El Departamento de Salud Pública Veterinaria (DSPV) ha realizado aislamientos de microorganismos indígenas a partir de muestras de materia fecal de terneros, los que se encuentran incorporados a una colección de cultivos. De esta colección se seleccionaron dos cepas por sus propiedades probióticas demostradas tanto *in vitro* como *in vivo* (Frizzo y col., 2011; Soto y col., 2014). Estas cepas pertenecen al género *Lactobacillus*: *L. casei* DSPV 318T (número de acceso GenBank: FJ787305) y *L. plantarum* DSPV 354T (número de acceso GenBank: FJ751793). Las cepas fueron conservadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en medio crioprotector elaborado según Terzolo (1984) hasta su utilización.

#### **3.1.2. Producción de Macrocapsulas**

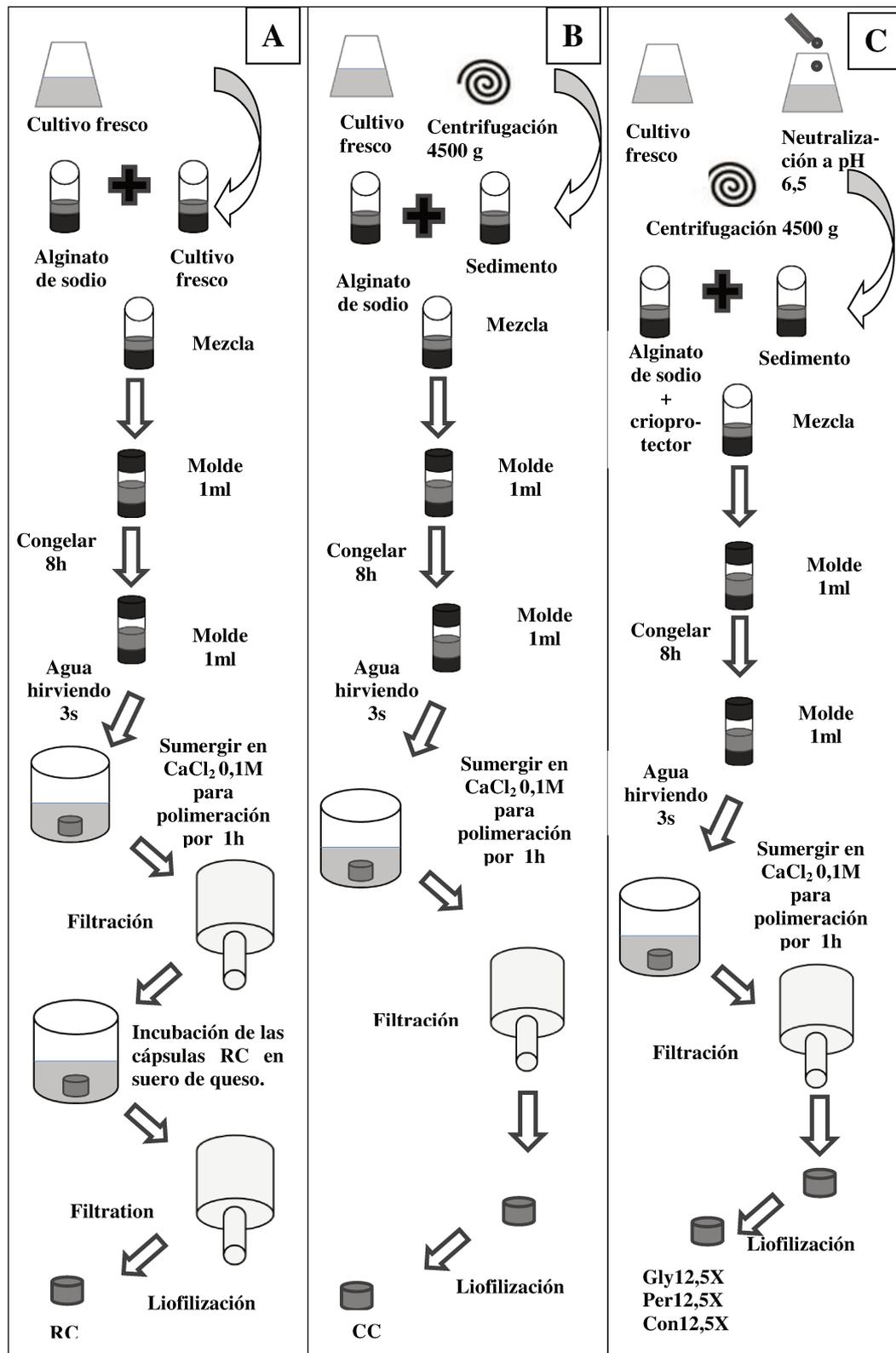
##### **3.1.2.1. Condiciones de cultivo**

Las cepas de *Lactobacillus* fueron descongeladas y activadas en placas con medio MRS (Man Rogosa Sharpe) (Biokar, Beauvais, Francia), a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 72 h en anaerobiosis. Luego, se realizaron dos cultivos consecutivos de ambas cepas por separado en caldo MRS (Biokar, Beauvais, Francia) a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 16 h. Posteriormente, fueron cultivadas en co-cultivo en un medio a base de suero de queso en polvo (70 g/l) (Corlasa, Esperanza, Argentina), a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 h, alcanzando el inóculo una concentración de  $10^9$  UFC/ml.

##### **3.1.2.2. Metodología de producción de macrocapsulas**

El biopolímero elegido para elaborar las macrocapsulas fue el alginato de sodio (Soto y col., 2011). Se llevaron a cabo dos tipos de metodologías de elaboración de macrocapsulas para evaluar si este factor afecta la viabilidad bacteriana. La primera técnica utilizada fue la metodología de reincubación (RC) llevada a cabo por Soto y col. (2011). Para llevar a cabo la misma, una vez concluido el tiempo de incubación del cultivo en el medio de cultivo a base de suero de queso, una solución de alginato de sodio 40 g/l (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos) fue agregada en proporción 1:1 (Champagne y Gardner, 2001), siendo la concentración final del alginato de 20 g/l. Esta

mezcla fue depositada en moldes de 1 ml (figura 3.A.) y almacenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 8 h para solidificar el contenido mediante congelación. Posteriormente, los moldes fueron sumergidos, primero, en agua hirviendo durante tres segundos, para despegar las cápsulas del molde, y luego en una solución de 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  (Cicarelli, San Lorenzo - Santa Fe – Argentina) durante 1 h para que el alginato polimerice (Muthukumarasamy y col., 2006). Las cápsulas se dejaron reposar una hora en dicha solución para su correcta formación y luego fueron separadas por filtración e incubadas en suero de queso (Corlasa, Esperanza, Argentina) durante 12 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  para aumentar la biomasa dentro de las mismas (figura 3.A.) (Soto y col., 2009).



**Figura 3.** Representación esquemática de la producción de macrocápsulas. (A) Cápsulas reincubadas (RC). (B) Cápsulas concentradas (CC). (C) Cápsulas con crioprotector (Gly12,5X: cápsulas concentradas 12,5X con glicerol; Per12,5X cápsulas

concentradas 12,5X con permeado de suero; Con12,5X: cápsulas de control 12,5X sin crioprotectores).

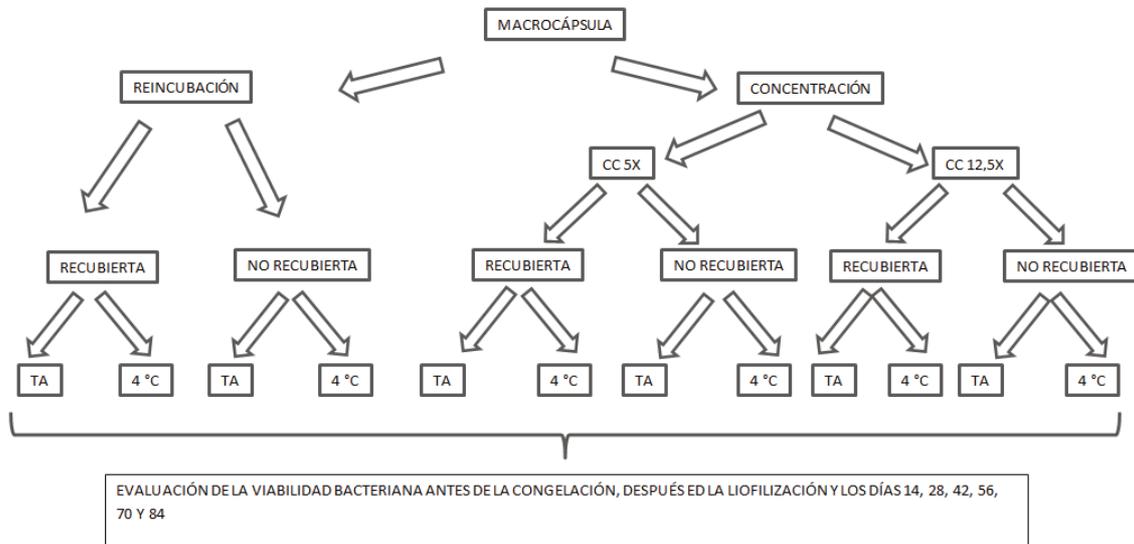
El otro tipo de metodología utilizada fue la concentración de la biomasa producida a través de centrifugación (CC). Una vez concluido el tiempo de crecimiento del inóculo, el mismo fue centrifugado a 4500 g durante 15 min. El sedimento obtenido fue disuelto en suero de queso (Corlasa, Esperanza, Argentina), obteniendo una concentración de 5X (CC5X) y de 12,5X (CC12,5X) respecto del volumen inicial del cultivo. A ambos cultivos se les agregó una solución de alginato de sodio (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos) en una proporción 1:1 (figura 3.B), obteniendo una concentración final de alginato de 20 g/l. Las cápsulas fueron llevadas a -20 °C durante 8 h para solidificar el contenido. Posteriormente fueron sumergidos, primero en agua hirviendo durante tres segundos, para despegar las cápsulas del molde, y luego en una solución de 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (Cicarelli, San Lorenzo - Santa Fe – Argentina) durante 1 h para que el alginato se polimerice. Las cápsulas se dejaron reposar una hora en dicha solución para su correcta formación, y luego fueron separadas por filtración (figura 3.B).

### **3.1.2.3. Revestimiento y almacenamiento de cápsulas**

La mitad de las cápsulas RC, la mitad de las CC5X y la mitad de las CC12,5X fueron sumergidas en una solución de quitosano (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos) para lograr un recubrimiento. La solución de quitosano fue preparada a una concentración de 4 g/l en agua bidestilada acidificada con ácido acético glacial (4,4 ml/l) (Anedra, Buenos Aires – Argentina). El pH de ésta solución fue ajustada a 5,8 ± 0,2 con NaOH (Cicarelli, San Lorenzo - Santa Fe – Argentina), y después fue esterilizada en un autoclave durante 15 min a 121 °C (Krasaekoopt col., 2006). Las cápsulas se mantuvieron en esta solución durante 40 min.

A continuación todas las cápsulas (recubiertas y no recubiertas de RC, CC5X y CC12,5X) fueron llevadas a freezer -80 °C durante 8 h para su posterior liofilización. La liofilización se llevó a cabo durante 12 h con una presión de 0,06 mbar y una temperatura de -54°C (Martin Christ ALPHA 1-4 LD plus). Los diferentes tipos de cápsulas fueron conservados bajo diferentes condiciones de temperatura. La mitad de las cápsulas recubiertas de los tipos RC, CC5X y CC12,5X fueron mantenidas a 4 °C, mientras que la otra mitad fueron conservadas a temperatura ambiente (TA). Lo mismo

se realizó para las cápsulas no recubiertas de las técnicas RC, CC5X y CC12,5X (figura 4).



**Figura 4.** Diseño experimental para la producción y conservación de cápsulas en diferentes condiciones de temperatura. RC: cápsulas reincubadas; CC: Cápsulas concentradas. CC5X: cápsulas concentradas 5X con respecto al cultivo en volumen inicial; CC12,5X: cápsulas concentradas 12,5X con respecto al cultivo en volumen inicial; TA: almacenamiento de cápsulas a temperatura ambiente; 4 °C: almacenamiento de las cápsulas en condiciones de refrigeración.

### 3.1.2.4. Determinación de la viabilidad bacteriana y análisis estadístico

Para determinar la viabilidad de los microorganismos, las cápsulas no recubiertas fueron disueltas con una solución de citrato de sodio (10 g/l) (Cicarelli, San Lorenzo - Santa Fe - Argentina) usando un vortex (Champagne y Gardner, 2001), mientras que las cápsulas recubiertas fueron disueltas en una solución de citrato de sodio (Cicarelli, San Lorenzo - Santa Fe - Argentina) usando un Stomacher 80 Biomaster (Seward, Worthing, Reino Unido), debido a que el recubrimiento no permitía que se disolvieran solamente con el uso del vortex. Posteriormente se realizaron diluciones decimales seriadas, de los diferentes tipos de cápsulas, en agua peptonada bufferada (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). A continuación se sembraron por vertido en placas con agar MRS (Biokar, Beauvais, Francia) y se incubaron a 37°C durante 72 h en anaerobiosis.

Las determinaciones de viabilidad fueron realizadas previo a la etapa de congelación, inmediatamente después de la liofilización y secuencialmente a los días 14, 28, 42, 56, 70 y 84 (figura 4). Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

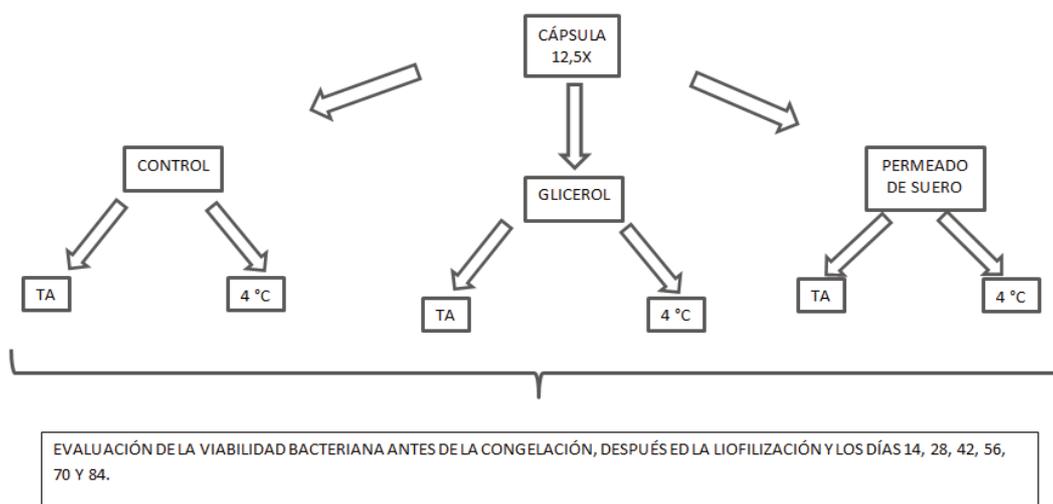
Para medir la diferencia entre las pérdida de viabilidad bacteriana de las cápsulas RC, CC5X y CC12,5X previo y posterior a la liofilización se realizó un ANOVA de una vía, usando el test de Duncan.

La viabilidad bacteriana de las cápsulas con diferente densidad celular, RC, CC5X y CC12,5X, fue evaluada mediante un diseño factorial de 3 (tipos de cápsulas) x 2 (con y sin recubrimiento) x 2 (TA y refrigeración) x 8 (día 0, 14, 28, 42, 56, 70 y 84) y se utilizó un ANOVA para medidas repetidas y test de Duncan. Los resultados se expresaron como la media aritmética y sus DS. Los diferentes parámetros cuantificados fueron evaluados mediante el programa INFOSTAT versión 2011 (InfoStat Group, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina), considerando  $P < 0,05$  para establecer que existían diferencias significativas entre las medias.

### **3.1.2.5. Producción de cápsulas con crioprotectores**

Con el fin de mejorar la viabilidad bacteriana durante el almacenamiento, después del período de fermentación, el pH del cultivo se ajustó a  $6,5 \pm 0,2$  mediante la adición de NaOH 6 M (Cicarelli, San Lorenzo - Santa Fe - Argentina). Los cultivos neutralizados se centrifugaron a 4500 g durante 10 min y los sedimentos se disolvieron en suero de queso a una concentración de 12,5X con respecto al volumen inicial de los cultivos. A estos sedimentos se les añadió alginato de sodio (40 g/l) y un crioprotector (150 g/l) en relación 1:1 para alcanzar concentraciones finales de 20 g/l de alginato y 75 g/l de crioprotector (figura 3.C). Con esta mezcla se realizaron tres tipos de cápsulas teniendo en cuenta el crioprotector utilizado. Por un lado las que tenían glicerol (Anedra, Buenos Aires - Argentina) como crioprotector (Gly12,5X), por otro lado las que tenían permeado de suero de queso (Arla Foods Ingredients S.A., Porteña, Córdoba, Argentina), cuyo principal componente es la lactosa, (Per12,5X) y por último las cápsulas control que no tenían crioprotector (Con12,5X). Los moldes fueron llevadas a -20 °C durante 8 h para solidificar el contenido. Posteriormente fueron sumergidos, primero en agua hirviendo durante tres segundos, para despegar las cápsulas del molde, y luego en una solución de 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (Cicarelli, San Lorenzo - Santa Fe - Argentina) durante 1 h para que el alginato se polimerice. Las cápsulas se dejaron reposar una hora

en dicha solución para su correcta formación, y luego fueron separadas por filtración (figura 3.C) y llevadas a freezer -80 °C para su posterior liofilización. Este proceso se llevó a cabo durante 12 h con una presión de 0,06 mbar y una temperatura de -54°C (Martin Christ ALPHA 1-4 LD plus). Una vez finalizado el proceso de liofilización, la mitad de las cápsulas Gly12,5X, la mitad de las Per12,5X y la mitad de las Con12,5X fueron conservadas a 4 °C y el resto fue conservado a TA (figura 5).



**Figura 5.** Diseño experimental para la producción y conservación de cápsulas en diferentes condiciones de temperatura. TA: almacenamiento de cápsulas a temperatura ambiente; 4 °C: almacenamiento de las cápsulas en condiciones de refrigeración.

Para determinar la viabilidad de los microorganismos, las cápsulas fueron disueltas con una solución de citrato de sodio (10 g/l) (Cicarelli, San Lorenzo - Santa Fe – Argentina) usando un vortex (Champagne y Gardner, 2001). Posteriormente se realizaron diluciones decimales seriadas, de los diferentes tipos de cápsulas, en agua peptonada bufferada (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). A continuación se sembraron por vertido en placas con agar MRS (Biokar, Beauvais, Francia) y se incubaron a 37 °C durante 72 h en anaerobiosis. Las determinaciones de viabilidad fueron realizadas previo a la etapa de congelación, inmediatamente después de la liofilización y secuencialmente a los días 14, 28, 42, 56, 70 y 84 (figura 4). Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

Para medir la diferencia entre las pérdida de viabilidad bacteriana de las cápsulas Gly12,5X, Per12,5X y Con 12,5X previo y posterior a la liofilización se realizó un ANOVA de una vía, usando el test de Duncan. La viabilidad bacteriana de las cápsulas con medios crioprotectores fue evaluada mediante un diseño factorial de 3

(crioprotectores) x 2 (TA y refrigeración) x 7 (día 0, 14, 28, 42, 56, 70 y 84). Los resultados se expresaron como la media aritmética y sus DS. Los diferentes parámetros cuantificados fueron evaluados mediante el programa INFOSTAT versión 2011 (InfoStat Group, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina), considerando  $P < 0,05$  para establecer que existían diferencias significativas entre las medias.

### **3.1.2.6. Conservación de cápsulas Gly12,5X a -20°C**

Con el fin de evaluar el efecto protector del glicerol sobre la viabilidad de las cepas probióticas durante el almacenamiento, en macrocápsulas conservadas a -20 °C, se hicieron cápsulas Gly12,5X de la misma manera que se describió anteriormente. Una vez recuperadas por filtración fueron llevadas a freezer -80 °C durante 8 h para su posterior liofilización. Luego, las cápsulas fueron conservadas a -20 °C durante un periodo de 84 d. Para determinar la viabilidad de los microorganismos, las cápsulas fueron disueltas con una solución de citrato de sodio (10 g/l) (Cicarelli, San Lorenzo - Santa Fe – Argentina) usando un vortex (Champagne y Gardner, 2001). Posteriormente se realizaron diluciones decimales seriadas en agua peptonada bufferada (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). A continuación se sembraron por vertido en placas con agar MRS (Biokar, Beauvais, Francia) y se incubaron a 37°C durante 72 h en anaerobiosis. Las determinaciones de viabilidad fueron realizadas secuencialmente a los días 0, 14, 28, 42, 56, 70 y 84. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

La viabilidad bacteriana de las cápsulas Gly12,5X conservadas a -20 °C fue evaluada mediante un ANOVA de una vía. Los resultados se expresaron como la media aritmética y sus DS. Los diferentes parámetros cuantificados fueron evaluados mediante el programa INFOSTAT versión 2011 (InfoStat Group, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina), considerando  $P < 0,05$  para establecer que existían diferencias significativas entre las medias.

### **3.1.3. Supervivencia de microorganismos probióticos encapsulados frente a condiciones gastrointestinales simuladas**

Con la finalidad de evaluar si las Gly12,5X brindan protección a los microorganismos frente a las condiciones gastrointestinales, se realizó una digestión gastrointestinal simulada *in vitro* (de Araújo Etchepare y col., 2016).

### **3.1.3.1. Preparación de soluciones gastrointestinales simuladas**

La solución de jugo gástrica simulada (JGS) se preparó mediante la suspensión de pepsina (Riedel-de Haen, Seelze, Alemania) en una solución estéril de PBS a una concentración final de 3 g/l y ajustando el pH a  $2,0 \pm 0,2$  con HCl (Cicarelli, San Lorenzo - Santa Fe – Argentina) y NaOH estéril (Cicarelli, San Lorenzo - Santa Fe – Argentina).

La solución de jugo intestinal simulado (JIS) se preparó mediante la suspensión de tripsina (Gibco®-Thermo Fisher Scientific-Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) y sales biliares (Britania, Buenos Aires, Argentina), en solución estéril de PBS a una concentración final de 1 g/l y de 1,8 g/l, respectivamente, ajustando el pH a  $7,4 \pm 0,2$  con NaOH estéril (Cicarelli, San Lorenzo - Santa Fe – Argentina). Ambas soluciones fueron filtradas para la esterilización a través de una membrana de  $0,22 \mu\text{m}$  (Zeng y col., 2016).

### **3.1.3.2. Supervivencia de células sin encapsular (CSE) y encapsuladas en soluciones gástricas simuladas**

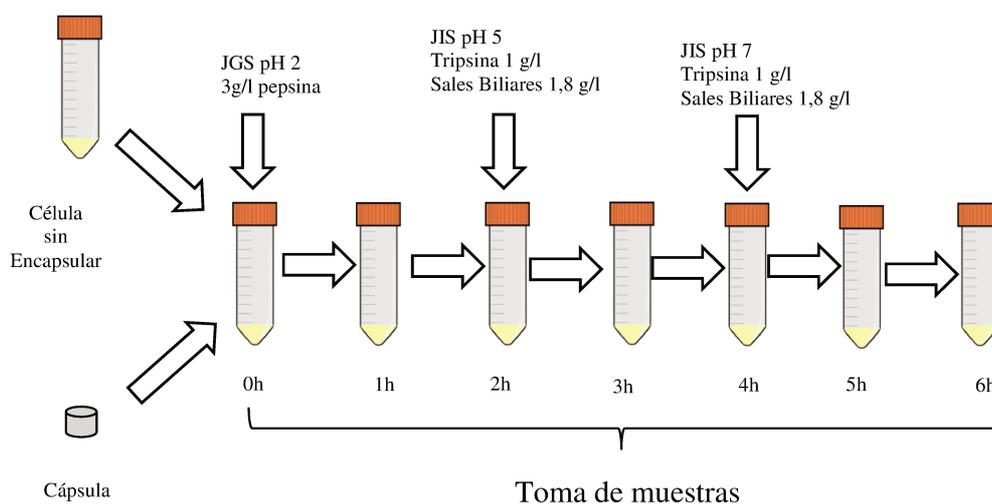
El ensayo se realizó con el método descrito por de Araújo Etchepare y col. (2016). Cada Gly12,5X se incubó en 9 ml de JGS (pH =  $2 \pm 0,2$ ) a  $37^\circ\text{C}$  durante 2 h. Posteriormente, el pH de la solución se ajustó a  $5,0 \pm 0,2$  (pH similar al del duodeno de los terneros), se adicionó la JIS y se incubó nuevamente a  $37^\circ\text{C}$  por 2 h. Por último, el pH se ajustó a  $7,5 \pm 0,2$  (pH similar a la porción distal del intestino delgado de los terneros) y se mantuvo las concentraciones de sales biliares y de tripsina. Las muestras se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 2 h para un total de 6 h de análisis (figura 6).

Se realizó, además, la digestión *in vitro* de un cultivo de CSE siguiendo la metodología descrita por Zeng y col. (2016). Para esto se realizó un cultivo fresco de las dos cepas probióticas en suero de queso. Una vez finalizado el tiempo de incubación las cepas probióticas se recogieron por centrifugación (4500 g durante 10 min.) y se lavaron dos veces con buffer PBS. Posteriormente se resuspendió en 9 ml de JGS (con una concentración de  $10^9$  UFC/ml) y se procedió de la misma manera descrita anteriormente.

La viabilidad bacteriana fue evaluada al inicio del experimento y cada una hora hasta finalizar el ensayo, mediante recuento en placa. Se realizaron diluciones decimales seriadas en agua peptonada bufferada (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Posteriormente, se sembraron por vertido en placas de agar MRS (Biokar, Beauvais,

Francia) y se incubaron a 37°C por 72 h en anaerobiosis. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

La diferencia de viabilidad bacteriana entre las CSE y las Gly12,5X se analizó utilizando un ANOVA de medidas repetidas. La diferencia entre los diferentes tiempos fueron identificados por la prueba de Duncan. La recuperación de inóculo probiótico se analizó utilizando un ANOVA de una Vía. Se consideró que existía una diferencia significativas cuando  $P < 0,05$ . Los resultados se expresaron como la media aritmética y sus DS. Los diferentes parámetros cuantificados fueron evaluados mediante el programa INFOSTAT versión 2011 (InfoStat Group, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).



**Figura 6.** Digestión *in vitro* de microorganismos probióticos encapsulados y células sin encapsular en soluciones gástricas e intestinales simuladas. JGS: jugo gástrico simulado. JIS: Jugo intestinal simulado.

### 3.1.4. Producción de macrocápsulas con alta densidad de probióticos

Con el fin de lograr macrocápsulas con una concentración inicial de 11 log UFC/cápsula (CAP11), las dos cepas de *Lactobacillus* descritas anteriormente se cultivaron durante 24 h a 37 °C en un medio a base de permeado de suero y extracto de

levadura, desarrollado en una tesis de grado en el Laboratorio de Análisis de Alimentos, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (LAA-ICIVET-CONICET) (Tabla 3). Una vez concluido el tiempo de crecimiento del inóculo, el mismo fue neutralizado ( $\text{pH } 6,5 \pm 0,2$ ) con solución NaOH estéril (Cicarelli, San Lorenzo - Santa Fe – Argentina) y posteriormente centrifugado a 4500 g por 15 min. El sedimento obtenido se resuspendió, en medio de cultivo descrito en la tabla 3, para obtener una suspensión que contenía aproximadamente  $10^{11}$  UFC/ml. Posteriormente, se le agregó una solución de alginato de sodio y glicerol en proporción 70:30 con respecto al medio de cultivo. La concentración final en la macrocápsula para el alginato de sodio fue del 20 g/l y de 75 g/l para el glicerol. Esta mezcla fue depositada en moldes de 1 ml y posteriormente almacenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 8 h para solidificar el contenido. Posteriormente, fueron sumergidos primero en agua hirviendo durante tres segundos, para despegar las CAP11 del molde y luego en una solución de 0,1M  $\text{CaCl}_2$  (Cicarelli, San Lorenzo - Santa Fe – Argentina) durante 1 h para que el alginato polimerice. Las cápsulas se dejaron reposar una hora en dicha solución para su correcta formación, y luego fueron separadas por filtración y luego fueron recuperadas por filtración y llevadas a freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  por 8 h para su posterior liofilización (Martin Christ ALPHA 1-4 LD plus). La misma se llevó a cabo durante 12 h con una presión de 0,06 mbar y una temperatura de  $-54^{\circ}\text{C}$ .

Las CAP11 fueron conservadas bajo diferentes condiciones de temperatura. Un tercio de las CAP11 fueron mantenidas a temperatura de refrigeración ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), otro tercio fueron conservadas a temperatura ambiente (TA) y el resto fueron conservadas a temperatura de congelación ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante 84 días.

Para determinar la viabilidad de los microorganismos, las cápsulas fueron disueltas con una solución de citrato de sodio (10 g/l) (Cicarelli, San Lorenzo - Santa Fe – Argentina) usando un vortex (Champagne y Gardner, 2001). Posteriormente se realizaron diluciones decimales seriadas en agua peptonada bufferada. A continuación se sembraron por vertido en placas con agar MRS (Biokar, Beauvais, Francia) y se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 72 h en anaerobiosis. Las determinaciones de viabilidad fueron realizadas previo a la etapa de congelación, inmediatamente después de la liofilización y secuencialmente a los días 14, 28, 42, 56, 70 y 84. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

La viabilidad bacteriana de las cápsulas conservadas a diferentes temperaturas a lo largo de 84 d de conservación se evaluó a través de un ANOVA de medidas repetidas y

test de Duncan. Los resultados se expresaron como la media aritmética y sus DS. Los diferentes parámetros cuantificados fueron evaluados mediante el programa INFOSTAT versión 2011 (InfoStat Group, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

**Tabla 3.** Composición del medio desarrollado en el Laboratorio de Análisis de Alimentos, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral, Consejo Nacional del Investigaciones Científicas y Técnicas (LAB-ICIVET-CONICET).

<b>Contenido</b>	<b>Concentración (g/l)</b>
Permeado de Suero	60
Extracto de levadura	50
MgSO <sub>4</sub> .	0,2
MnSO <sub>4</sub> 0.003	0,0003
tween 80	1

### **3.1.5. Supervivencia de microorganismos conservados en CAP11 frente a condiciones gastrointestinales simuladas**

Con la finalidad de evaluar si las CAP11 brindan protección a los microorganismos frente a las condiciones gastrointestinales, se realizó una digestión gastrointestinal *in vitro*.

#### **3.1.5.1. Preparación de soluciones gastrointestinales simuladas**

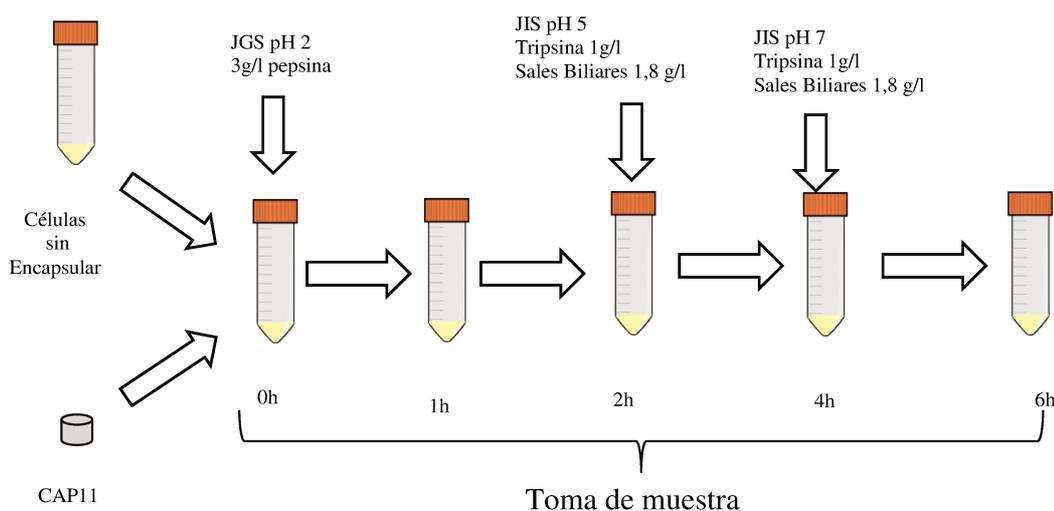
Las soluciones de JGS y JIS fueron preparadas de la misma manera que se detalló en el apartado 3.1.3.1.

#### **3.1.5.2. Supervivencia de células sin encapsular (CSE) y encapsuladas en soluciones gástricas simuladas**

El ensayo de supervivencia de CSE y células encapsuladas en CAP11 se realizó de igual manera a lo descrito en el apartado 3.2.3.2.

La viabilidad bacteriana fue evaluada al inicio del experimento y a las 1, 2, 4 y 6 horas de incubación (figura 7), mediante recuento en placa. Se realizaron diluciones decimales seriadas en agua peptonada buferrada, se sembraron por vertido en placas de agar MRS (Biokar, Beauvais, Francia) y se incubaron a 37°C por 72 h en anaerobiosis. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

La diferencia de viabilidad bacteriana entre las CSE y las CAP11 se analizó utilizando un ANOVA de medidas repetidas. La pérdida de viabilidad bacteriana a través del tiempo se analizó utilizando un ANOVA de una vía. Se consideró que existía una diferencia significativa cuando  $P < 0,05$ . La diferencia entre los diferentes tiempos fueron identificados por la prueba de Duncan. Los resultados se expresaron como la media aritmética y sus DS. Los diferentes parámetros cuantificados fueron evaluados mediante el programa INFOSTAT versión 2011 (InfoStat Group, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).



**Figura 7.** Digestión in vitro en soluciones gástricas e intestinales simuladas de las CAP11. JGS: jugo gástrico simulado; JIS: jugo intestinal simulado.

### 3.2. Evaluación del efecto de microorganismos benéficos sobre la performance y microbiota intestinal de terneros jóvenes durante la crianza convencional de terneros jóvenes.

#### 3.2.1. Animales y alimentación

Cuarenta terneros de raza Holstein (*Bos taurus*), fueron utilizados, con una edad promedio de 7 días y un peso inicial promedio de 38,9 kg. La crianza artificial se llevó a cabo en “estaca con sistema de corredera”, en el cual, el ternero se encontraba sujeto por una cadena de un metro a un cable guía de 4 m de largo, teniendo un espacio restringido para moverse (Figura 8). La crianza se llevó a cabo en un piso de tierra con una cubierta de césped natural. El ensayo se realizó en las instalaciones del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de la localidad de Rafaela, (Santa Fe- Argentina).



**Figura 8.** Sistema de crianza a estaca con corredera. Se observa que el ternero se encontraba unido a través de una cadena a un cable guía.

Los terneros fueron alimentados diariamente con 4 l de leche, divididos en dos tomas de 2 l c/u (7:00 am. y 4 pm.) durante el transcurso del ensayo. La leche fue previamente pasteurizada y administrada a una temperatura aproximada de 38 °C. Además se administró un alimento balanceado comercial (AB) *ad libitum* durante todo el ensayo. El agua se dio luego de dos horas de consumida la leche.

El alimento comercial fue formulado con los siguientes ingredientes: maíz molido, expeller de soja, afrechillo de trigo, sal común entrefina, conchilla marina molida,

cobre, zinc, manganeso, yodo, selenio, cobalto, vitamina E, vitamina A, vitamina D3, El mismo contenía 88% MS, 19% de proteína, 3 Mcal kg/MS, 4 % de Extracto etéreo , 4% de fibra, 0,4 - 0,8 % de calcio y 0,6 – 0,9 % de fósforo.

### **3.2.2. Diseño Experimental**

Los animales se dividieron en dos grupos homogéneos en su peso, grupo control (GC) y grupo probiótico (GP) de 20 animales cada uno. Cada grupo conto con 10 terneros hembras y 10 terneros machos, y se examinaron durante 60 días. 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).

### **3.2.3. Inóculo bacteriano**

Para este estudio se usaron dos cepas del genero *Lactobacillus*: *L. casei* DSPV 318T cuyo número de acceso GenBank: FJ787305 y *L. plantarum* DSPV 354T (número de acceso GenBank: FJ751793). Estas cepas fueron seleccionadas por sus propiedades probióticas demostradas tanto *in vitro* como *in vivo* (Frizzo y col., 2011; Soto y col., 2014). Ambas cepas se estaban conservadas en medio crioprotector elaborado según Terzolo 1984, en freezer – 80°C hasta su utilización.

### **3.2.4. Selección de cepas resistentes a rifampicina.**

Las cepas inoculadas, se marcaron por resistencia a un antibiótico para poder supervisarlas y diferenciarlas de las cepas presentes en el intestino (Demecková y col., 2002). La resistencia al antibiótico fue hecha por sucesivos pasajes de las cepas en medio MRS (Biokar, Beauvais, Francia), desde niveles bajos hasta una concentración de 200 µg/ml de rifampicina (Kurzak, 1998; Demecková y col., 2002). La rifampicina se preparó en una solución stock (10 mg/ml) y fue utilizada a una concentración final de 200 µg/ml. A partir de un cultivo “overnight” de cada microorganismo se sembraron placas que contenían agar MRS (Biokar, Beauvais, Francia) suplementado con rifampicina (MRSrif) y fueron incubadas durante 48 h a 37 °C. Finalmente, se obtuvo una colonia utilizando el método de aislamiento. Las cepas resistentes a rifampicina fueron conservadas en medio crioprotector elaborado según Terzolo (1984) en freezer – 80°C hasta su utilización.

### **3.2.5. Preparación y administración del inóculo**

El inóculo bacteriano fue administrado a los terneros en cápsulas. Las cepas de *Lactobacillus* se hicieron crecer en co-cultivo de suero de queso durante 24 h a 37 °C. Una vez concluido el tiempo de incubación, el pH del cultivo se ajustó a  $6,5 \pm 0,2$  mediante la adición de NaOH 6 M (Cicarelli, San Lorenzo - Santa Fe – Argentina) y posteriormente el cultivo fue centrifugado a 4500 g por 15 min. El pellet obtenido fue disuelto en suero de queso pasteurizado hasta obtener la concentración de 12,5 veces (Gly12,5X) respecto al volumen inicial del cultivo. Concluido este proceso, a estos sedimentos se les añadió alginato de sodio (40 g/l) y un crioprotector (150 g/l) en relación 1:1 (Champagne y Gardner, 2001) para alcanzar concentraciones finales de 20 g/l de alginato y 75 g/l de crioprotector y ésta mezcla fue depositada en moldes de 1 ml (Doleyres y Lacroix, 2005). Los moldes fueron llevados a freezer -20 °C durante 8 h para solidificar el contenido. Posteriormente fueron sumergidos, primero en agua hirviendo durante tres segundos, para despegar las cápsulas del molde, y luego en una solución de 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (Cicarelli, San Lorenzo - Santa Fe – Argentina) durante 1 h para que el alginato se polimerice. (Bajpai y Sharma, 2004; Muthukumarasamy y col., 2006). Las cápsulas se dejaron reposar una hora en dicha solución para su correcta formación, y luego fueron separadas por filtración y llevadas a freezer -80 °C para su posterior liofilización. Este proceso se llevó a cabo durante 12 h con una presión de 0,06 mbar y una temperatura de -54°C (Martin Christ ALPHA 1-4 LD plus). Las cápsulas fueron conservadas a temperatura de -20 °C hasta su administración a los terneros.

Las Gly12,5X, se administraron a los terneros del G-P junto con la leche en la toma de la tarde, en una dosis de  $10^{11}$  UFC/d (10 cap/ternero) durante los primeros 7 días y posteriormente con  $10^{10}$  UFC/d (5 cap/ternero).

### **3.2.6. Recuentos de la microbiota fecal**

Las muestras de materia fecal, 5 g aproximadamente, se obtuvieron por masaje rectal de doce terneros de cada grupo experimental al comenzar el estudio y a la semana 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 de ensayo. Se pesaron en condiciones estériles, se diluyeron 1/100 en solución Ringer ¼ y luego se homogeneizaron con un agitador magnético. Para determinar la carga microbiana, diluciones decimales de las muestras se sembraron en medios selectivos (tabla 5).

**Tabla 4.** Poblaciones microbianas estudiadas, medios y condiciones de cultivo utilizados.

Microorganismo	Medios	Condiciones de Cultivo	de Cita
Bacterias Lácticas	Ácido MRS	Anaerobiosis 48 h, 37 °C	(Blajman y col., 2017)
Coliformes	Violet red Bilis Lactose (VRBL)	Aerobiosis 24 h a 37 °C	(Soto y col., 2014)
Levaduras	Hongos y levaduras (HyL) modificado*	48 h, 37 °C	(Soto y col., 2014)
Inóculo	MRS+Rifampicina	Anaerobiosis 48 h, 37 °C	(Blajman y col., 2017)

\*Se adiciono 20 g/l de dextrosa y 5 g/l de pluripeptona)

### 3.2.7. Medición de parámetros de rendimientos y medidas corporales.

Al inicio del ensayo y semanalmente se registró el peso corporal (PC), el perímetro torácico (PT) y la altura a la cruz (AC). Por otro lado, diariamente se midió el consumo de alimento balanceado (CA). La ingesta total de alimento (ITA) se calculó de acuerdo con el consumo de leche y el AB. La ganancia de peso vivo (GPV) fue obtenida por la diferencia entre los pesos en el período correspondiente. La eficiencia alimenticia (EA) se calculó mediante la relación ITA (kg) y GPV (kg).

$$EA = \frac{\text{kg de ganancia de peso semanal}}{\text{kg de materia seca ingesta semanal}}$$

La materia seca se calculó de la siguiente fórmula: DMI = (ingesta semanal de leche (L) x 0,129) + consumo de concentrado (kg) x 0,95). Donde 0,129 es la concentración de sólidos de la leche de acuerdo con Alais (1985) y 0,95 es la concentración de sólidos del AB de acuerdo con el proveedor.

### 3.2.8. Consistencia Fecal

Con el fin de evaluar la frecuencia e intensidad de diarrea, la consistencia fecal (CF) se controló diariamente utilizando el método descrito por Meyer y col., (2001). Los criterios tenidos en cuenta por este método son los siguientes: 1 = consistencia

normal; 2 = blandas; 3 = moderadamente líquida 4 = consistencia principalmente líquida. Luego los días en que sufrieron diarreas (4) se consideraron como días totales de enfermedad (Noori y col., 2016).

### **3.2.9. Análisis de la dinámica poblacional de la microbiota predominante en el intestino de los terneros jóvenes por DGGE**

La dinámica poblacional de la microbiota fecal se analizó mediante la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE). Las muestras de materia fecal fueron tomadas en bolsas, de plástico estériles, mediante masaje rectal a 6 terneros del GC y 6 terneros del GP, en los días 0, 30 y 51 y se transportaron refrigeradas hasta el laboratorio. Una fracción de 0,2 g materia fecal de 6 terneros pertenecientes GC y GP fue tomada y conservada en eppendorf de 1,5 ml con medio PBS a -20 °C hasta su utilización.

### **3.2.10. Extracción de ADN de las muestras de materia fecal**

El ADN microbiano de las muestras de materia fecal de los terneros se extrajo mediante el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification. El protocolo utilizado para la extracción de ADN bacteriano fue el siguiente:

#### **A. Preparación de Materia Fecal**

1. Tomar los 0,2 g de materia fecal resuspendidos en PBS estéril. Centrifugar a 13.000 g durante 2 min y descartar el sobrenadante.
2. Suspender el sedimento en 480 µl de EDTA 50mM (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Estados Unidos).
3. Agregar 120 µl de lisozima (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos).
4. Incubar a 37 °C por 30-60 min.
5. Centrifugar a 13.000 g durante 2 min y descartar el sobrenadante.

#### **B. Lisis celular**

1. Resuspender el sedimento en microtubos con 600 µl de la solución de lisis (Nuclei Lysis Solution). Esta contiene tampones y detergentes que ayudan a lisar las bacterias, sin afectar el ADN.
2. Incubar a 80 °C durante 10 min. La temperatura alta también ayuda a desestabilizar la membrana. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
3. Añadir 3 µl de la solución de RNAsa y mezclar invirtiendo el tubo.

4. Incubar a 37 °C (temperatura de activación de la RNAsa) durante 15 min y dejar enfriar a temperatura ambiente.

### **C. Precipitación de proteínas**

1. Añadir 200 µl de la solución de precipitación de proteína. Mezclar con vórtex durante 20 s.

2. Incubar en hielo durante 5 min.

3. Centrifugar a 13.000 g durante 3 min.

### **D. Purificación (se utiliza isopropanol y etanol, los cuales ayudan a purificar y/o concentrar ADN, ARN y polisacáridos de soluciones acuosas).**

1. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo que ya contiene 600 µl de isopropanol (A-Iso) (Biopack, Buenos Aires, Argentina) y mezclar por inversión.

2. Centrifugar a 13.000 g durante 3 min y descartar el sobrenadante.

3. Añadir 600 µl de etanol al 70 % (Anedra, San Fernando, Argentina) y mezclar por inversión.

4. Centrifugar a 13.000 g durante 3 min.

5. Descartar el etanol. Dejar secar los tubos durante 10 min boca abajo sobre papel toalla.

### **E. Rehidratación (poner el ADN en solución).**

1. Rehidratar el pellet de DNA en 100 µl de la solución de rehidratación. Esta solución posee soluciones tampones que protegen el ADN.

2. Incubar a 65 °C durante 30 min.

#### **3.2.11. Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Una vez obtenido el ADN microbiano de la materia fecal, la concentración del mismo fue ajustada a 25-50 nmoles/µl utilizando el dispositivo Take3 y el software Gen5 para Windows versión 2.01 en un lector multimodal de microplacas (Sinergy HT, Bio-Tek, Winooski, Estados Unidos). Posteriormente se realizó la amplificación de la región codificante del gen 16S del ADNr (tabla 6) utilizando el kit GoTaq DNA Polimerase (Promega, Vilnius, Lituania). Para el mismo se utilizaron los primers específicos universales GC-HDA1 y HDA2 (Tabla 7) que amplifican la región V3 del gen del ADNr 16S (200 pb) (Gong y col., 2008). La electroforesis se llevará a cabo en un gel de poliacrilamida (8% p/v) a voltaje constante de 130 V a 60 °C durante 4 h, según lo descrito por Chen y col., (2011), utilizando un equipo D-Code Universal

Mutation Detection (Bio Rad). Con los perfiles obtenidos desde cada muestra se calculó la matriz de distancia usando el coeficiente de DICE (Matriz basada en las bandas) (Nei y Li, 1979) y se realizó un análisis de agrupamiento mediante el promedio aritmético no ponderado (UPGMA) (Mohammadi y Prasanna, 2003).

**Tabla 5.** Mezcla utilizada en la reacción de PCR para la amplificación del 16S ADNr.

Reactivo	Concentración	Concentración	µl/reacción
	Stock	final	
Mix	5X	1,3X	13 µl
Cebador GC-HDA1	10 µM	0,8 µM	4 µl
Cebador HDA2	10 µM	0,8 µM	4 µl
GoTaq DNA	5 U/µl	0,05 U	0,5 µl
Polimerase			
ADN molde			4 µl
H <sub>2</sub> O bidestilada estéril			24,5 µl
Total (µl)			50 µl

Por otro lado las bandas más representativas observadas en el gel se escindieron y se transfirieron a eppendorf con 50 µl de agua bidestilada estéril y se incubaron a 4°C durante 48 h para facilitar difusión del ADN. Luego, se tomó 1 µl del sobrenadante para re-amplificar EL ADN de las bandas (Del Panno, 2005) y los productos se secuenciaron para identificar la especie microbiana.

**Tabla 6.** Primers empleados para la amplificación de ADN de la comunidad de bacterias presentes en la materia fecal de los terneros.

Cebador	Sentido	Secuencia
CG-HDA1	Forward	5'-CGC CCG GGG CGC GCCCCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCCTAC GGG AGG CAG T-3'
HDA2	Reverse	5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTGGCA C-3'

La composición de la Mix utilizada en la amplificación de la fracción 16S del ADNr fue la que se detalla en la tabla 8.

**Tabla 7.** Solución Stock de Mix para PCR.

Reactivo	Concentración final en la solución stock
5X GoTaq Reaction Buffer* (MgCl <sub>2</sub> 7,5 mM)	3,85X
dNTPs Mix (dATP+dCTP+dGTP+dTTP)	0,8 μM**

\* Promega Catalog#9PIM300.

\*\*Concentración final de cada uno de los desoxiribonucleótidos.

Se empleó un termociclador MiniCycler™ (MJ Research, Waltham, Estados Unidos). Se utilizaron las mismas condiciones para todas las muestras en estudio y las condiciones de amplificación fueron las que se muestran en la tabla 9.

**Tabla 8.** Condiciones utilizadas para amplificar el ADNr 16S utilizando los primers GC-HDA1 y HDA2.

Número de Ciclos	Fase	Tiempo y temperatura
1	Desnaturalización inicial	94 °C durante 5 min
35	Desnaturalización	94 °C durante 30 s
	Hibridación	60 °C durante 1 min
	Polimerización	72 °C durante 30 s
1	Polimerización final	72 °C durante 7 min

A fin de descartar la presencia de contaminaciones indeseadas durante el desarrollo del proceso de amplificación, se empleó un control negativo el cual se constituyó con los reactivos a excepción del ADN. Esta mezcla de reacción se sometió junto a las demás muestras, al proceso de amplificación arriba mencionado.

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para verificar la amplificación del ADNr. El gel fue preparado a una concentración del 2 % de agarosa en tampón TBE 1X. Antes de colocar el gel en el soporte acrílico para su

armado, se le agrego el colorante fluorescente GEL RED (Biotium, Fremont, Estados Unidos) a una concentración final del 0,01 % (v/v). Una vez armado el gel se colocó 5 µl de la muestra en los pocillos destinados al producto de PCR. La electroforesis se realizó a 80V durante 40 min empleando TBE 1X como tampón de corrida. Una vez finalizada la electroforesis se visualizó el gel con luz UV en un transiluminador (Labnet, Woodbridge, Estados Unidos).

### **3.2.12. Preparación de los geles, electroforesis y tinción**

Los productos de PCR fueron separados mediante DGGE utilizando un equipo D-Code Universal Mutation Detection (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Estados Unidos) en geles de 16 cm x 16 cm x 0,1 cm. Las muestras se sembraron en geles de poliacrilamida 8 % p/v en tampón TAE. La separación óptima se alcanzó empleando gradientes desnaturalizantes urea-formamida 40 % a 55 % (100 % corresponde a 7 M de urea y 40 % v/v de formamida). Los geles con gradiente desnaturalizante fueron preparados empleando un sistema formador de gradiente constituido por jeringas y mangueras. Dos soluciones con distinta concentración de urea-formamida fueron elaboradas, e inmediatamente antes de su utilización, se agregó a cada solución 16 µl de TEMED (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Estados Unidos) y 162 µl de persulfato de amonio (Bio-Rad Laboratories, Miami, Estados Unidos) preparado al 10 %. Las soluciones de alta y baja densidad se cargaron en las jeringas y se vaciaron en la cavidad de los cristales. El peine formador de calles se colocó en el espacio existente entre los cristales y el gel se dejó polimerizar durante 60 min. Una vez formado el gel, los vidrios conteniendo el mismo se montaron sobre el soporte correspondiente y se colocaron en la cuba con tampón TAE a 60 °C. Luego se sembraron en cada fosa 10 µl de muestra con 10 µl de buffer de carga loading (2x). En cada extremo de los geles se sembró un patrón constituido por los productos de PCR de las siguientes cepas: *L. plantarum* DSPV 354T, *L. salivarius* DSPV 001, *L. casei* DSPV 318T, *C. jejuni* C173 y *S. enteritidis* 421E. La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante de 130 V durante 4 h a 60 °C. Los geles fueron teñidos con SYBR Safe (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos) y se visualizaron en un transiluminador Safe Imager Blue-Light (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos).

### **3.2.13. Identificación y sección de bandas desde un gel de DGGE**

Con una cámara digital (Nikon Coolpix S6300, Tokio, Japón) se capturaron imágenes de los geles de poliacrilamida. Las bandas obtenidas se compararon con la banda correspondiente a la cepa de referencia. El patrón de productos de PCR mencionado anteriormente fue utilizado para normalizar los geles. La similitud entre perfiles fue calculada mediante el método UPGMA empleando el programa BioNumerics versión 6.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Los resultados fueron presentados en forma de dendrograma. Además se llevó a cabo un análisis de secuenciación. Para esto, las bandas fueron extraídas con la ayuda de un bisturí, eluidas en tampón TE y almacenadas durante 48 h a 4 °C para permitir la difusión del ADN. Luego fueron reamplificadas con los primers originales utilizando el protocolo descrito anteriormente. Los productos de PCR fueron, nuevamente, analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa 2 % para corroborar la correcta amplificación del ADN.

### **3.2.14. Purificación y secuenciación de los productos de PCR**

Con la finalidad de eliminar los cebadores, posibles dímeros y otros reactivos de la PCR (Polimerasa, dNTPs, etc.), que podrían inhibir o dificultar la posterior reacción de secuenciación, el producto de PCR fue purificado. Para realizar esto, se utilizó el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, Estados Unidos) siguiendo las indicaciones suministradas por el fabricante. La secuenciación del ADN se realizó en MACROGEN (Corea del Sur).

### **3.2.15. Análisis de los componentes mayoritarios de la microbiota**

Para identificar los microorganismos mayoritarios de la microbiota intestinal de los terneros, de ambos grupos experimentales, las secuencias obtenidas anteriormente, fueron comparadas con las secuencias de 16S ADNr que se encuentran en el GenBank mediante el software BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) del NCBI (Altschul y col., 1990).

### **3.2.16. Análisis estadístico**

Se realizó un ANOVA de medidas repetidas para determinar si existían diferencias significativas entre las variables del G-C y G-P estudiadas (recuentos microbianos, PC, PT, AC, AE y GPV) Los resultados se expresarán como la media

aritmética y sus desvíos estándares. La frecuencia de diarrea se analizó mediante un modelo generalizado empleando una distribución logística ordinal como función de enlace. Las pruebas estadísticas se realizaron con el programa INFOSTAT versión 2011 (InfoStat Group, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

### **3.3. Generación del modelo experimental de infección por *Campylobacter jejuni* en terneros jóvenes**

#### **3.3.1. Microorganismos**

Para este estudio se usaron dos cepas del genero *Lactobacillus*: *L. casei* DSPV 318T cuyo número de acceso GenBank: FJ787305 y *L. plantarum* DSPV 354T (número de acceso GenBank: FJ751793). Estas cepas fueron seleccionadas por sus propiedades probióticas demostradas tanto *in vitro* como *in vivo* (Frizzo y col., 2011; Soto y col., 2014). Los microorganismos patógenos utilizados, fueron una cepa de *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 y otra cepa de *C. jejuni* ATCC 33560. Todas las cepas se encontraban conservadas en medio crioprotector elaborado según Terzolo (1984), en freezer – 80°C hasta su utilización.

#### **3.3.2. Inhibición de *Campylobacter jejuni* *in vitro***

Para seleccionar el microorganismo patógeno a utilizar, se evaluó si las bacterias probióticas *L. casei* DSPV 318T y *L. plantarum* DSPV 354T producen inhibición sobre *Campylobacter jejuni*.

Las dos cepas de *Lactobacillus*, se descongelaron y activaron en placas de MRS (Biokar, Beauvais, Francia) durante 48 h a 37 °C. Posteriormente, se tomó una colonia y se repicó en 10 ml de MRS (Biokar, Beauvais, Francia). Ambas cepas se cultivaron por separado durante 16 h a 37 °C. Una vez concluido el tiempo de incubación, se procedió a centrifugar los cultivos a 4500 g por 15 min, para obtener los extracto libre de células si neutralizar (ELCsn). A continuación se modificó el pH a  $6,5 \pm 0,2$  agregando hidróxido de sodio estéril 3 M, para obtener el extracto libre de células neutralizado (ELCn). Los ELCn y ELCsn se esterilizaron por filtración y se conservaron en freezer - 20°C hasta su utilización.

Por otro lado se incubaron en agar MCCDA dos cepas *C. jejuni* (*C. jejuni* ATCC 33560 y *C. jejuni* NCTC 11168) durante 48 h en un ambiente micro-aerófilico ( $H_2:CO_2:O_2 = 85:10:5$ ). Posteriormente, se tomó cultivo de *C. jejuni* con un ansa de

ojal y se lo diluyó en solución de ringer. La turbidez de la dilución se comparó con la escala Mc Farland 0,5 lo que equivaldría a 7 log de cultivo microbiano. A continuación se sembraron por hisopado placas de Müller Hilton agar con el agregado de sangre 6 % v/v. En estas placas, realizaron perforaciones en el agar de 5 mm y se añadieron 35 µl de ELCsn y ELCn de cada cepa de BAL. Como control positivo de formación de halo, se utilizó Ácido láctico diluido a ¼ y se sembró en un pocillo en el centro de la placa. Posteriormente, las placas se incubaron durante 48 h a 37 °C en condiciones de microaerofilia. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se observó la zona de inhibición alrededor de cada pocillo.

### **3.3.3. Animales e Instalaciones**

Se utilizaron 6 terneros (*Bos taurus*) con una edad promedio de 7 d. La crianza de los animales se realizó en corrales sobre piso de cemento (7,23m<sup>2</sup>/animales) pertenecientes a la FCV-UNL. Los corrales fueron limpiados con agua y escobillón una vez al día. Todos los animales fueron alimentados con alimento concentrado sin medicamentos suministrado ad libitum a lo largo del experimento y con sustituto lácteo (4 l/d) y agua, racionados directamente en el comedero 2 veces/d. El sustituto lácteo fue reconstituido al 11% de materia seca (MS) y entregado a los terneros, a las 6:00 y a las 18:00 h, a una temperatura de aproximadamente 38 °C. 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).

### **3.3.4. Diseño del experimento**

Los animales se dividieron en 3 grupos experimentales de 2 animales cada uno grupo control (G-C), grupo *Campylobacter* 6 (G-C6) grupo *Campylobacter* 10 (G-C10). El patógeno se administró oralmente en una dosis total de 0, 10<sup>6</sup> UFC/animal y 10<sup>10</sup> UFC/animal respectivamente 5 d después del inicio del ensayo. 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. 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 frecuencia de diarreas realizando un análisis macroscópico de las heces. En base a estos dos

parámetros se determinó el estado de enfermedad del animal (temperatura rectal > 40,5 °C y escore fecal 4). Los datos de temperatura corporal y frecuencia de diarreas se registraron diariamente. Las muestras de materia fecal fueron tomadas al inicio del ensayo y día por medio luego del suministro del patógeno para efectuar un monitoreo del mismo.

### **3.3.5. Preparación del inóculo y administración**

La cepa de *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 fue multiplicada en caldo Bolton durante 24 h a 42 °C en microaerofilia ( $H_2:CO_2:O_2 = 85:10:5$ ). Luego de una centrifugación del cultivo a 3000 g durante 10 min a 20 °C el sedimento se suspendió en 100 ml de leche. La administración se realizó en una dosis única disuelta en 100 ml de leche.

### **3.3.6. Composición de los alimentos**

Todos los alimentos utilizados durante el ensayo no tuvieron suplemento de antibióticos. El alimento comercial fue formulado con los siguientes ingredientes: maíz molido, expeller de soja, afrechillo de trigo, núcleo vitamínico mineral 50% orgánico y 50% inorgánico, macrominerales (Calcio, Sal, Fosfato, Oxido de Magnesio) y monensina. El mismo contenía 95% MS, 21% de proteína, 3 Mcal kg/MS, 16 % de extracto etéreo, 8% minerales totales, 1 - 1,2 % de calcio

El sustituto lácteo estaba formulado con leche en polvo entera, leche en polvo descremada, suero en polvo parcialmente desmineralizado, concentrado de proteínas de suero de queso en polvo al 35%, cloruro de sodio, fosfato bicálcico, núcleo vitamínico (vitaminas A, D3 y E) mineral (hierro, zinc, manganeso, cobre, selenio, yodo y cobalto), antioxidante (Etoxiquina), saborizante (fécula de maíz, aceite esencial de naranja, silicato de calcio, sacarina, gama n butirrolactona, aldehído benzoico, dextrosa, ciclamato de sodio, benzodihidripirona), coloreante (Carmín de cochinilla) y monensina 100 ppm. El mismo contenía 0,7% de calcio, 0,3 % de cloro, 22 mg/Kg de cobre, 0,1 % de cobalto, 3 mcal/Kg de E. metab/Tern (mcal/Kg), 5 % de fibra cruda, 0,5 % de fosforo total, 3,5 % de grasa, 62 mg/Kg de hierro, 0,8 % de lisina, 84 mg/Kg de manganeso, 19% de proteína, 0,4 mg/Kg de selenio, 0,2 % de sodio, 21688 UI/Kg de vitamina A, 4337 UI/Kg de vitamina D3, 55 UI/Kg de vitamina E, 0,3 mg/Kg de yodo y 82 mg/Kg de zinc.

### **3.3.7. Detección de *Campylobacter jejuni* en materia fecal**

Las muestras de materia fecal (5 g aproximadamente), de los terneros de cada grupo, fue obtenida en condiciones asépticas mediante masaje rectal. Las muestras 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 en placas de mCCDA agar para *Campylobacter*. Las placas fueron incubadas durante 48 h a 42 °C en microaerofilia ( $H_2:CO_2:O_2 = 85:10:5$ ). El recuento de *Campylobacter* termotolerante fue expresado en log UFC/g. El hallazgo de colonias típicas junto a su visualización en microscopio fue considerado como resultado positivo a *Campylobacter*.

### **3.3.8. Análisis estadístico**

Se realizó un ANOVA de medidas repetidas para determinar si existían diferencias significativas entre las variables del G-C, G-C6 y G-C10 estudiadas (recuentos microbianos y temperatura) Los resultados se expresarán como la media aritmética y sus desvíos estándares. La frecuencia de diarrea se analizó mediante un modelo generalizado empleando una distribución logística ordinal como función de enlace. Las pruebas estadísticas se realizaron con el programa INFOSTAT versión 2011 (InfoStat Group, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina),

## **3.4. Evaluación del efecto de microorganismos benéficos sobre terneros jóvenes infectados con *Campylobacter jejuni*.**

### **3.4.1. Animales**

Se utilizaron 9 terneros (*Bos taurus*) con una edad promedio de 4 d. La crianza de los animales se realizó en corrales con piso de cemento (4,84m<sup>2</sup>/animales) pertenecientes a la FCV-UNL. Todos los animales fueron alimentados con alimento concentrado sin medicamentos suministrado ad libitum a lo largo del experimento y con sustituto lácteo (4 l/d) y agua, racionados directamente en el comedero 2 veces/d. El sustituto lácteo fue reconstituido al 11% de MS y entregado a los terneros, a las 6:00 y a las 18:00 h, a una temperatura de aproximadamente 38 ° C. Además al grupo probiótico se le administró una cápsula que contenía los microorganismos junto con el sustituto lácteo en la toma de la mañana. Los terneros permanecieron en experimentación durante un período de 42 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).

### **3.4.2. Composición del alimento**

Todos los alimentos utilizados durante el ensayo no tuvieron suplemento de antibióticos. La composición de los alimentos administrados a los terneros es la misma que se describió en el apartado 3.3.6.

### **3.4.3. Diseño del experimento**

Los animales se dividieron en 3 grupos experimentales, y cada grupo conto con tres animales –grupo control (G-C), grupo *Campylobacter* (G-CP), grupo probiótico (G-PC). El patógeno se administró oralmente en una dosis total de  $10^{10}$  UFC/animal, 7 d después del inicio del ensayo en los tres terneros de los grupos G-C10 y GP. Los terneros permanecieron en el ensayo por 42 días. Los datos de temperatura corporal y frecuencia de diarreas se registraron diariamente. Se determinó el consumo de leche y balanceado diariamente y el peso de los animales se tomó semanalmente. Las muestras de materia fecal se tomaron al inicio del ensayo y día por medio luego del suministro del patógeno para efectuar un monitoreo del mismo.

### **3.4.4. Preparación y administración de microorganismos probióticos.**

Para este estudio se utilizaron las dos cepas de *Lactobacillus* resistentes a rifampicina que describieron en el apartado 3.2. El inóculo probiótico fue preparado como se describió en el apartado 3.1.4. Las cápsulas fueron conservadas en freezer -20 °C hasta su utilización.

### **3.4.5. Preparación y administración del Patógeno**

La cepa de *C. jejuni* NCTC 11168 fue preparada y administrada de igual manera a lo descrito en el apartado 3.3.

### **3.4.6. Análisis microbiológico en materia fecal**

Las muestras fecales de todos los terneros de cada grupo (aproximadamente 5 g) fueron obtenidas por masaje rectal al inicio del tratamiento y a la semana 1, 2, 3, 4, y 5 del ensayo para determinar la presencia de *Escherichia coli*, levaduras, bacterias lácticas y monitorear el inóculo probiótico. Por otro lado se obtuvieron muestras de materia fecal al inicio del ensayo y día por medio para monitorear la presencia del patógeno. Las

muestras de materia fecal fueron pesadas, diluidas 1/100 en solución Ringer ¼ y homogeneizadas con ayuda de un vortex. A partir de las diluciones seriadas de cada muestra se sembraron placas con diferentes medios para el recuento de las poblaciones mencionadas anteriormente (Tabla 14).

**Tabla 9.** Poblaciones microbianas estudiadas, medios y condiciones de cultivo utilizados

Microorganismo	Medios	Condiciones de Cultivo		
Bacterias Lácticas	Ácido MRS	Anaerobiosis 48h, 37 °C		(Blajman y col., 2017)
<i>E. coli</i>	TBX	Aerobiosis 24h a 37 °C		(Agazzi y col., 2014)
Levaduras	Hongos y Levaduras modificado*	48h, 37 °C		(Soto y col., 2014)
<i>C. jejuni</i> NCTC 11168.	mCCDA	Microaerofilia (H <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> :O <sub>2</sub> = 85:10:5), 24 h a 42 °C		(Lucas y col., 2013)
Inóculo	MRS+Rifampicina	Anaerobiosis 48h, 37 °C		(Blajman y col., 2017)

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

### 3.4.7. Registro de signos clínicos

Se determinó diariamente el estado de salud de los animales: temperatura corporal y frecuencia de diarreas realizando un análisis macroscópico de las heces. La temperatura se determinó como normal hasta 40,5 °C. La evaluación de la consistencia fecal se realizó en base a los siguientes parámetros propuestos por Meyer y col. (2001): y se tomo la misma puntuación de score a las descriptas en el apartado 3.2.8.

### 3.4.8. Hemograma

Las muestras de sangre (10 ml) fueron tomadas al inicio del ensayo y una vez por semana hasta finalizar la experiencia. La sangre se tomó de la vena yugular utilizando jeringas con agujas hipodérmicas y se colocó en tubos con EDTA como anticoagulante.

Las muestras fueron procesadas en un contador hematológico automatizado mindray equipado con software para muestras bovinas (Mindray BC-3000Plus, Nanshan, China). A partir de estas muestras se evaluó el recuento de globulos blancos, el hemograma, la hemoglobina y el hematocrito.

#### **3.4.9. Análisis de la dinámica poblacional de la microbiota predominante en el intestino de los terneros jóvenes por DGGE**

La dinámica poblacional de la microbiota fecal se analizó mediante la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE). Las muestras de materia fecal fueron tomadas en bolsas, de plástico estériles, mediante masaje rectal a todos los terneros del G-C, G-CP y G-PC en los días 0, 21 y 46 y se transportaron refrigeradas hasta el laboratorio. Una fracción de 0,2 g materia fecal de los terneros pertenecientes G-C, G-CP y G-PC, fue tomada y conservada en eppendorf de 1,5 ml con medio PBS a -20 °C hasta su utilización. Posteriormente, se procedio como se describió en el apartado 3.2.

#### **3.4.10. Análisis estadístico**

Se realizó un ANOVA de medidas repetidas para determinar si existían diferencias significativas entre las variables del G-C, G-C10 y G-P estudiadas (recuentos microbianos, peso vivo, consumo de alimentos y hemograma) Los resultados se expresaron como la media aritmética y sus desvíos estándares. La frecuencia de diarrea se analizó mediante un modelo generalizado empleando una distribución logística ordinal como función de enlace. Las pruebas estadísticas se realizaron con el programa INFOSTAT versión 2011 (InfoStat Group, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

### **3.5. Evaluación de la diseminación del patógeno utilizando modelos probabilísticos.**

#### **3.5.1. Animales e instalaciones**

Para elaborar el modelo matemático para evaluar el impacto de las enfermedades gastrointestinales que afectan a los terneros se realizó un ensayo donde se utilizaron 4 terneros (*Bos taurus*) con una edad promedio de 4 d. La crianza de los animales se

realizó en corrales con piso de cemento ( $3.61 \text{ m}^2/\text{animal}$ ) pertenecientes a la FCV-UNL. Todos los animales fueron alimentados con alimento concentrado sin medicamentos suministrado *ad libitum* a lo largo del experimento y con sustituto lácteo (4 l/d) y agua, racionados directamente en el comedero 2 veces/d. El sustituto lácteo fue reconstituido al 11% de MS y entregado a los terneros, a las 6:00 y a las 18:00 h, a una temperatura de aproximadamente  $38 \text{ }^\circ\text{C}$ . Los terneros permanecieron en experimentación durante un período de 42 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).

### **3.5.2. Microorganismos**

Para este estudio se utilizó una cepa patógena de *C. jejuni* NCTC 11168. La misma se encontraban conservadas en medio crioprotector elaborado según Terzolo (1984), en freezer  $-80^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

### **3.5.3. Preparación y administración del Patógeno**

La cepa de *C. jejuni* NCTC 11168 fue multiplicado en caldo Muller Hilton durante 24 h a  $42 \text{ }^\circ\text{C}$  en microaerofilia ( $\text{H}_2:\text{CO}_2:\text{O}_2 = 85:10:5$ ). Luego de una centrifugación del cultivo a 3000g durante 10 min a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  el sedimento se suspendió en leche descremada. El recuento en placa se efectuó en mCCDA agar para *Campylobacter*. Se utilizó una dosis  $10^{10}$  UFC/ternero y la misma se realizó en una dosis única disuelta en 100 ml de leche.

### **3.5.4. Diseño del experimento**

Los animales se alojaron en un corral con piso de cemento. El patógeno se administró oralmente, a un solo animal del grupo, en una dosis total de  $10^{10}$  UFC, 7 días después del inicio del ensayo. Los terneros permanecieron en el ensayo por 42 días. Diariamente se registraron datos de temperatura corporal. Las muestras de materia fecal se tomaron al inicio del ensayo, el día de inoculación del patógeno y posteriormente día por medio hasta finalizar el ensayo para efectuar el monitoreo de *Campylobacter*.

### **3.5.5. Análisis microbiológico en materia fecal**

Las muestras fecales de todos los terneros del grupo (aproximadamente 5 g) fueron obtenidas por masaje rectal al inicio del tratamiento, al momento de la inoculación con el patógeno y día por medio hasta finalizar el ensayo para determinar la presencia de *C. jejuni* NCTC 11168. Las muestras de materia fecal fueron pesadas, diluidas 1/100 en solución Ringer ¼ y homogeneizadas con ayuda de un vortex. A partir de las diluciones seriadas de cada muestra se sembraron placas de medio mCCDA y se incubaron a 42°C por 48h.

### **3.5.6. Análisis estadístico**

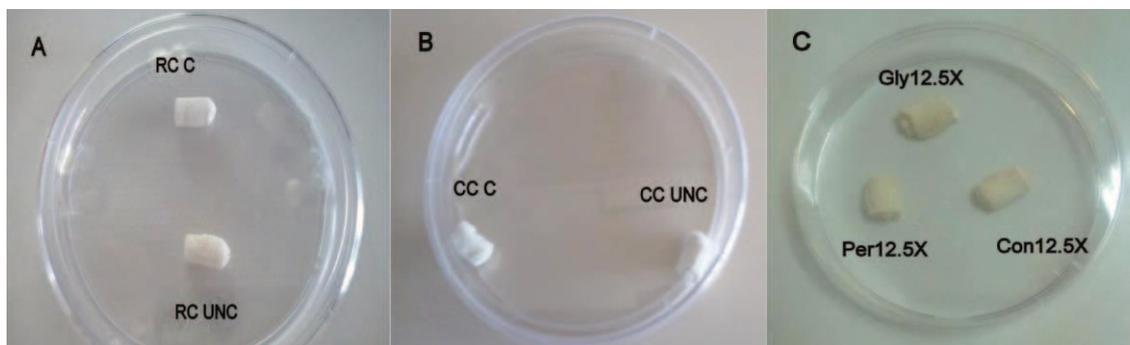
Se realizó un análisis de modelo lineal generalizado con el fin de evaluar la proporción de animales que se infectan en relación al tiempo y la presencia de *C. jejuni* en los animales. Con el fin de evaluar la disminución de Campylobacter en los animales se realizó una regresión lineal. Las pruebas estadísticas se realizaron con el programa INFOSTAT versión 2011 (InfoStat Group, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

## 4. Resultados



#### 4.1. Evaluación de la viabilidad de cepas probióticas conservadas en cápsulas secadas mediante liofilización

Las diferentes cápsulas desarrolladas en este trabajo se muestran en la Figura 9.



**Figura 9.** Diferentes tipos de cápsulas. A) Cápsulas reincubadas recubiertas con quitosano (RC R); Cápsulas reincubadas sin recubrimiento con quitosano (RC NR). B) Cápsulas concentradas recubiertas con quitosano (CC R); Cápsula concentrada sin recubrimiento con quitosano (CC NR). C) Cápsulas con crioprotectores (Gly12,5X: cápsulas concentradas 12,5X con glicerol; Per12,5X: cápsulas concentradas 12,5X con permeado de suero; Con12,5X: cápsulas de control 12,5X sin crioprotectores).

##### 4.1.1. Efecto del tipo de cápsulas sobre la viabilidad celular

Durante los 84 d que duró el ensayo todos los factores analizados (tipo de cápsula, temperatura de conservación y el recubrimiento) mostraron diferentes efectos sobre la viabilidad bacteriana.

Los recuentos bacterianos resultaron diferentes en las distintas técnicas evaluadas para la producción de macrocápsulas antes de aplicar el proceso de liofilización ( $P < 0,05$ ). Después de aplicado el proceso de liofilización las cápsulas CC12,5X presentaron recuentos bacterianos superiores al encontrado en las cápsulas RC y CC5X ( $P < 0,05$ ). Las diferencias entre los recuentos bacterianos de cada una de las técnicas estudiadas, antes y después del proceso de liofilización, solo resultaron significativas ( $P < 0,05$ ) en las cápsulas CC5X, mostrando éstas las mayores pérdidas de viabilidad. En las cápsulas RC y CC12,5X las diferencias de viabilidad no resultaron significativas ( $P > 0,05$ ) (Tabla 19).

**Tabla 10** Recuentos microbianos previo y posterior al proceso de liofilización y durante el almacenamiento a diferentes temperaturas (temperatura ambiente y refrigeración) durante 84 d en diferentes tipos de cápsulas.

	Recuento microbiano (log UFC/cap.)					
	RC R	RC NR	CC5X R	CC5X NR	12,5X R	12,5X NR
Pre liofilización	9,08 ± 0,37Aa	9,04 ± 0,56Aa	9,48 ± 0,17Ba	9,52 ± 0,13Ba	10,06 ± 0,15Ca	10,21 ± 0,27Ca
Post liofilización	8,78 ± 0,37Aa	8,67 ± 0,56Aa	8,89 ± 0,17Ab	8,70 ± 0,13Ab	9,71 ± 0,15Ca	9,43 ± 0,27Ca
Temperatura ambiente						
14d	7,78 ± 0,25	6,92 ± 0,55	5,97 ± 0,14	4,64 ± 0,34	< 1,70 ± 0,00	3,34 ± 0,32
28d	4,13 ± 0,36	4,57 ± 0,25	5,58 ± 0,08	3,05 ± 0,94	< 1,70 ± 0,00	< 1,70 ± 0,00
42d	4,62 ± 0,24	4,48 ± 1,00	5,53 ± 0,47	1,73 ± 0,81	< 1,70 ± 0,00	< 1,70 ± 0,00
56d	1,47 ± 0,40	< 1,70 ± 0,00	5,26 ± 0,10	< 1,70 ± 0,00	< 1,70 ± 0,00	< 1,70 ± 0,00
70d	< 1,70 ± 0,00	1,67 ± 0,06	4,79 ± 0,52	< 1,70 ± 0,00	< 1,70 ± 0,00	< 1,70 ± 0,00
84d	< 1,70 ± 0,00	1,77 ± 0,12	< 1,70 ± 0,00	< 1,70 ± 0,00	< 1,70 ± 0,00	< 1,70 ± 0,00
Refrigeración						
14d	7,78 ± 0,25	6,92 ± 0,55	7,13 ± 0,26	7,88 ± 0,13	8,17 ± 0,20	7,97 ± 0,08
28d	6,05 ± 0,02	6,97 ± 0,33	8,06 ± 0,24	7,34 ± 0,08	7,70 ± 0,08	7,37 ± 0,08
42d	6,20 ± 0,49	7,17 ± 0,62	7,26 ± 0,10	8,51 ± 0,04	7,65 ± 0,08	6,39 ± 0,25
56d	2,00 ± 0,00	3,6 ± 0,00	8,19 ± 0,10	8,01 ± 0,22	6,95 ± 0,06	6,65 ± 0,17
70d	3,06 ± 0,59	4,92 ± 0,46	6,04 ± 3,76	6,44 ± 0,01	6,53 ± 0,29	6,58 ± 0,15
84d	2,64 ± 0,68	3,54 ± 0,09	5,96 ± 0,21	7,66 ± 0,10	6,18 ± 0,40	5,82 ± 0,11

RC: cápsulas hechas por la técnica de reincubación; CC5X: cápsulas hechas por la técnica de concentración 5X; CC12,5X: cápsulas hechas por la técnicas de concentración 12,5X. C: cápsulas recubiertas con quitosano; UNC: cápsulas no recubiertas con quitosano; log UFC/cap.: logaritmo unidades formadoras de colonias por cápsulas.

En cuanto a la viabilidad a lo largo del tiempo, el tipo de técnica utilizada en la producción de macrocápsulas influyó sobre la viabilidad bacteriana ( $P < 0,05$ ) durante su almacenamiento.

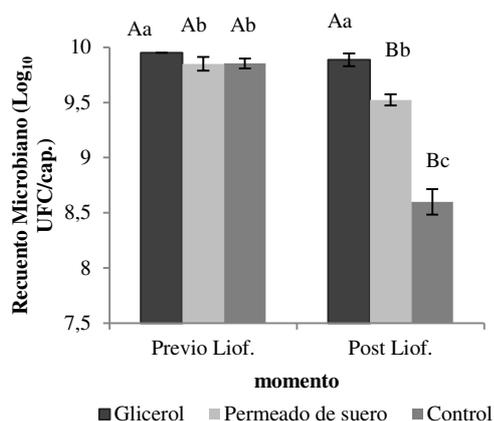
La temperatura de almacenamiento mostró tener efecto sobre la viabilidad bacteriana a lo largo del tiempo. En las cápsulas mantenidas a temperatura ambiente, la viabilidad bacteriana disminuyó por debajo del NMS antes del día 14 de estudio ( $P < 0,05$ ). Por su parte, las cápsulas conservadas a 4 °C si bien mostraron una disminución de los recuentos en los primeros 14 días, mantuvieron mayor viabilidad a lo largo del tiempo, destacándose las cápsulas concentradas (CC5X y CC12,5X), en las cuales los recuentos estuvieron por encima del NMS hasta el final del estudio. La viabilidad bacteriana en las cápsulas RC conservadas a 4°C se mantuvo por encima del NMS hasta el día 42 del ensayo (tabla 19).

El recubrimiento no influyó en la viabilidad bacteriana en las RC y en las CC12,5X ( $P>0,05$ ) en ambas temperaturas de almacenamiento. Sin embargo en las CC5X conservadas a TA, aquellas cápsulas que tenían recubrimiento de quitosano, tuvieron mayor viabilidad bacteriana ( $P<0,05$ ), no ocurriendo esto en las cápsulas conservadas a 4°C ( $P>0,05$ ).

#### 4.1.2. Efecto de los crioprotectores a 4°C y TA

Para evaluar el efecto de los crioprotectores sobre la viabilidad bacteriana se eligieron las cápsulas CC12,5X. Esta elección se basó en los resultados obtenidos en la sección 4.1.1 donde se observó que este tipo de cápsula presentó el mayor recuento inicial.

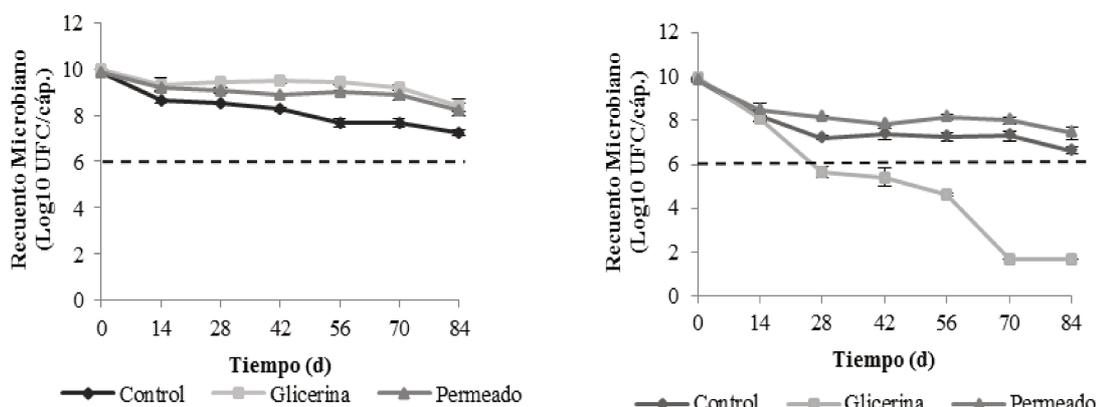
La aplicación de crioprotectores redujo la pérdida de viabilidad durante la liofilización ( $P<0,05$ ). En las cápsulas Gly12,5X la pérdida de biomasa bacteriana (figura 6) no resultó significativa ( $P>0,05$ ), mientras que en las Per12,5X y Con12,5X la pérdida de viabilidad como consecuencia del proceso de liofilización resultó significativa ( $P<0,05$ ). La pérdida de viabilidad fue de 0,06 log UFC/cap. para Gly12,5X, de 0,3 log UFC/cap. para las Per12,5X y 1,25 log UFC/cap. para las Con12,5X.



**Figura 10.** Efecto de las sustancias crioprotectoras durante el proceso de liofilización. Las letras en minúsculas representan la diferencia de recuento microbiana entre las cápsulas dentro de cada etapa del proceso. Las letras mayúsculas representan diferencia de recuento en las cápsulas entre las distintas etapas del proceso.

La utilización de un crioprotector mostró tener efecto positivo en el mantenimiento de la viabilidad bacteriana a lo largo del tiempo. La temperatura de conservación influyó en la viabilidad bacteriana según la sustancia crioprotectora elegida ( $P < 0,05$ ). Cuando las muestras se mantuvieron a  $4^{\circ}\text{C}$  en los tres tipos de cápsulas se observó una disminución de la viabilidad en los primeros 14 d, momento a partir del cual se mantuvo la viabilidad por encima del NMS (figura 10 A). No obstante, las cápsulas control mostraron una mayor pérdida de viabilidad a lo largo del tiempo ( $P < 0,05$ ). Por su parte, las Gly12,5X tuvieron recuentos mayores que las Per12,5X hasta el día 70 del ensayo ( $P < 0,05$ ), momento a partir del cual dichas diferencias dejaron de ser significativas ( $P > 0,05$ ). Con ambos crioprotectores se lograron recuentos superiores a  $10^8$  UFC/cap al día 84 del ensayo.

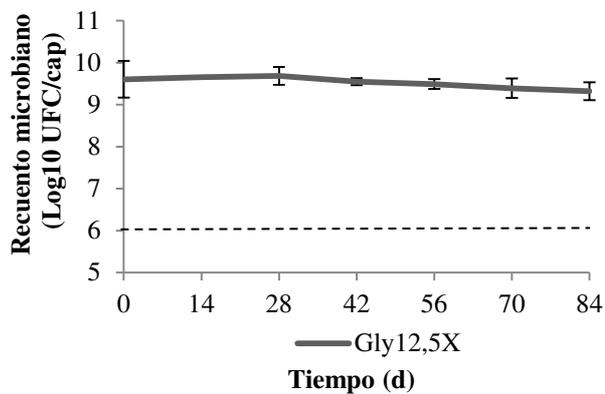
Todas las capsulas conservadas a TA mostraron una pérdida de viabilidad al día 14 del ensayo ( $P < 0,05$ ), momento en el que no se encontraron diferencias entre las cápsulas ( $P > 0,05$ ). A partir de ese momento, las cápsulas Per12,5X y las Con25X mantuvieron la viabilidad por encima del NMS durante todo el ensayo, mientras que las Gly12,5X mostraron una pérdida significativa ( $P < 0,05$ ) en la viabilidad bacteriana, alcanzando valores inferiores al NMS (figura 10 B). Al finalizar el ensayo las cápsulas mantenidas a TA alcanzaron los siguientes valores: Per12,5X = 7,40 log ufc/cap; Con12,5X = 6,65 log ufc/cap y Gly12,5X = 1,70 log ufc/cap.



**Figura 11.** Viabilidad bacteriana de cápsulas hechas con diferentes medios crioprotectores almacenados a  $4^{\circ}\text{C}$  (figura A) y almacenadas a TA (figura B.). La línea punteada representa el NMS.

#### 4.1.3. Efecto protector del glicerol a -20°C

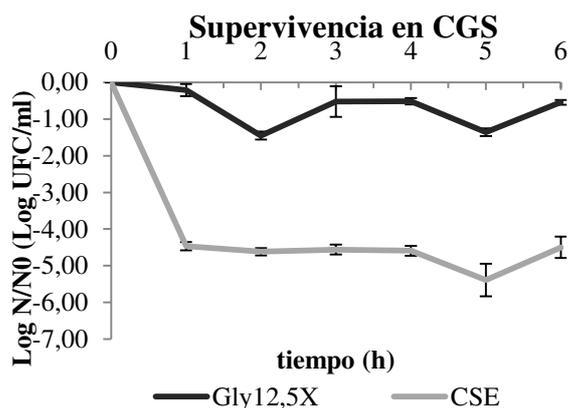
Se seleccionaron las cápsulas Gly12,5X para esta prueba debido a que fueron las cápsulas que presentaron mayor viabilidad bacteriana después del proceso de liofilización. Las Gly12,5X mantuvieron una viabilidad por encima de los 9 log de UFC durante los 84 d que duro el ensayo bajo estas condiciones de almacenamiento (figura 12 )



**Figura 12.** Viabilidad bacteriana de cápsulas Gly12,5X almacenadas a -20°C. La línea punteada representa el NMS.

#### 4.1.4. Supervivencia de células sin encapsular y encapsuladas en soluciones gástricas simuladas

La pérdida de viabilidad de las cepas de *Lactobacillus*, tanto en su forma libre como encapsuladas, durante el ensayo de supervivencia a condiciones gastrointestinales simuladas se observa en la figura 13.



**Figura 13.** Pérdida de viabilidad de *L. casei* y *L. plantarum* encapsulados (Gly12,5X) y sin encapsular (CSE) en condiciones gástricas simuladas durante 6 h. La imagen muestra el desvío estándar ( $\pm$ ). CGS: condiciones gástricas simuladas.

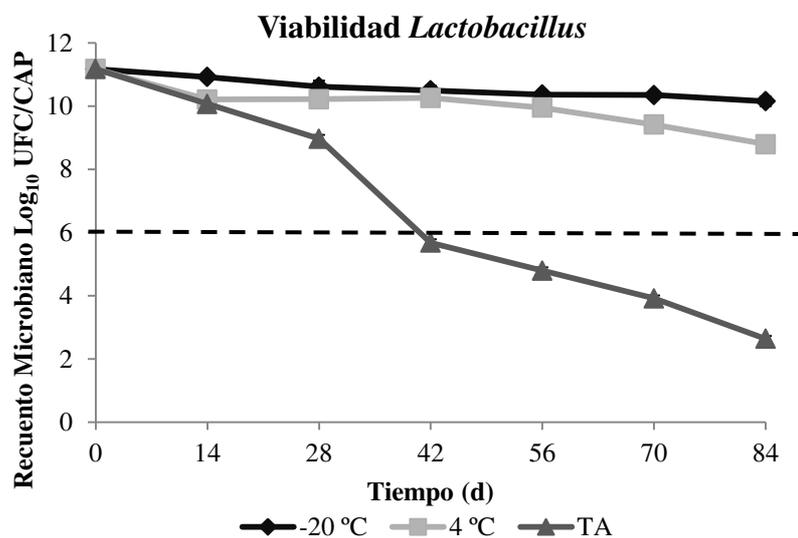
La viabilidad de las cepas probióticas fue mayor en las Gly12,5X que en su forma no encapsulada a lo largo del ensayo ( $P < 0,05$ ).

En el tiempo cero los recuentos bacterianos fueron de 10,12 log UFC/ml y 9,10 log UFC/ml para las Gly12,5X y las CSE respectivamente. La viabilidad de las CSE se redujo significativamente a partir de la primera hora de ensayo ( $P < 0,05$ ) siendo la tasa de supervivencia del 50,92 % (4,63 log UFC/ml) habiendo una pérdida de 4,47 log UFC/ml. En cambio en las Gly12,5X se redujo significativamente la viabilidad a partir de la segunda hora de ensayo ( $P < 0,05$ ) siendo la tasa de supervivencia 97,98% (9,91 log UFC/cap) habiendo una pérdida de viabilidad de 1,45 log UFC/Cap. Posteriormente, luego de una hora de digestión en JIS pudo observarse una recuperación de la viabilidad en las Gly12,5X pero no así en las CSE. Al finalizar las 6 h de ensayo la tasa de supervivencia fue de 94,6 % (9,68 log UFC/cap) para las Gly12,5X, habiendo una pérdida de 0,55 log UFC/cap en relación al tiempo 0. En cambio para las CSE la tasa de supervivencia fue de 50,6% (4,61 log UFC/cap) habiendo una pérdida de viabilidad de 4,50 log UFC/ml en relación con el tiempo 0.

#### 4.1.5. Viabilidad microbiana en cápsulas concentradas 11 log (CAP11)

La aplicación del proceso de liofilización resultó en una pérdida significativa de viabilidad bacteriana ( $P < 0,05$ ). La concentración de probióticos de las CAP11 antes del proceso de liofilización fue de 11,25 log UFC/cap y de 11,03 log UFC/cap luego del mismo, habiendo una pérdida de 0,22 log UFC/cap.

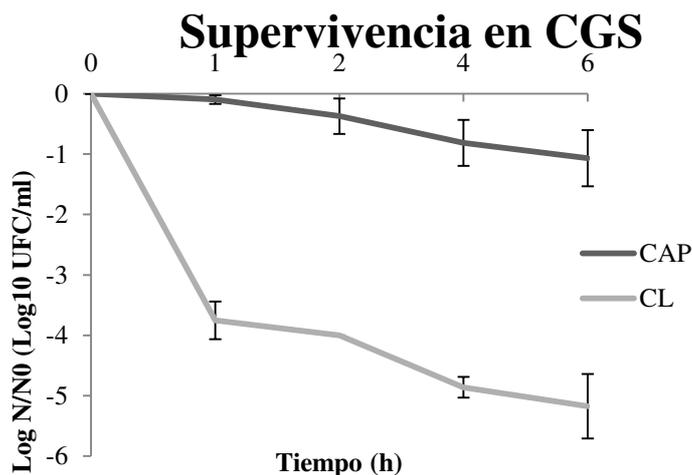
Por otro lado, la temperatura de almacenamiento afectó la viabilidad bacteriana a lo largo del tiempo. Las CAP11, conservadas en las diferentes temperaturas, tuvieron pérdida de viabilidad a lo largo de los 84 días de ensayo ( $P < 0,05$ ). La viabilidad bacteriana de las CAP11 mantenidas a TA fue la que más se redujo, disminuyendo por debajo del NMS antes del día 56 de estudio ( $P < 0,05$ ). Por su parte, las CAP11 conservadas a  $4^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$  mantuvieron su viabilidad por encima del NMS durante los 84 días de ensayo. Las CAP11 conservadas a temperatura de congelación fueron las que mejor mantuvieron la viabilidad comparado con las de TA y  $4^{\circ}\text{C}$  ( $p < 0,05$ ). Las CAP11 preservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  presentaron una viabilidad de 9,84 log UFC/cap al finalizar el ensayo, mientras que las CAP11 a  $4^{\circ}\text{C}$  tuvieron una viabilidad de 8,29 log UFC/cap y de 2,98 log UFC/cap para las de TA (Figura 13).



**Figura 14.** Recuento microbiano de cápsulas almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  y TA durante 84 días. La línea punteada representa el NMS. Datos representados como media  $\pm$  desviación estándar.

#### 4.1.6. Supervivencia de células sin encapsular y encapsuladas en soluciones gástricas simuladas

La pérdida de viabilidad de las cepas de *Lactobacillus*, tanto en su forma libre como encapsuladas, durante el ensayo de supervivencia a condiciones gastrointestinales simuladas se observa en la figura 15. La viabilidad de las cepas probióticas fue mayor en las CAP11 que en su forma libre a lo largo del ensayo ( $P < 0,05$ ).



**Figura 15.** Pérdida de viabilidad de *L. casei* y *L. plantarum* encapsulados (Gly12,5X) y sin encapsulados (CSE) en condiciones gástricas simuladas durante 6 h. La imagen muestra la media y el desvió estándar ( $\pm$ ).

En el tiempo cero los recuentos bacterianos fueron de 11,17 log UFC/ml y 9,52 log UFC/ml para las CAP11 y las CSE respectivamente. La viabilidad de las CSE se redujo significativamente a partir de la primera hora de ensayo ( $p < 0,05$ ) siendo la tasa de supervivencia de 61% (5,76 log UFC/CAP), habiendo una pérdida de viabilidad de 3,75 log UFC/ml. En cambio en las CAP11 se redujo significativamente la viabilidad a partir de la segunda hora de ensayo ( $p < 0,05$ ) siendo la tasa de supervivencia del 97% (10,80 log UFC/CAP), habiendo una pérdida de viabilidad de 0,37 log UFC/cap. Posteriormente, luego de 2 h de digestión en JIS a pH5, se observó una pérdida de 0,81 log UFC/cap para las CAP11 y de 4,15 log UFC/ml para las CSE siendo la tasa de supervivencia de 93% y 49% respectivamente. La tasa de supervivencia al final del ensayo fue 46% para las CSE y del 90 % para las CAP11 siendo la pérdida de viabilidad de 4.35 log UFC/ml y de 1,07 log UFC/cap respectivamente en relación al tiempo 0 ( $P < 0,05$ ). El recuento final fue de 10,1 log UFC/cap para las CAP11 y de 5,18 log UFC/ml para las CSE.

En la tabla 11 se resume la capacidad para mantener la viabilidad bacteriana de cada tipo de cápsula.

**Tabla 11.** Recuento microbiano después de liofilizado (0 d) y después de 84 días (84 d) frente diferentes condiciones de almacenamiento (temperatura ambiente, refrigeración (4°C) y congelación (-20°C)) en los diferentes tipos de cápsulas y el tiempo en el que la

viabilidad celular se mantiene por encima del nivel mínimo sugerido (NMS) en la cápsula.

Cápsulas	Recuento Microbiano (log UFC/cap)							
	Día 0	Temperatura ambiente		Refrigeración (4 °C)		Congelación (- 20 °C)		
		Día	NMS	Día	NMS	Día 0	Día	NMS
		84	(d) <sup>a</sup>	84	(d)		84	(d)
RC R	8,78	< 1,70	14	2,64	42	ND	ND	ND
CC5X R	8,89	< 1,70	14	5,96	84	ND	ND	ND
CC12,5X R	9,71	< 1,70	0	6,18	84	ND	ND	ND
RC NR	8,67	1,77	14	3,54	42	ND	ND	ND
CC5X NR	8,70	< 1,70	0	7,66	84	ND	ND	ND
CC12.5X RC	9,43	< 1,70	0	5,82	70	ND	ND	ND
<b>Crioprotectores<sup>b</sup></b>								
Con12,5X	9,85	6,65	84	7,26	84	ND	ND	ND
Gly12,5X	9,95	< 1,70	14	8,42	84	9,60	9,32	84
Per12,5X	9,85	7,43	84	8,24	84	ND	ND	ND
<b>Cápsulas 11 log</b>								
CAP11	11,03	2,98	56	8,29	84	11,03	9,84	84

RC: cápsulas hechas con la técnica de reincubación; CC5X: cápsulas hechas con la técnica de concentración 5X; CC12,5X: cápsulas hechas con la técnica de concentración 12,5X. R: cápsulas recubiertas con quitosano; NR: cápsulas no recubiertas con quitosano; log UFC/cap.: logaritmo formadores de colonia por cápsula; ND: no determinado.

<sup>a</sup>Tiempo en el que la viabilidad celular se mantiene por encima del nivel mínimo sugerido (NMS) en la cápsula.

Cápsulas CC12,5X con modificaciones: neutralización del cultivo antes de la separación del medio de crecimiento y adición de crioprotectores: Con12,5X: sin medio crioprotector; Gly12,5X: con glicerol; Per12,5X con permeado de suero.

## **4.2. Evaluación del efecto de microorganismos benéficos sobre la performance y microbiota intestinal de terneros jóvenes durante la crianza convencional de terneros jóvenes**

### **4.2.1. Recuentos microbiológicos**

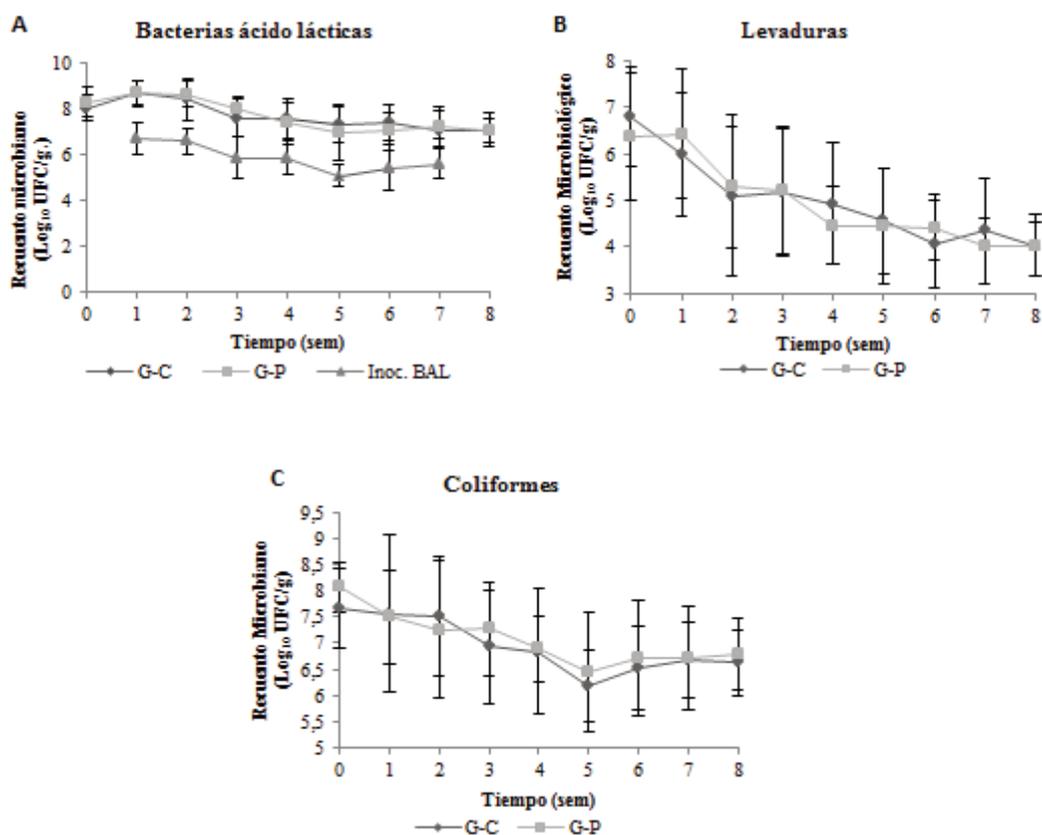
Los recuentos del inóculo de *Lactobacillus* encapsulados, las BAL, coliformes y levaduras pueden observarse en la Figura 16.

Los recuentos microbianos realizados en el día 0 del ensayo demostraron la ausencia de crecimiento en MRSrif de las muestras de materia fecal. Esto fue tomado como control negativo demostrando que el inóculo administrado, resistente a la rifampicina, no era indígena en los animales utilizados en el estudio.

Los recuentos de BAL (Figura 16. A) no se vieron afectados por la administración de las cepas de *Lactobacillus* ( $P > 0.05$ ). Se pudo observar que las BAL disminuyeron levemente a lo largo del ensayo.

La población de levaduras (Figura 16.B) no se vio influenciada por el tratamiento probiótico ( $P > 0.05$ ). Se pudo observar una disminución de la población de levaduras desde el inicio hasta la finalización del ensayo.

El tratamiento probiótico no redujo el recuento fecal de coliformes ( $P > 0.05$ ) entre el G-P y G-C (Figura 16.C). Se pudo observar una disminución hasta la semana 5, a partir de la cual los valores se mantuvieron constantes en ambos grupos.



**Figura 16.** Recuento microbiano de las poblaciones de BAL e inóculo bacteriano (A), Levaduras (B) y Coliformes (C) en el grupo probiótico (G-P) y grupo control (G-C).

Los recuentos del inóculo probiótico recuperado de la materia fecal de los terneros fueron variables a lo largo de las 7 semanas de ensayo. La tasa de recuperación del inóculo probiótico en la primera semana de tratamiento fue de 3,91 % siendo el recuento de inóculo probiótico en la materia fecal de 6,68 log UFC/g en la primera semana de ensayo. En la segunda semana se obtuvo la mayor tasa de recuperación del inóculo probiótico, siendo de 4,50 % (6,57 log UFC/g). En la semana 5 se obtuvo la menor tasa de recuperación, 0,42 % (5,08 log UFC/g), habiendo una disminución de 1,50 log UFC/g con respecto a lo recuperado en la primer semana. En la última semana la tasa de recuperación fue de 1,61 % siendo el recuento final de 5,59 log UFC/g habiendo una diferencia de 1,1 log UFC/g con respecto a la semana 1 (Tabla 21).

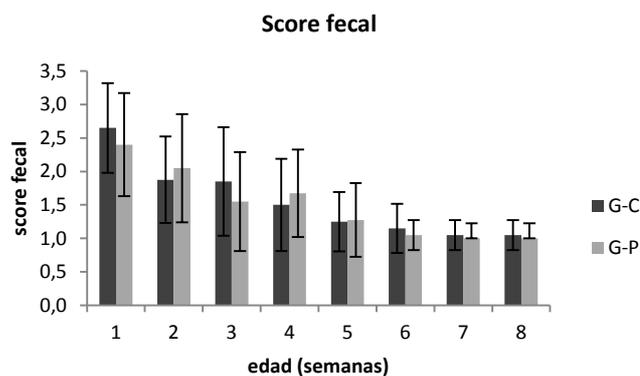
**Tabla 12.** Tasa de recuperación de inóculo probiótico administrado en macrocápsulas

Semana	Consumo diario de probiótico promedio (Log UFC/día)	Recuento del probiótico en materia fecal (Log UFC/g)	Tasa de recuperación de microorganismo probiótico (%).
1	11,01	6,68 ± 0,74a	3,91 ± 3,13
2	10,70	6,57 ± 0,55a	4,5 ± 4,27
3	10,70	5,85 ± 0,88b	1,01 ± 0,83
4	10,70	5,85 ± 0,74b	3,52 ± 2,75
5	10,70	5,07 ± 0,51c	0,42 ± 0,41
6	10,70	5,41 ± 0,97bc	3,58 ± 1,92
7	10,70	5,71 ± 0,66bc	1,61 ± 1,34

Las letras en minúscula indican si hubo diferencias significativas entre las diferentes semanas

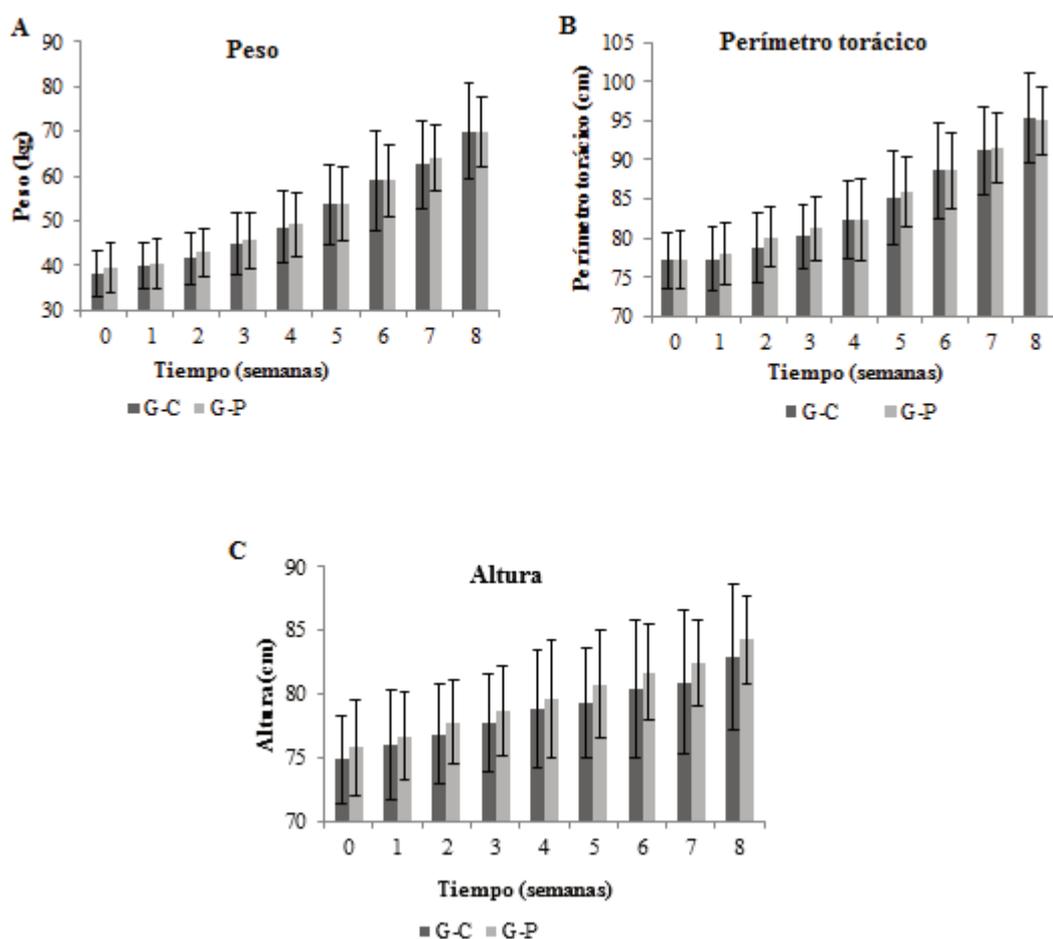
#### 4.2.2. Performance y estatus sanitario

La administración de microorganismos probióticos no modificó el score de materia fecal ( $P > 0,05$ ) entre los G-C y G-P. En la Figura 17 puede observarse que la puntuación del score fue mayor en la primera semana de ensayo disminuyendo hasta la semana 5, a partir de cuándo no se observaron variaciones de score de materia fecal. Los terneros sufrieron diarreas en las primeras tres semanas de ensayo siendo las dos primeras semanas las que presentaron mayor cantidad de días de diarrea por ternero.



**Figura 17.** Score de materia fecal de los terneros del grupo tratado con probióticos (G-P) y de los terneros del grupo no tratad con probióticos (G-C) durante las 8 semanas de ensayo.

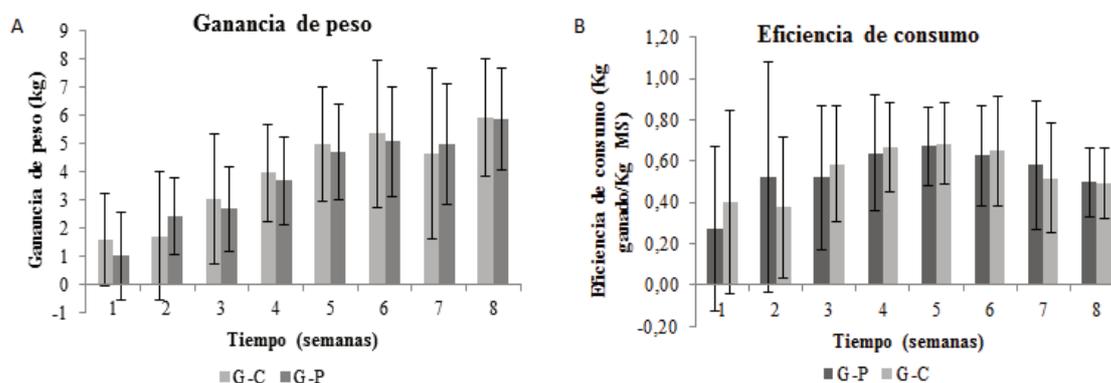
El aumento de peso de los terneros se fue incrementando paulatinamente a lo largo del ensayo. Esto estuvo directamente relacionado con el aumento sostenido del consumo de alimentos a medida que los animales iban creciendo. La administración de probióticos no tuvo influencia en el crecimiento ya que no se pudo observar diferencias entre el peso ( $P>0,05$ ), el perímetro torácico ( $P<0,05$ ) y la altura ( $P<0,05$ ) de los terneros de ambos grupos (figura 18). Los terneros del G-C ingresaron al experimento con un peso promedio de 38,34 Kg y los del G-P con un peso de 39,53 Kg. Al finalizar el ensayo el peso de los terneros del G-C y G-P fue de 69,98 kg y 69,84 kg respectivamente (Figura 18.A).



**Figura 18.** Peso (A), Perímetro tracio (B) y Altura (C) de los terneros tratado con probióticos (G-P) y no tratados con probióticos (G-C) durante las 8 semanas de ensayo.

No se observaron diferencias en la eficiencia alimentaria entre los terneros de ambos grupos ( $P>0,05$ ). Los valores de eficiencia alimentaria muestran que los animales del G-C fueron capaces de aumentar en 400 g su peso corporal por cada kilogramo de MS de alimento durante la primera semana de vida mientras que los del G-P

aumentaron 280 g por cada kg de materia seca (Figura 19.A). La mayor eficiencia de alimentación se observó en la semana 5 donde los terneros del G-C aumentaron 680 g su peso corporal por cada kg de MS consumido, mientras que los terneros del G-P aumentaron 670 g.



**Figura 19.** (A) Ganancia de peso y (B) Eficiencia de consumo de los terneros del G-C y G-P durante 8 semanas de ensayo.

La administración del probiótico no tuvo efectos sobre la ganancia semanal de peso ( $P > 0,05$ ). Se pudo observar que los animales del G-C aumentaron 1,58 kg su peso corporal en la primera semana y los animales del G-P 0,99 kg en la primera semana de vida. La ganancia de peso corporal fue aumentando progresivamente hasta finalizar el ensayo. En la última semana del experimento los animales del G-C aumentaron 5,91 Kg su peso corporal por semana mientras que el G-P aumento 5,87 kg.

#### 4.2.3. Análisis DGGE

La DGGE de los productos de PCR obtenidos con cebadores universales a partir de muestras fecales de terneros en tres edades diferentes (día 0, día 30 y día 51) dio lugar a perfiles diversos. Las muestras fecales mostraron un gran número de bandas que se distribuyeron a lo largo de todo el gradiente. El número de bandas discernibles por muestra aumentó del día 0 al día 51 (Figura 20, 21 y 22).

Se encontró una similitud del 45% de los perfiles bacterianos DGGE de los terneros en el día 0 de ensayo. No se pudo observar un agrupamiento que incluya a todos los animales del G-P o G-C lo que podría indicar una gran inestabilidad microbiana (Figura 20).



**Figura 20.** Dendrograma de los perfiles DGGE de la comunidad bacteriana de la materia fecal de los terneros tratado con probióticos (P) y no tratados con probióticos (C) en el día 0 de ensayo.

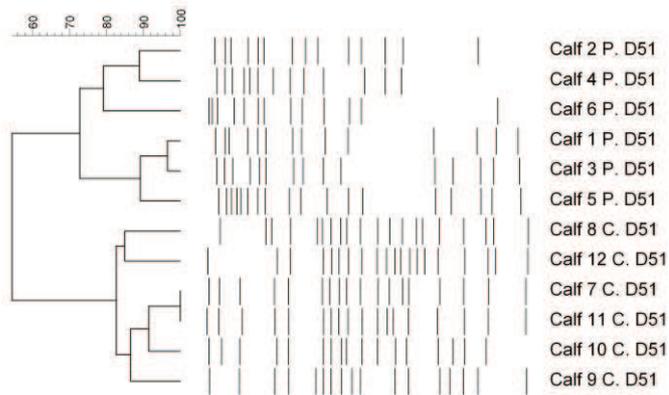
En el día 30 de ensayo se encontró una similitud del 53 % de los perfiles bacterianos de la microbiota fecal. Puede observarse que los terneros del G-P se encuentran agrupados con una similitud del 74 % en sus perfiles microbianos mientras que el grupo control no presenta un claro agrupamiento. Esto podría indicar que los animales pertenecientes al G-P presentan una mayor estabilidad microbiana pudiendo estar influenciada por el tratamiento (Figura 21).



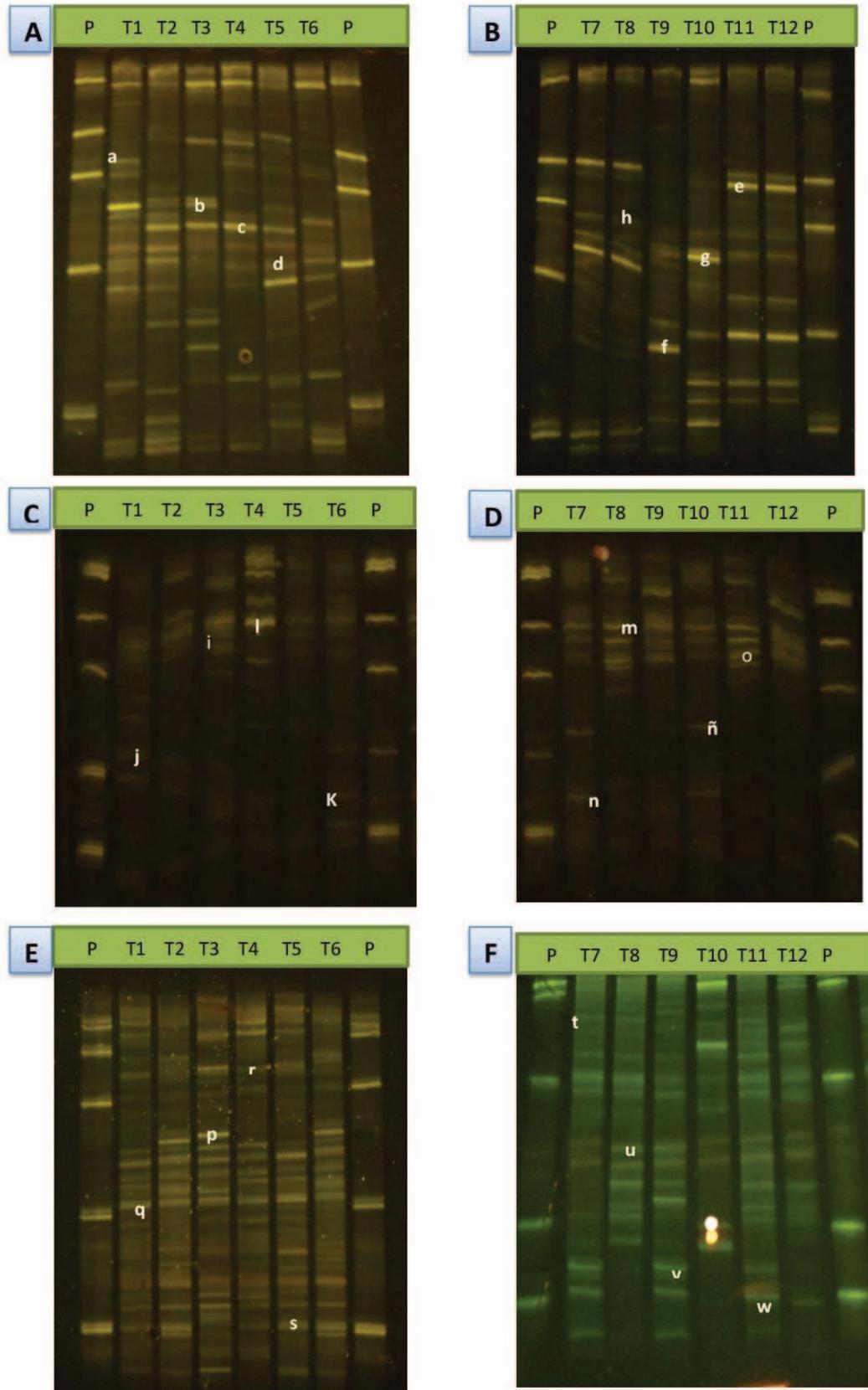
**Figura 21.** Dendrograma de los perfiles DGGE de la comunidad bacteriana de la materia fecal de los terneros tratado con probióticos (P) y no tratados con probióticos (C) en el día 30 de ensayo (D30).

En el día 51 se observa dos grandes grupos en los perfiles bacterianos del DGGE. Un grupo conformado por los terneros del G-C y el otro por los terneros del G-P con

una similitud del 65 % entre ambos grupos. Por otro lado, los terneros del GC tuvieron una similitud del 83% entre ellos mientras que los del G-P tuvieron una similitud del 77 %. (Figura 22). Esto indicaría una diferencia entre los perfiles bacterianos de la microbiota intestinal entre ambos grupos probablemente inducidos por la administración del inóculo probiótico.



**Figura 22.** Dendrograma de los perfiles DGGE de la comunidad bacteriana de la materia fecal de los terneros tratado con probióticos (P) y no tratados con probióticos (C) en el día 51 de ensayo (D51).



**Figura 23.** DGGE de ADN extraído de la materia fecal de los terneros tratado con probióticos (G-P) y no tratados con probióticos (G-C) en los días 0, 30 y 51. (A) día 0

G-C, (B) día 0 G-P, (C) día 30 G-C, (D) día 30 G-P día, (E) día 51 G-C y (F) día 51 G-P. (P) patrón con bacterias de referencia (*L. plantarum* DSPV 354T, *L. salivarius* DSPV 001, *L. casei* DSPV 318T, *C. jejuni* C173 y *S. enteritidis* 421E).

Los productos de ADN fueron secuenciados para luego asignarles especies o géneros utilizando el programa BLAST en la base de datos GenBank. Un total de 24 bandas se analizaron a partir de las muestras de materia fecal de los terneros, y las secuencias tenían 85-100% de similitud con el ARN 16s de la base de datos de secuencia de Gamban (Tabla 13). Todas las muestras de los terneros de la misma edad, de cada grupo, presentaron bandas en igual posición (Figura 20). La intensidad de las mismas fue variable, determinando esto que la abundancia de los microorganismos era diferente.

**Tabla 13.** Porcentaje (%) de identidad de secuencias parciales de 16S ADNr con secuencias presentes en la base de datos del NCBI

Grupo	Banda	Género o especie relacionado	Identidad (%)	NCBI Número de acceso
G-CD0	a	Bacteria no cultivable, <i>Firmicutes</i> no cultivable, Acetivibrio sp. No cultivable	95	KP801868.1/GU959157.1/ KP109424.1
G-CD0	b	Bacteria no cultivable, <i>Lachnospiraceae Ruminococcus</i> <i>sp</i>	100	JQ190756.1/ KP107330.1/ JX136939.1
G-CD0	c	Bacteria no cultivable, <i>Coprococcus sp.</i>	99	KC802906.1/ LC191811.1
G-CD0	d	<i>Lactonifactor longoviformis</i>	95	LT223592.1
G-PD0	e	Bacteria no cultivable, <i>butyricoccus</i> no cultivable	98	KU505789.1/KP109285.1
G-PD0	f	Bacteria no cultivable, <i>Suterellas sp.</i> No cultivable	97/93	KU505281.1/FJ440038.1
G-PD0	g	No cultivable <i>Eubacterium</i> , <i>Oscillibacter</i> no cultivable	91	KP109191.1/ KP109006.1
G-PD0	h	Bacteria no cultivable, <i>lachnospiraceae bacterium no</i>	100	KP103132.1/KP102868.1

cultivable				
GCD30	i	Bacteria no cultivable, <i>Firmicutes bacterium</i> no cultivable, <i>Clostridiales</i> no cultivable	99	KJ422712.1/EF071188.1/ JQ083415.1
G-CD30	j	Bacteria no cultivable, No cultivable <i>Rominococcus</i>	99	KT961150.1/KP107194.1
G-CD30	k	Bacteria no cultivable, <i>Fusobacterium Necrogenes</i>	89	JQ207322.1/LT574677.1
G-CD30	l	Bacteria no cultivable, Bacteroidetes No cultivable, Bacteroidales No cultivable.	98	KU506412.1/GU955529.1/ HQ201835.1
G-PD30	m	Bacteria no cultivable, <i>Lactobacillus no cultivable</i> , <i>Lactobacillus helveticus no</i> <i>cultivable</i>	87	JF798191.1/ AB822956.1/KU555480.1
G-PD30	n	<i>Uncultured Oscillibacter sp.</i> Bacteria no cultivable,	96	KP107962.1/ GU608402.1
G-PD30	ñ	Bacteria no cultivable, <i>Lachnospiraceae</i> no cultivable	99	KF231639.1/ KT963776.1
GPD30	o	Bacteria no cultivable, <i>Clostridium sp.</i> No cultivable	93	EF604635.1/ KP102626.1
G-CD51	p	<i>Flexibacteraceae bacterium</i>	90	EU057829.1
G-CD51	q	Bacteria no cultivable, <i>Vallitalea sp.</i> no cultivable, <i>Clostridium sp.</i>	85	KM079051.1/ KF758641.1/ KJ722502.1
G-CD51	r	Bacteria no cultivable, <i>Ruminococcaceae</i> no cultivable	86	HQ916626.1/ KP109294.1
G-CD51	s	<i>Uncultured Ruminococcaceae</i>	91	LT625338.1
G-PD51	t	<i>Lactobacillus</i> No cultivable, <i>L</i> <i>jahnsonii</i>	90	KP102068.1/ CP016400.1
G-PD51	u	<i>Lactobacillus reuteri</i> no cultivable	91	KR264990.1

G-PD51	v	Bacteria no cultivable, <i>Escherichia</i> sp.	99	KF095693.1/DQ856921.1
G-PD51	w	Bacteria no cultivable/ <i>Clostridium</i> no cultivable/ <i>Ruminococcus</i> no cultivable	90	KT599224.1/KP109295.1/ KP109209.1

---

Las comunidades bacterianas de las muestras de materia fecal de los terneros presentaron diferencias significativas. La comparación de fragmentos de ADN, del día 0 del ensayo, con secuencias de GenBank evidenció la presencia de cepas pertenecientes al género, *Acetivibrio* sp., *Ruminococcus*, *Coprococcus* y *Lactonifactor* en el GC. Todos estos géneros pertenecen al orden Clostridiales. En cuanto al GP se observó cepas pertenecientes a los géneros *Butyricoccus*, *Oscillospiraceae* y *Lachnospiraceae*, pertenecientes al orden clostridiales y el género *Sutterellaceae* perteneciente al orden Burkholderiales (Tabla 22). Al día 30, la microbiota intestinal del GC conto con los géneros *Ruminococcus* y un microorganismo no cultivable del orden *Clostridiales*, *Fusobacterium* perteneciente al género Fusobacteriales y un microorganismo no cultivable perteneciente al orden *Bacteroidales*. En el GP se encontraron el género *Lactobacillus* perteneciente al orden Lactobacillales, y los generos *Lachnospiraceae*, *Clostridium* y *Oscillibacter* pertenecientes al orden *Clostridiales* (Tabla 22). En el día 51 de ensayo el perfil microbiano de los terneros del GP fue de *Lactobacillus*, *Escherichia* y *Clostridium* mientras que en el GC predomino el orden clostridiales con los géneros *Clostridium*, *Ruminococcus* y el orden *Flavobacteriales* (Tabla 22). Comparativamente, se observó una mayor población de *Lactobacillus* en las muestras de materia fecal de los terneros en el día 51 de ensayo del GP comparado los otros muestreos del GP y el GC.

Fue posible encontrar bandas en la misma posición que las cepas de referencia de *Lactobacillus* en muestras de terneros de todas las edades. Sin embargo la secuenciación de dichas bandas no coincidieron con *L. casei* y *L. plantarum* (Tabla 22).

### **4.3. Generación del modelo experimental de infección por *Campylobacter jejuni* en terneros jóvenes.**

#### **4.3.1. Inhibición de *Campylobacter jejuni* in vitro**

El ELCsn de las cepas *L. casei* DSPV 318T y *L. plantarum* DSPV 354T produjo inhibición sobre *C. jejuni* NCTC 11168, mientras que el ELCn no produjo inhibición sobre esta cepa (figura 23). En cuanto a la cepa de *C. jejuni* ATCC 33560, los ELCsn y ELCn de las cepas *L. casei* DSPV 318T y *L. plantarum* DSPV 354T no fueron capaces de inhibir su crecimiento.



**Figura 24.** Áreas de inhibición producida por los ELCsn y ELCn de *L. casei* DSPV 318T y *L. plantarum* DSPV 354T sobre *C. jejuni* NCTC 11168.

#### **4.3.2. Recuento microbiano**

Al día 0 del ensayo fue posible determinar que los terneros estaban libres de *Campylobacter* termotolerantes. El día 2 post infección, correspondiente al día 7 del experimento, se recuperó *C. jejuni* NCTC 11168 en la materia fecal de los terneros del G-C6 y G-C10. En este día se recuperó el mayor valor del patógeno, disminuyendo hasta el día 6 post infección en ambos grupos. A partir del día 8 pos infección la recuperación del patógeno fue inconstante entre los terneros de los diferentes grupos. En el G-C6 en ambos terneros no se recuperó el patógeno en diferentes momentos del muestreo. Sin embargo en el G-C10 sólo en uno de los ternero y en dos momentos del ensayo no se recuperó *C. jejuni* NCTC 11168. No se observó diferencias entre ambos grupos a lo largo del experimento ( $p > 0,05$ ) (Tabla 14).

**Tabla 14.** Detección de *Campylobacter jejuni* en materia fecal de terneros infectados con *C. jejuni* NCTC 1168 con una dosis única de 10 Log UFC (G-C10), terneros infectados con *C. jejuni* NCTC 1168 con una dosis única de 6 Log UFC (G-C6) y terneros no infectados (G-C).

Día	T1-GC	T2-GC	T3 G-C6	T4 G-C6	T5 GC-10	T6 G-C10
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>5*</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	ND	ND	5,49	5,49	6,83	7,12
9	ND	ND	4,93	5,48	6,66	6,48
11	ND	ND	3,89	3,48	4,99	4,48
13	ND	ND	<3**	<3**	5,35	<3**
15	ND	ND	<3**	<3**	4,92	<3**
17	ND	ND	<3**	<3**	5,18	5,35
19	ND	ND	<3**	<3**	5,43	4,18
21	ND	ND	4,50	<3**	4,97	5,27
23	ND	ND	4,88	4,58	4,93	5,16
25	ND	ND	<3**	4,59	4,93	5,29
27	ND	ND	<3**	4,99	5,20	5,36
29	ND	ND	<3**	4,66	5,21	4,94
31	ND	ND	<3**	4,94	4,59	5,17
33	ND	ND	<3**	5,27	5,43	4,80

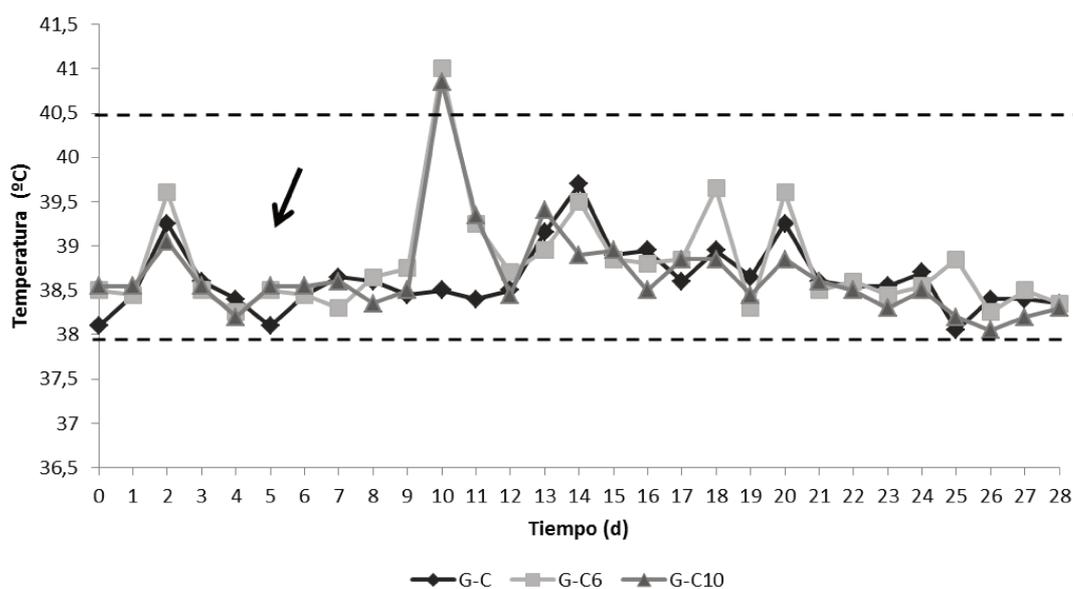
\*Día que se realizó la infección con *C. jejuni* NCTC 11168.

\*\*<3 Valor mínimo que se puede recuperar por medio de ésta técnica.

ND no se detectó.

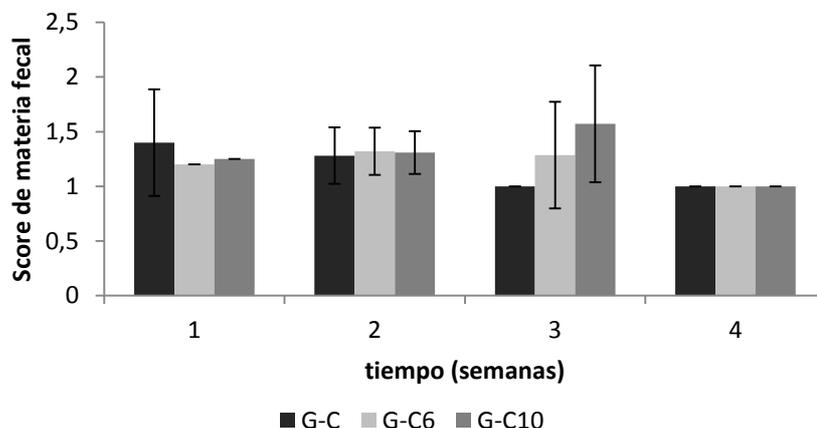
### 4.3.3. Sintomatología Clínica

La temperatura corporal durante el transcurso del experimento, mostró valores normales durante los primeros 9 días del experimento en el G-C6 y G-C10 (5 días previos a la infección y 4 días pos infección) y durante todo el ensayo para el G-C. En el día 5 pos infección (día 9 de ensayo) se observó un aumento de la temperatura en el G-C6 (temperatura promedio 41 °C) y G-C10 (temperatura promedio 40,85 °C) que podría evidenciar la infección. Posterior a este pico de temperatura se registraron valores normales hasta finalizar el ensayo (Figura 25).



**Figura 25.** Promedio diario de la temperatura rectal de los terneros infectados con *C. jejuni* NCTC 1168 con una dosis única de 10 Log UFC (G-C10), terneros infectados con *C. jejuni* NCTC 1168 con una dosis única de 6 Log UFC (G-C6) y terneros no infectados (G-C). La flecha indica el día en el cual se realizó la inoculación con el patógeno. Las líneas punteadas indican los límites inferior y superior de los valores normales de temperatura.

La administración de *C. jejuni* a los terneros no provocó diarreas en ninguno de los animales que formaron parte del experimento y por lo tanto no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos durante el ensayo (Figura 26).



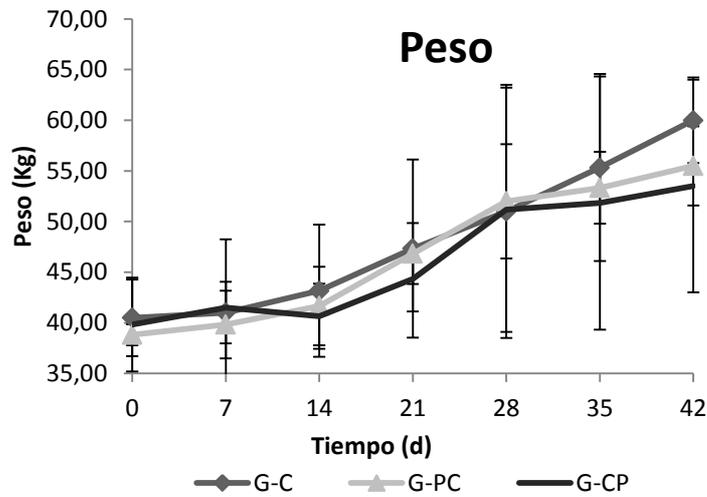
**Figura 26.** Score de materia fecal de los terneros infectados con *C. jejuni* NCTC 1168 con una dosis única de 10 Log UFC (G-C10), terneros infectados con *C. jejuni* NCTC 1168 con una dosis única de 6 Log UFC (G-C6) y terneros no infectados (G-C).

#### 4.4. Evaluación del efecto de microorganismos benéficos sobre terneros jóvenes infectados con *Campylobacter jejuni*

##### 4.4.1. Peso de los terneros

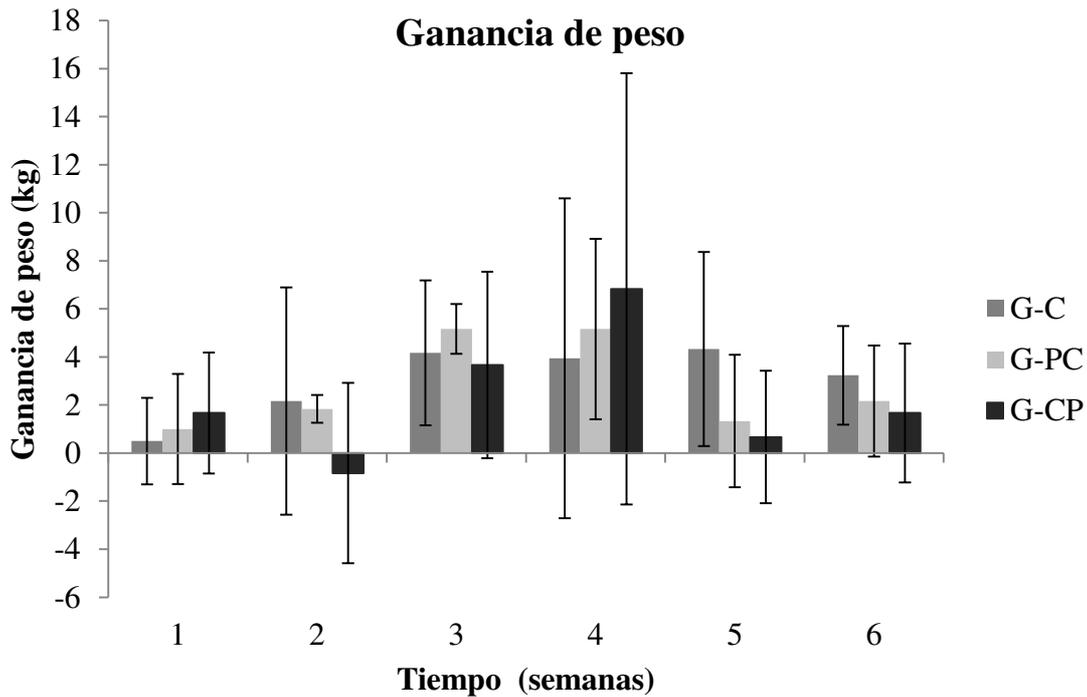
El peso de los terneros se fue incrementando paulatinamente a lo largo del ensayo. Esto estuvo directamente relacionado con el aumento sostenido del consumo de alimentos a medida que los animales iban creciendo. El CTA pasó de 8,80 kg a 30,87 kg en el G-PC, de 8,80 kg a 31,55 kg en el G-CP y de 8,80 kg a 29,67 kg entre la primera y la sexta semana del ensayo.

La administración de probióticos no tuvo influencia en el peso de los terneros durante el ensayo (Figura 27). No se hallaron diferencias entre los 3 grupos durante el transcurso del ensayo ( $p < 0,05$ ). Los terneros del G-CP, G-PC y G-C ingresaron al experimento con un peso promedio de 39,8 kg, 38,8 Kg y 40,5 kg respectivamente. Al finalizar el ensayo los terneros del G-CP, G-PC y G-C tuvieron un peso promedio 53,5 kg, 55,5 kg y 60 kg respectivamente.

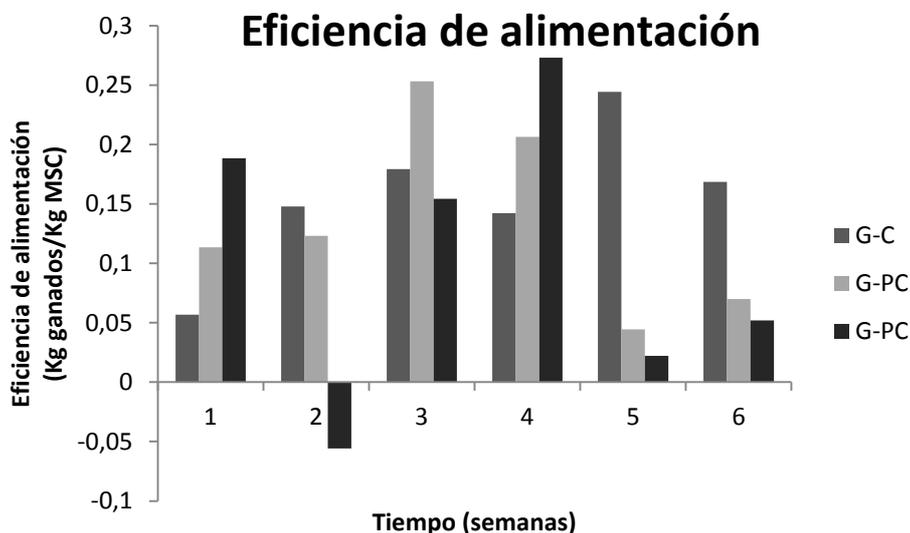


**Figura 27.** Peso de los terneros del grupo suplementado con BAL e infectado con *Campylobacter* (G-P), grupo infectado con *Campylobacter* y no suplementado con probióticos (G-C10) y los terneros del grupo no suplementado con probiótico y no infectado con *Campylobacter* (G-C).

La ganancia de peso no se vio influenciada por la administración de probióticos o por la presencia del patógeno. Posterior a la inoculación del patógeno se observó una leve pérdida de peso en el G-CP (0.83 kg). En las últimas dos semanas de estudio se observó una menor ganancia de peso en el G-PC y el G-CP en relación al G-C (Figura 28).



**Figura 28.** Ganancia de peso de los terneros del grupo suplementado con BAL e infectado con *Campylobacter* (G-PC), grupo infectado con *Campylobacter jejuni* y no suplementado con probióticos (G-CP) y los terneros del grupo no suplementado con probiótico y no infectado con *Campylobacter jejuni* (G-C).

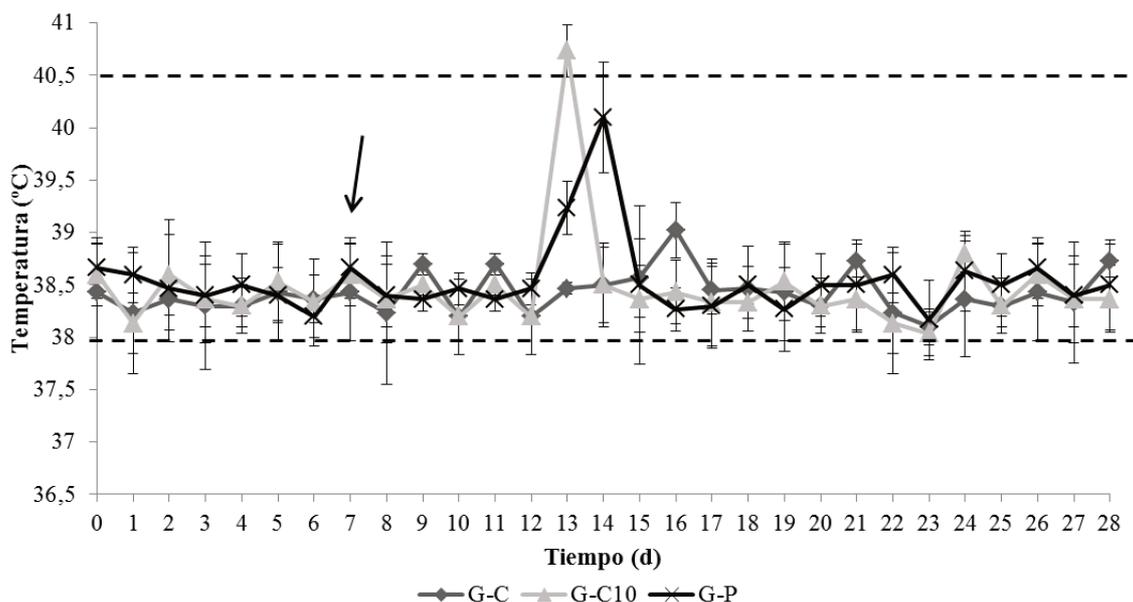


**Figura 29.** Eficiencia de alimentación de los terneros del grupo suplementado con BAL e infectado con *Campylobacter* (G-PC), grupo infectado con *Campylobacter jejuni* y no suplementado con probióticos (G-CP) y los terneros del grupo no suplementado con probiótico y no infectado con *Campylobacter jejuni* (G-C).

Los valores de eficiencia alimentaria muestran que los animales del G-C fueron capaces de aumentar en 56 g su peso corporal por cada kilogramo de MS de alimento durante la primera semana de vida, los animales del G-PC aumentaron 110 g por cada kg de materia seca y los terneros del G-CP aumentaron 180 g (Figura 29). En la segunda semana se pudo observar que los terneros del G-CP tuvieron una pérdida de 56 g por cada kg de MS consumido, mientras que el G-C y G-PC tuvieron un aumento de 147 y 123 g respectivamente.

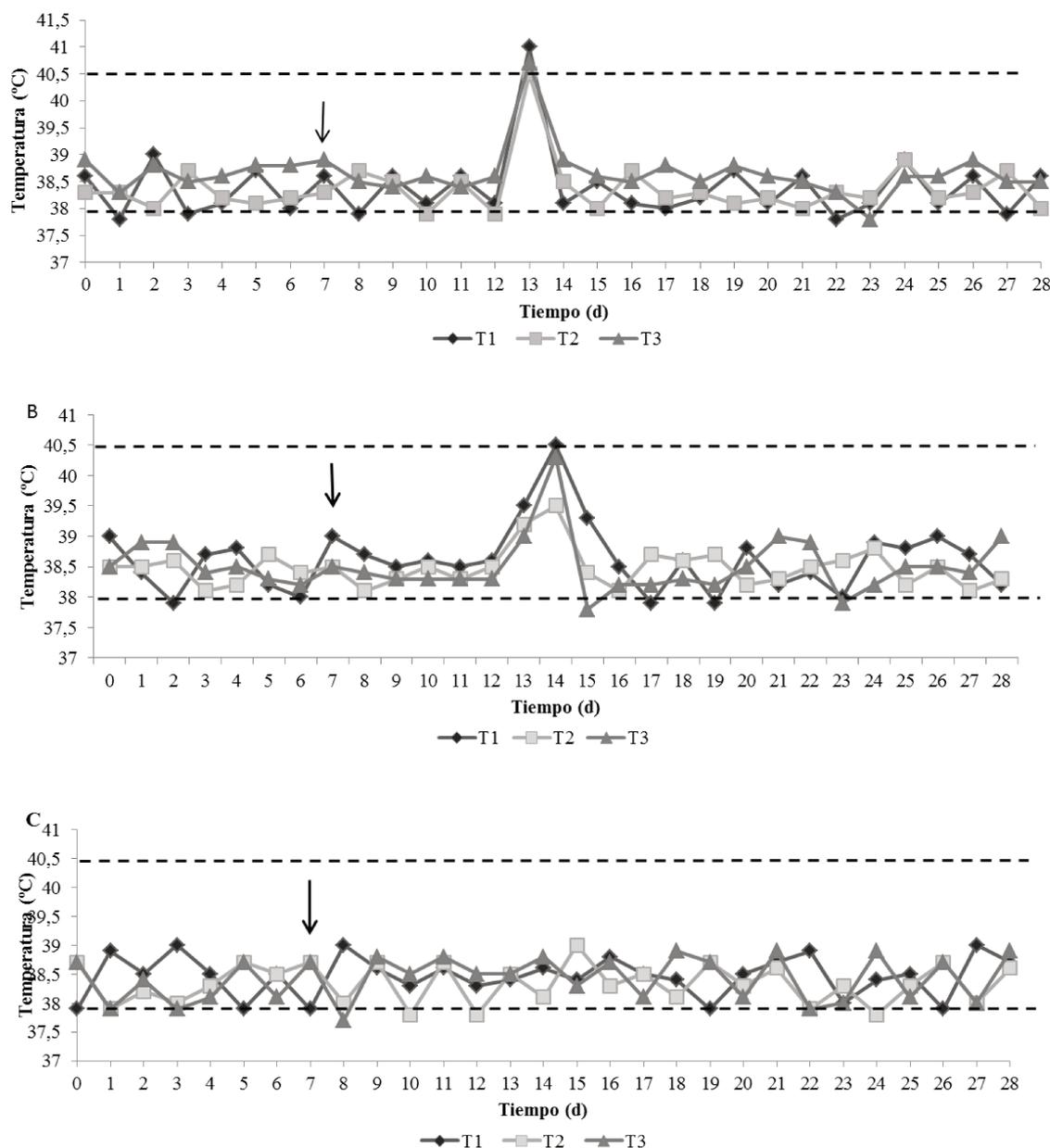
#### 4.4.2. Efecto del tratamiento sobre la temperatura de los animales antes y durante la infección con el patógeno

En la figura 30 se muestran los valores promedios de la temperatura rectal de los diferentes grupos estudiados. Previo a la inoculación con el patógeno y hasta el día 5 pos infección (correspondiente al día 12 de estudio) se observaron valores normales de temperatura para todos los animales de todos los grupos estudiados.



**Figura 30.** Promedio de temperatura de los terneros del grupo suplementado con BAL e infectado con *Campylobacter* (G-PC), grupo infectado con *Campylobacter jejuni* y no suplementado con probióticos (G-CP) y los terneros del grupo no suplementado con probiótico y no infectado con *Campylobacter jejuni* (G-C). La flecha indica el día en el cual se realizó la inoculación con el patógeno. Las líneas punteadas indican los límites inferior y superior de los valores normales de temperatura.

En el día 6 pos infección se observó un aumento de temperatura en el G-CP llegando a 40,7 °C. Todos los terneros del grupo presentaron valores iguales o superiores a 40,5 °C (límite superior de referencia de temperatura normal) (figura 31 A). En el mismo día se observa un aumento gradual de temperatura en el G-PC llegando a su máximo en el día 7 pos infección. Sin embargo el promedio de temperatura no superó los 40,5 °C, siendo un solo animal el que supero este valor (figura 31 B). En el grupo control la temperatura se mantuvo dentro de los valores considerados de referencia durante todo el experimento (figura 31 C).

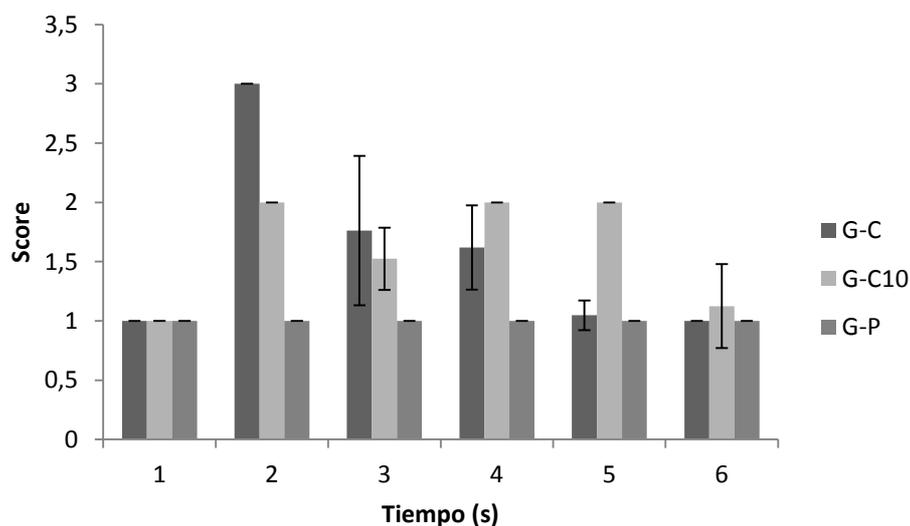


**Figura 31.** Temperatura de los terneros del grupo suplementado con BAL e infectado con *Campylobacter* (G-PC) (A), grupo infectado con *Campylobacter jejuni* y no suplementado con probióticos (G-CP) (B) y los terneros del grupo no suplementado con probiótico y no infectado con *Campylobacter jejuni* (G-C) (C). Las líneas punteadas indican los límites inferior y superior de los valores normales de temperatura.

#### 4.4.3. Efecto del tratamiento sobre el score de materia fecal

Durante la semana previa a la infección todos los animales presentaron score de materia fecal normal. Posterior a la inoculación los terneros del G-C y G-CP

manifestaron un aumento en la consistencia fecal hasta la semana 4 y 5 respectivamente comparado el G-PC. Se encontró que las consistencias fecales de los terneros del grupo control y el infectado con *Campylobacter* fue superior a la de los terneros que se le administró las cepas probióticas (figura 32), sin embargo no se observaron diferencias significativas entre los grupos ( $P > 0,05$ ).



**Figura 32.** Score de materia fecal de los terneros del grupo suplementado con BAL e infectado con *Campylobacter* (G-PC), grupo infectado con *Campylobacter jejuni* y no suplementado con probióticos (G-CP) y los terneros del grupo no suplementado con probiótico y no infectado con *Campylobacter jejuni* (G-C).

#### 4.4.4. Efecto del tratamiento sobre las poblaciones microbianas fecales de *E. coli*, levaduras y *Lactobacillus* en terneros jóvenes antes de la infección con *Campylobacter jejuni* NCTC 11168

Los recuentos en la materia fecal de las diferentes poblaciones microbianas estudiadas pueden observarse en la tabla 15.

**Tabla 15.** Microbiota en materia fecal de terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de  $10^{11}$ UFC/ternero e infectados con *C.jejuni* NCTC 11168 (G-PC), de terneros no suplementados pero infectados con *C. jejuni* NCTC 11168 (G-CP) y de terneros no suplementados y no infectados con *C. jejuni* NCTC 11168 (G-C)

	Día	E. coli	levaduras	BAL	Inoculo
<b>Grupo Control (G-C)</b>					
	0	7,84±0,15	7,07±0,06	9,36±0,56	ND
	7	7,60±0,50	6,02±0,40	8,96±0,31	ND
	14	6,51±1,32	5,77±0,74	8,77±0,90	ND
	21	8,08±0,03	7,03±0,45	8,48±0,92	ND
	28	7,86±0,52	7,13±0,71	7,04±0,61	ND
	35	6,35±0,50	5,65±0,79	7,39±1,78	ND
	42	6,50±0,03	5,09±2,48	6,76±1,63	ND
<b>Grupo probiótico (G-PC)</b>					
	0	7,59±0,94	6,65±0,93	9,58±0,79	ND
	7	7,71±1,30	7,28±0,97	8,48±0,53	6,91±0,16
	14	7,53±0,81	6,14±2,07	7,96±0,88	6,79±0,51
	21	6,91±0,15	5,63±0,33	7,65±0,71	4,81±0,54
	28	6,04±0,39	3,74±0,28	6,68±0,18	6,50±0,50
	35	5,33±0,73	4,69±1,40	7,01±0,22	6,39±0,63
	42	5,83±0,08	3,60±0,62	7,57±0,40	6,48±0,01
<b>Grupo <i>Campylobacter</i> (G-CP)</b>					
	0	7,40±0,93	6,46±0,23	9,59±0,44	ND
	7	8,13±0,18	5,76±0,69	8,79±0,52	ND
	14	7,58±0,12	6,60±0,90	8,17±0,31	ND
	21	7,57±1,29	6,64±0,92	7,88±0,88	ND
	28	6,91±1,46	6,09±1,56	7,81±0,76	ND
	35	6,43±0,20	5,39±0,83	7,24±0,31	ND
	42	5,95±1,43	4,97±1,32	6,92±0,40	ND

Los recuentos de bacterias ácido lácticas no se vieron afectadas por la administración del microorganismo patógeno o por el inóculo probiótico durante el transcurso del ensayo ( $P>0,05$ ). Las BAL mostraron los recuentos más altos en las primeras semanas de vida para ir disminuyendo hasta finalizar el ensayo.

La administración de *C. jejuni* y de los *Lactobacillus* no afectó la población de *E. coli* en los diferentes grupos durante el ensayo ( $P>0,05$ ). Sin embargo en el día 35 de estudio pudo observarse una tendencia del G-CP a tener una mayor población de *E. coli*.

La población de levaduras se vio afectada por la administración de los probióticos, observándose una menor población de las mismas en el día 28 de ensayo en

el G-PC en relación a los otros grupos ( $P < 0,05$ ). Sin embargo en el resto de los días muestreados no se observó que los probióticos modificaran la población de levaduras ( $P > 0,05$ ).

#### **4.4.5. Detección de *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 en materia fecal**

Los terneros resultaron ser libres de *Campylobacter* antes del ensayo. El día 2 pos infección (correspondiente con el día 9 de experimento) se detectó *Campylobacter jejuni* en materia fecal de los terneros, de los G-PC y G-CP. La presencia del patógeno fue significativamente menor en el G-PC en comparación al G-CP en el día 2, 4 y 6 pos infección ( $p < 0,05$ ). Posterior al día 6 pos infección (correspondiente al día 15 de experimento) y hasta finalizar el ensayo no se encontraron diferencias entre ambos grupos ( $P > 0,05$ ). Se recuperó *Campylobacter jejuni* en todos los terneros del G-CP durante todo el experimento, sin embargo la recuperación en el G-PC fue inconstante (Tabla 16).

**Tabla 16.** Detección de *Campylobacter jejuni* en materia fecal de terneros suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de  $10^{11}$  UFC/ternero e infectados con *C.jejuni* NCTC 11168 (G-PC), de terneros no suplementados pero infectados con *C. jejuni* NCTC 11168 (G-CP) y de terneros no suplementados y no infectados con *C. jejuni* NCTC 11168 (G-C).

Día	Control	Probiótico	<i>Campylobacter</i>
0	ND	ND	ND
7	ND	ND*	ND*
9	ND	5,96±0,49 <sup>a</sup>	7,11±0,22 <sup>b</sup>
11	ND	5,96±0,49 <sup>a</sup>	7,17±0,31 <sup>b</sup>
13	ND	4,96±0,49 <sup>a</sup>	6,50±0,43 <sup>b</sup>
15	ND	5,30±1,04 <sup>a</sup>	6,17±0,70 <sup>a</sup>
17	ND	3,79±3,28 <sup>a</sup>	5,97±0,85 <sup>a</sup>
19	ND	3,08±2,67 <sup>a</sup>	6,53±1,15 <sup>a</sup>
21	ND	3,41±2,99 <sup>a</sup>	6,54±1,11 <sup>a</sup>
23	ND	5,31±0,79 <sup>a</sup>	5,78±0,42 <sup>a</sup>
25	ND	5,69±0,62 <sup>a</sup>	6,23±0,46 <sup>a</sup>
27	ND	3,64±0,47 <sup>a</sup>	5,55±0,47 <sup>a</sup>
29	ND	5,35±0,82 <sup>a</sup>	5,61±0,83 <sup>a</sup>
31	ND	5,86±0,12 <sup>a</sup>	6,17±0,17 <sup>a</sup>
33	ND	5,37±0,41 <sup>a</sup>	5,89±0,11 <sup>a</sup>
35	ND	3,42±1,55 <sup>a</sup>	3,75±1,70 <sup>a</sup>
37	ND	3,39±1,20 <sup>a</sup>	4,71±1,76 <sup>a</sup>
39	ND	3,75±0,96 <sup>a</sup>	4,35±1,02 <sup>a</sup>
41	ND	4,01±1,36 <sup>a</sup>	4,88±0,86 <sup>a</sup>

ND no detectado.

<sup>a y b</sup> Diferencia significativas entre ambos grupos en un mismos día.

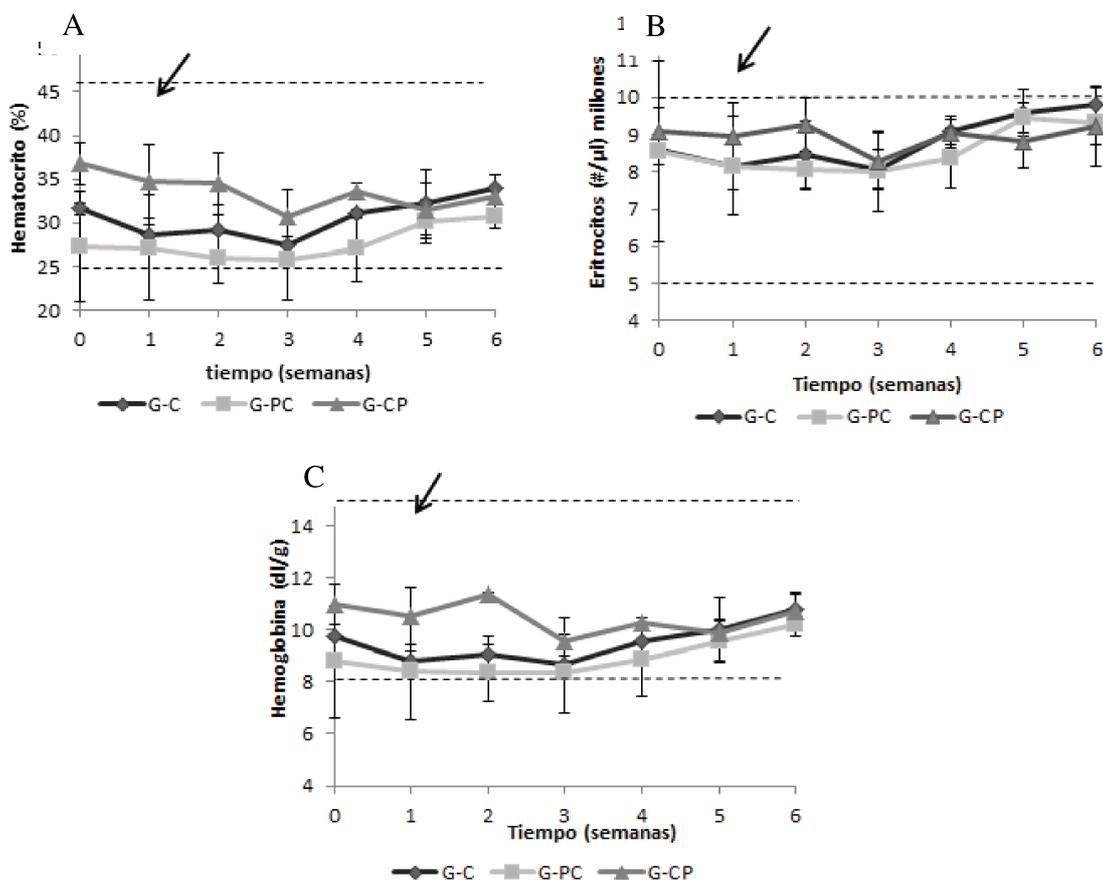
\*Día de inoculación con el microorganismo patógeno.

#### 4.4.6. Parámetros sanguíneos en terneros jóvenes infectados con *Campylobacter jejuni* NCTC 11168.

##### 4.4.6.1. Serie eritrocítica

El hematocrito, el número de los eritrocitos y la concentración de hemoglobina de los terneros estuvieron dentro de los valores normales (Figura 32 A, B y C). Los animales mostraron valores de hematocrito entre 21,1 % y 39,3 %, el número de eritrocitos entre 7,4 millones por microlitro y 11,2 millones por microlitro y la concentración de hemoglobina entre 6,8 g/dl y 11,6 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 33.** Parámetros sanguíneos (serie eritrocítica) en terneros infectados con *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 (G-CP), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de  $10^{11}$  UFC e infectados con *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 (G-PC) y no suplementados (G-C). 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. La flecha indica el día de la infección con el patógeno. A) Hematocrito. B) Eritrocitos. C) Hemoglobina.

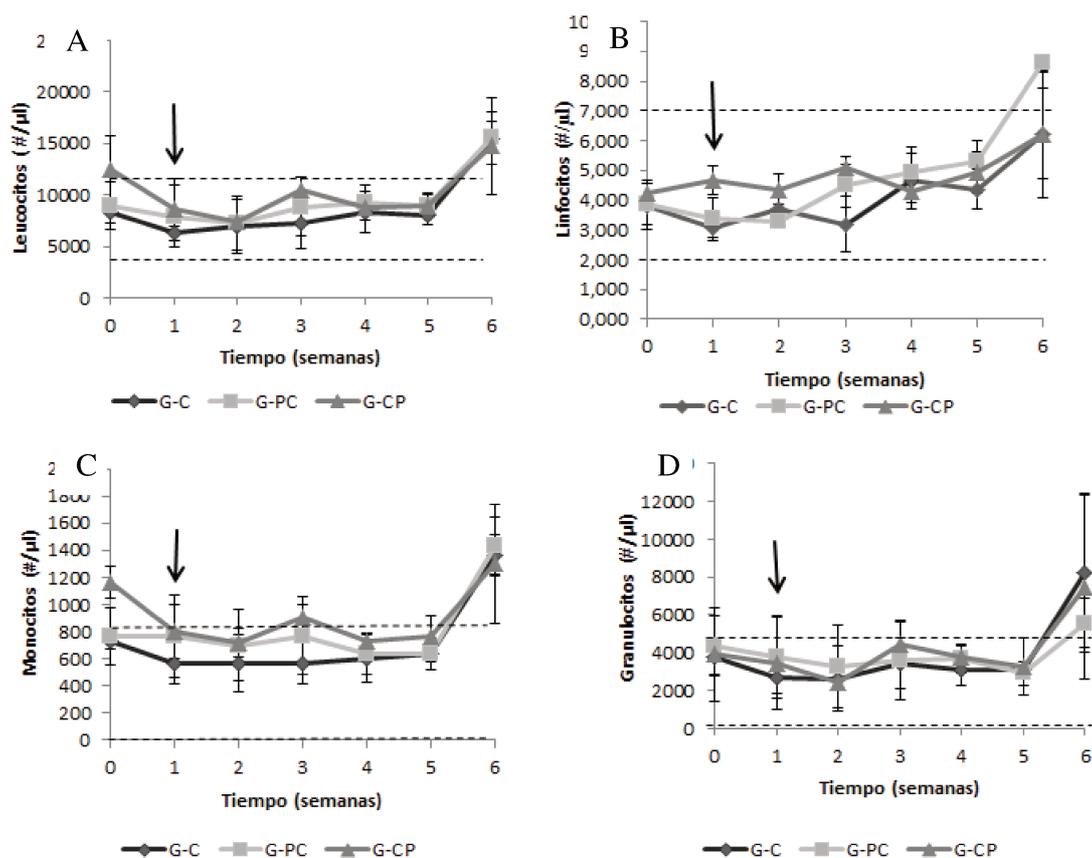
#### 4.4.6.2. Serie leucocítica

El número total de leucocitos de los terneros estuvo dentro de los valores normales (Figura 34 A) mostrando niveles entre 4000 cel/ $\mu$ l y 12000 cel/ $\mu$ l.

Los linfocitos permanecieron dentro de los niveles normales hasta la quinta semana de muestreo. En la última semana de ensayo se observaron valores por encima del límite superior normal en todos los animales. (Figura 34 B). Los monocitos se encontraron dentro de los valores normales posteriores a la infección, excepto en la

última semana donde todos los animales tuvieron valores por encima del límite superior normal (Figura 34 C). La serie de granulocitos mostraron valores normales durante todo el ensayo con excepción de la última semana donde todos los grupos tuvieron valores por encima del límite normal superior (Figura 34 D).

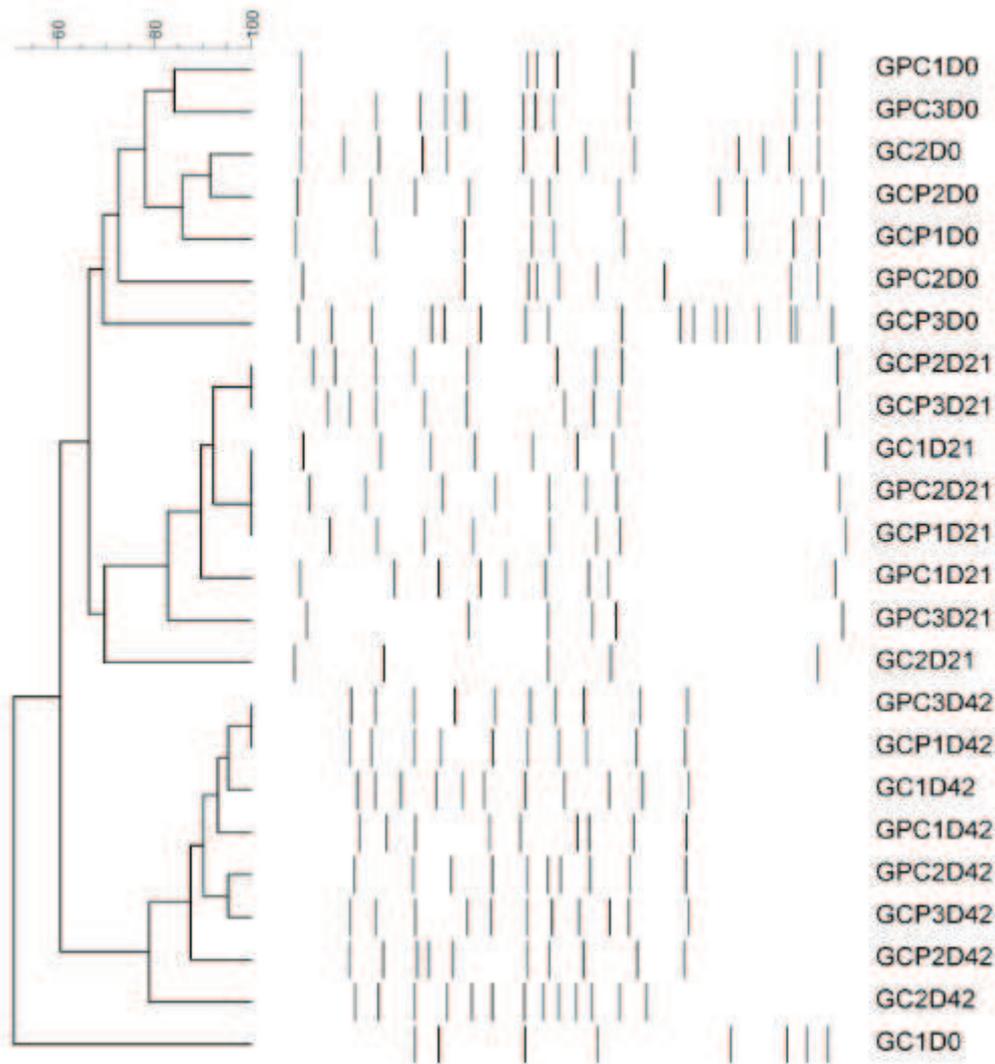
Aunque la infección con el patógeno modificó algunos de los parámetros sanguíneos de la serie leucocítica no se encontraron diferencias significativas ( $P>0,05$ ) entre grupos para ninguna de las variables estudiadas.



**Figura 34.** Parámetros sanguíneos (serie leucocítica) en terneros infectados con *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 (G-CP), suplementados con un inóculo de bacterias ácido lácticas a una dosis diaria de  $10^{11}$  UFC e infectados con *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 (G-PC) y no suplementados (G-C). 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. La flecha indica el día de la infección con el patógeno. A) Leucocitos totales. B) Linfocitos. C) Monocitos. D) Granulocitos.

#### 4.4.7. Análisis de la dinámica poblacional de la microbiota intestinal predominante en terneros jóvenes.

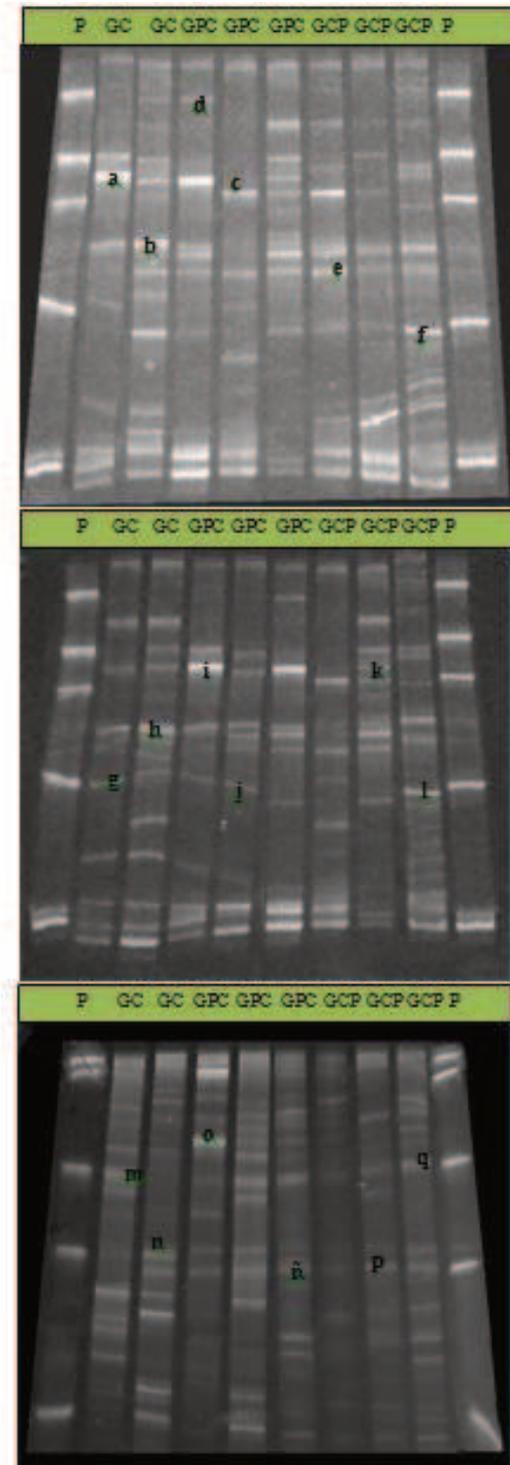
Los perfiles DGGE de la comunidad bacteriana del intestino de los terneros arrojaron patrones compuestos por 8 a 17 bandas dependiendo de la muestra analizada. Muchas bandas dominantes desaparecieron después de unos días y fueron sustituidas por otras (Figura 35).



**Figura 35.** Dendrograma de los perfiles DGGE de la comunidad bacteriana de la materia fecal de los terneros tratado con probióticos e infectados con *Campylobacter* (GPC) terneros infectados con *Campylobacter* (GCP) y grupo control (GC) en los días 0 (D0) 30 (D30) y 51 (D42).

No se pudo observar un agrupamiento de los animales, en diferentes momentos teniendo en cuenta al grupo que pertenecían. Sin embargo se puede observar que la similitud de los perfiles se agrupó en relación a la edad de los animales. Se encontró una

similitud del 65 % en los perfiles de la microbiota intestinal de los terneros en el día 0 de experimento. A los 21 d, las muestras tuvieron coeficientes de similitud de la microbiota del 70 %. En tanto, las muestras intestinales presentaron un coeficiente de similitud del 80% en el día 42 de ensayo.



**Figura 36.** DGGE de ADN extraído de la materia fecal de los terneros suplementado con BAL e infectado con *Campylobacter jejuni* (GPC), grupo infectado con *Campylobacter jejuni* y no suplementado con probióticos (GCP) y los terneros del

grupo no suplementado con probiótico y no infectado con *Campylobacter* (GC). (A) día 0 G-C, G-PC y G-CP, (B) día 21 G-C, G-PC y G-CP, (C) día 42 G-C, G-PC y G-CP. (P) patrón con bacterias de referencia (*L. plantarum* DSPV 354T, *L. salivarius* DSPV 001, *L. casei* DSPV 318T, *C. jejuni* C173 y *S. enteritidis* 421E).

Los productos de ADN se secuenciaron y se le asignaron a especies o géneros utilizando el programa BLAST en la base de datos GenBank. Un total de 20 bandas fueron escindidas y enviadas a secuenciar, las cuales presentaron entre un 88% y un 100% de identidad con las secuencias de ADNr 16S disponibles en el GenBank para su identificación (Tabla 17). Se encontraron bandas en igual posición en todas las muestras de terneros de la misma edad (Figura 36). La intensidad de las mismas fue variable, determinando esto que la abundancia de los microorganismos era diferente.

La comparación de fragmentos de ADN, del día 0 del ensayo, con secuencias de GenBank evidenció la presencia de cepas pertenecientes al género, *Caulobacter* y *Ruminococcus*, perteneciente al orden Caulobacterales y Clostridiales respectivamente en el GC (Tabla 17). En el G-PC se observaron cepas pertenecientes a al género *Clostridium* pertenecientes al orden clostridiales y cepas pertenecientes al phylum Firmicutes. En cuanto al G-CP se observaron cepas pertenecientes al género Ruminococcaceae perteneciente al orden Clostridiales (Tabla 17).

Al día 21 se evidenció la presencia de cepas pertenecientes al género *Megamonas* perteneciente al orden *Selenomonadales* y cepas pertenecientes al orden *Lachnospiraceae* en el G-C. En el G-PC se encontraron cepas del género *Lactobacillus* y *Ruminococcus* pertenecientes a los órdenes Lactobacillales y Clostridiales. Mientras que en el G-CP se encontraron cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* *Corynebacterium* de los órdenes Lactobacillales y Actinomycetales (Tabla 17).

En el día 42 de ensayo el perfil microbiano de los terneros del G-C fue de cepas pertenecientes al género *Clostridium* del orden Clostridiales y cepas del orden *Lachnospiraceae*. En el G-PC se encontraron cepas del género G-PC *Lactobacillus* pertenecientes al género Lactobacillales y cepas pertenecientes al orden *Lachnospiraceae*. Mientras que al G-CP se encontraron cepas del orden *Clostridium* *Prevotella* pertenecientes a los géneros Clostridiales y Bacteroidales respectivamente. Comparativamente, se observó una mayor población de *Lactobacillus* en las muestras de materia fecal de los terneros pertenecientes al G-PC en relación a los otros grupos (Tabla 17).

**Tabla 17.** Porcentaje (%) de identidad de secuencias parciales de 16S ADNr con secuencias presentes en la base de datos del NCBI.

Grupo	Banda	Género o especie relacionado	Identidad (%)	NCBI Número de acceso
G-CD0	a	No cultivable <i>Caulobacter sp/</i> Bacteria no cultivable	99	MG717903,1/ MF653954,1
G-CD0	b	<i>Ruminococcus sp.</i>	98	LT598551.1
G-PCD0	c	<i>Clostridium</i> no cultivable	88	AY607172.1
G-PCD0	d	<i>Firmicutes</i> no cultivable	93	KC597196.1
G-CPD0	e	<i>Ruminococcaceae</i> no cultivable	91	KM244876.1
G-CPD0	f	Bacteria no cultivable	99	MF800754.1
G-CD21	g	Bacteria no cultivable / <i>Megamonas sp.</i>	98	KX967769.1/ LT628480,1
G-CD21	h	Bacteria no cultivable, <i>Lachnospiraceae</i> no cultivable	100	KP102727,1/ KP103013.1
G-PCD21	i	<i>Lactobacillus sp.</i>	99	AF158988.1
G-PCD21	j	<i>Ruminococcus sp</i>	99	KP103693.1
G-CPD21	k	<i>Lactobacillus helveticus</i>	93	KT361209.1
G-CPD21	l	<i>Corynebacterium sp.</i>	91	MF304135,1/ LT897837.1
G-CD42	m	Bacteria no cultibable/ <i>Clostridium</i> no cultivable	88	MF229092,1/ KP101737,1
G-CD42	n	<i>Lachnospiraceae</i> bacterium no cultivable	95	KY669804.1
G-PCD42	ñ	Bacteria no cultibable/ <i>Lachnospiraceae</i> bacterium	84	AF371519,1/ EU728772,1
G-PCD42	o	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	99	MG827269.1
G-CPD42	p	Bacteria no cultibable/ <i>Clostridium</i> no cultivable	90	JQ886079.1/ AY806071,1
G-CPD42	q	Bacteria no cultivable/	91	FJ677535.1/

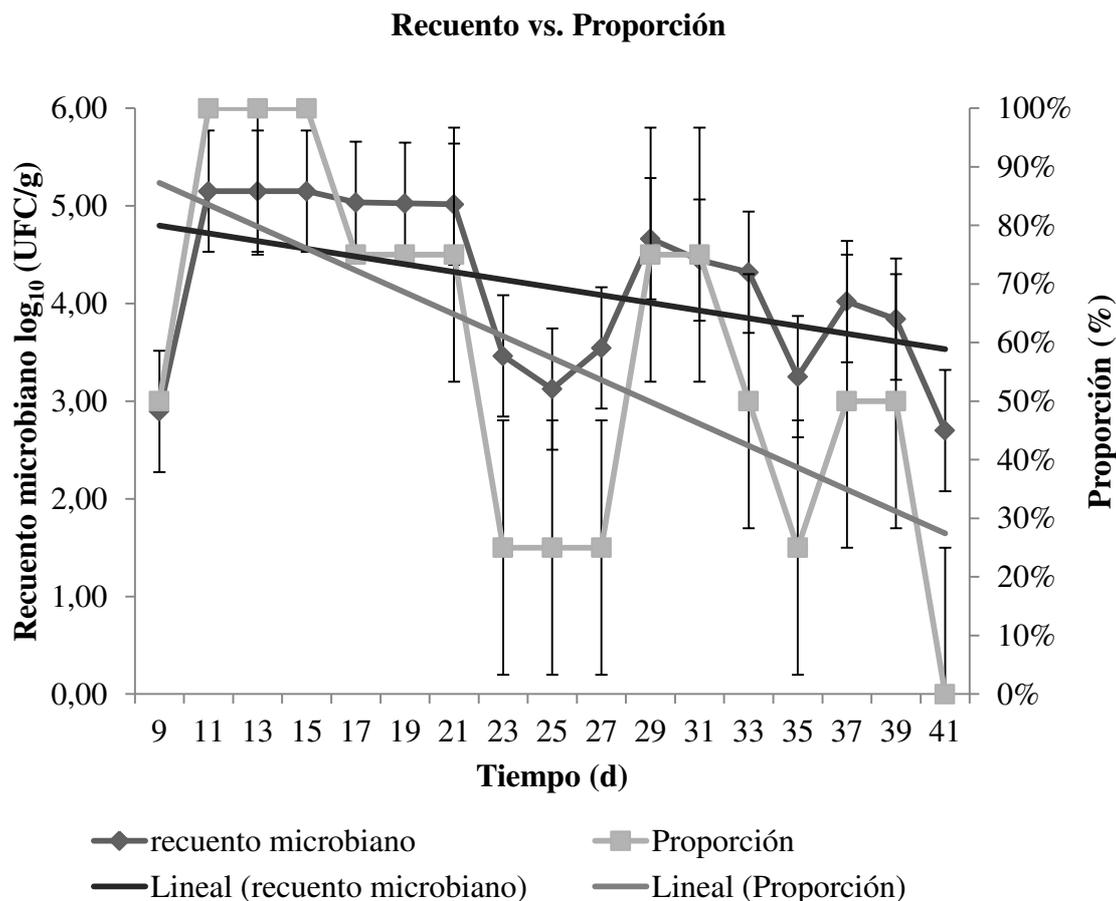
---

Fue posible encontrar bandas en la misma posición las cepas de referencia de *Lactobacillus* y de *Campylobacter* en muestras de terneros de todas las edades. Sin embargo la secuenciación de dichas bandas no coincidieron con *L. casei*, *L. plantarum* o *C. jejuni* (Tabla 18).

#### **4.5. Evaluación de la diseminación del patógeno utilizando modelos probabilísticos.**

##### **4.5.1. Detección de *Campylobacter* en materia fecal y proporción de animales infectados.**

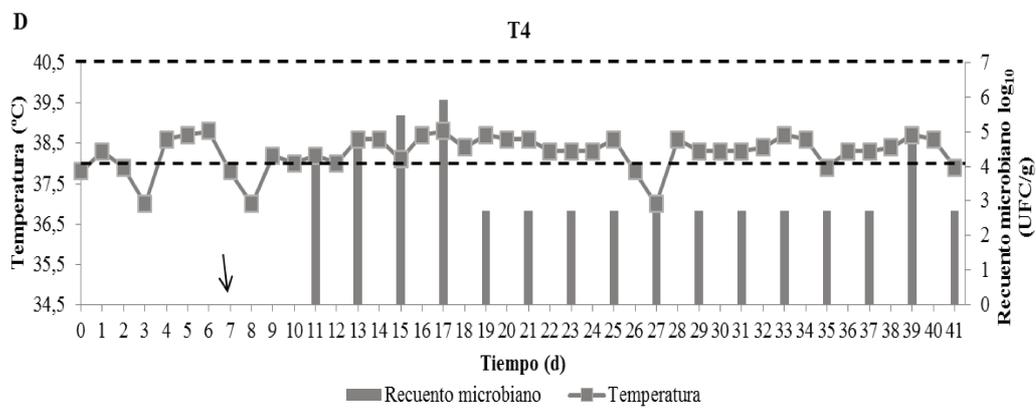
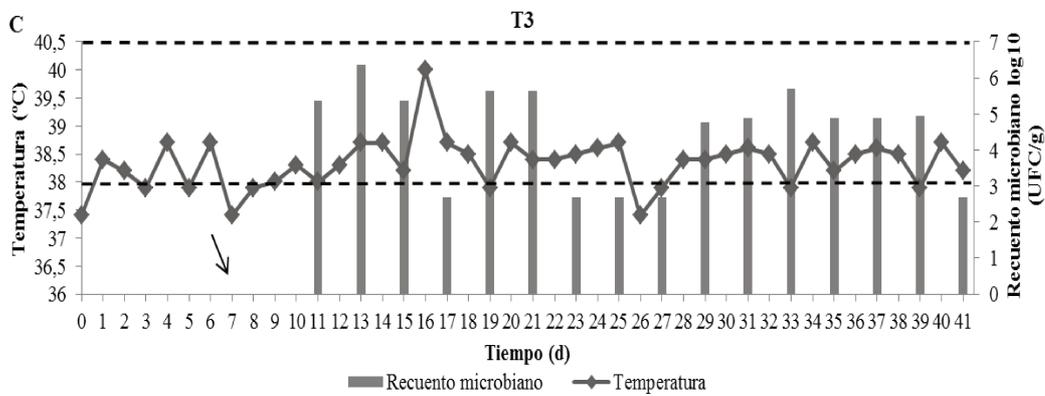
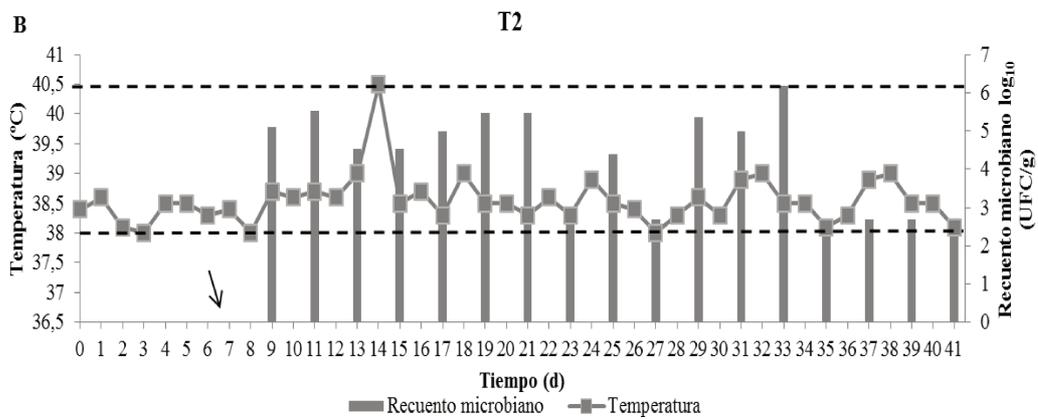
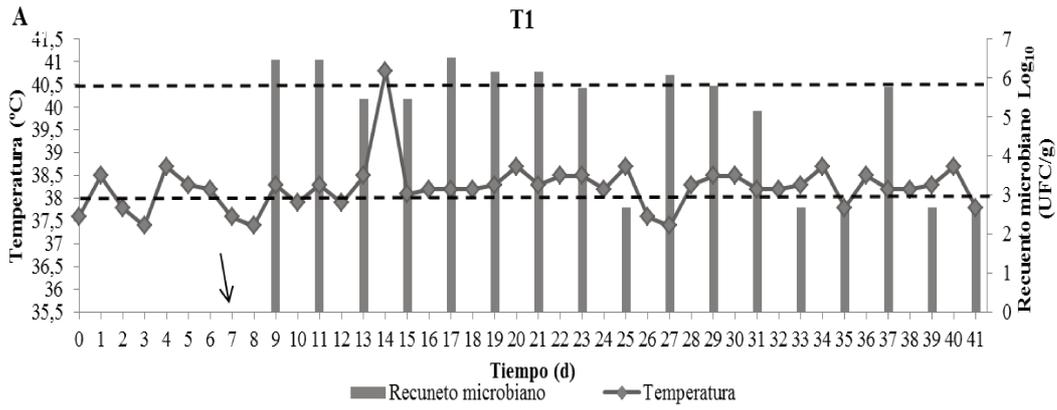
Los terneros estaban libres de *Campylobacter* termotolerantes antes de comenzado el estudio. En este ensayo se pudo observar que la carga de *Campylobacter jejuni* en el tracto gastrointestinal de los animales varió en función del día del ensayo ( $p < 0,05$ ). El patógeno comenzó a recuperarse el día 2 pos infección (correspondiente con el día 9 de experimento), siendo la proporción de animales infectados por *Campylobacter jejuni* en este día del 50% (Figura 37). En el ternero que se inoculó la recuperación de *Campylobacter jejuni* fue de 6,47 log UFC/g y de 5,10 log UFC/g para el otro animal (Figura 37 A y B). En el día 4 pos infección la prevalencia fue del 100 % de los animales del grupo (Figura 37). Esto indica que el patógeno presenta una alta tasa de diseminación, ya que el 100% de los animales se infectan en un periodo de tiempo corto. A partir día 4 pos infección el promedio de recuperación del patógeno fue de 5 log UFC/g hasta el día 14 pos infección a partir del cual el promedio de recuperación disminuyó (Figura 37). En el día 8 pos infección la recuperación del patógeno se vuelve intermitente, disminuyendo la proporción de animales infectados por *Campylobacter jejuni* hasta finalizar el ensayo. La carga de *Campylobacter jejuni* disminuyó 0,021 log UFC/g por cada día del experimento, por lo cual en el transcurso del tiempo los animales podrían eliminar el microorganismo de su tracto gastrointestinal y quedar libres del patógeno.



**Figura 37.** Recuento microbiano vs. proporción de animales infectados con *Campylobacter* durante 42 d de ensayo.

#### 4.5.2. Temperatura Corporal y recuento microbiano.

En cuanto a la temperatura corporal se pudo observar que solamente el ternero que se inóculo con 10 log UFC presentó una temperatura por encima de 40,5 °C (nivel superior fisiológico) (Figura 39.A). El resto de los animales que contrajo de *Campylobacter* del ambiente contaminado presentaron temperaturas por debajo del nivel superior fisiológico (Figura 39 B, C, D). Además se puede observar que el aumento de temperatura se corresponde con el inicio de la disminución de la carga de *Campylobacter jejuni*.



**Figura 38.** Recuento microbiano de *Campylobacter jejuni* y temperatura corporal de los terneros durante 42 días de ensayo. T1, ternero al cual se inoculó  $10^{10}$  UFC (A). T2(B), T3(C), T4(D) terneros que compartían el grupo. Las líneas punteadas representan los límites fisiológicos de temperatura.

## 5. Discusión



## **5.1. Evaluación de la viabilidad de cepas probióticas conservadas en cápsulas secadas por liofilización.**

### **5.1.1. Viabilidad bacteriana durante el almacenamiento.**

La producción de cápsulas de alginato con elevada densidad de bacterias probióticas es posible de lograr incubando las cápsulas en un medio de cultivo (Champagne y col., 2000). Sin embargo, la proliferación microbiana dentro de las RC no fue lo suficientemente alta como para alcanzar la carga bacteriana obtenida por la técnica de concentración por centrifugación. Cheow y col. (2013) sugieren que las cápsulas con mayor densidad celular perdieron menos viabilidad durante el proceso de liofilización cuando no se usan crioprotectores. En este estudio, las cápsulas hechas a través de la técnica de concentración con la menor cantidad inicial de bacterias (CC,5X) disminuyeron la densidad celular después del proceso de liofilización. Por el contrario, la viabilidad de las cápsulas hechas con la misma técnica pero con una mayor densidad bacteriana (CC12.5X), no se vio afectada por el proceso de liofilización. En el mismo sentido, las cápsulas que tuvieron los recuentos iniciales más altos (CC) fueron las que mantuvieron la mayor viabilidad hasta el final de su período de almacenamiento a 4 °C, por encima del NMS. Las cápsulas que tenían los recuentos iniciales más bajos (RC), terminaron el período de almacenamiento con recuentos menores que el NMS. En el almacenamiento a TA, los microorganismos muestran una mayor actividad metabólica, producción de metabolitos ácidos y bacteriocinas e incluso una pérdida de sustratos (Holhem y col., 2016). Las temperaturas de almacenamiento más bajas reducen las reacciones químicas perjudiciales, como la oxidación de ácidos grasos (Heidebach y col., 2010), de modo que la mejor viabilidad de los probióticos se logra a temperaturas de refrigeración o de congelación (Kanmani y col., 2011; Shoji y col., 2013) logrando una vida útil más larga de las cápsulas (Holkem y col., 2016).

Por otro lado, el efecto de la temperatura fue influenciado por otros factores como el recubrimiento de la cápsula, el neutralizado del cultivo antes del proceso de conservación y la presencia de crioprotectores. Las cápsulas revestidas tienen una especie de "piel" periférica que aumenta el espesor de los materiales de cobertura, lo que mejoraría la viabilidad de las células encapsuladas, posiblemente debido a una mejor protección de las bacterias contra los factores ambientales dañinos (Krasaekoopt y col., 2006). En este estudio, se observó un efecto del recubrimiento en el almacenamiento de cápsulas a temperatura ambiente. En estas condiciones, la viabilidad

bacteriana en las cápsulas recubiertas fue mayor que en las no recubiertas, pero en ambos casos los recuentos fueron más bajos que el NMS desde el día 14. Algunos autores han informado que solo las cápsulas de alginato recubiertas con quitosano fueron capaces de mantener la viabilidad durante el almacenamiento (Trabelsi y col., 2013; Abbaszadeh y col., 2014). Sin embargo, en este estudio, en condiciones de refrigeración, el recubrimiento no mejoró la viabilidad durante el período de almacenamiento. Holkem y col. (2016) han informado que las cápsulas de alginato sin recubrir secadas por liofilización, han sido capaces de mantener altos recuentos microbiológicos durante el período de almacenamiento.

La neutralización del medio de cultivo al final del período de crecimiento tuvo efecto sobre la viabilidad bacteriana. La viabilidad bacteriana puede mejorarse mediante el control del pH, ya que las células pueden perder su viabilidad y actividad cuando no pueden mantener un pH intracelular óptimo en un ambiente de bajo pH durante un largo período. Por el contrario, para algunas cepas es beneficioso la falta de control del pH, ya que el estrés por pH genera la sobreproducción de proteínas que hacen que las bacterias sean más resistentes a los procesos posteriores (Huang y col., 2017). En este estudio, se observaron dos efectos. Las CC12,5X sin neutralización no disminuyó la viabilidad durante la liofilización, mientras que el CC12.5X neutralizado sufrió una pérdida de viabilidad de 1,25 Log (UFC/cápsula) que indica que la neutralización no tuvo un efecto positivo durante el proceso. Sin embargo, el efecto fue positivo durante el almacenamiento, a temperatura ambiente, terminando el estudio con un valor superior al NMS.

Los crioprotectores protegen contra el daño causado por el proceso de congelación, pero también generaron un efecto (positivo o negativo) sobre la supervivencia de las cepas durante el almacenamiento. Los azúcares y sus derivados se han utilizado como crioprotectores eficaces para las bacterias del ácido láctico, ya que tienen grupos hidroxilo que proporcionan protección contra los radicales libres y por su capacidad de unión al agua que evita la formación de hielo intracelular (Kanmani y col., 2011). Numerosos estudios han demostrado que la adición de un agente protector, como el glicerol y la lactosa, mejora la viabilidad de las bacterias probióticas almacenadas a 4 °C o -20 °C (Timmerman y col., 2005; Miao y col., 2008; Savini y col., 2010; Kanmani y col., 2011; Dianawati y col., 2012; Dimitrellou y col., 2016). Este efecto protector se observó en nuestro estudio en cápsulas conservadas en refrigeración y temperaturas de congelación, pero en el caso de cápsulas con glicerol almacenadas a TA, el efecto fue en

detrimento de la viabilidad bacteriana. El glicerol es una sustancia muy higroscópica, por lo tanto, si el producto liofilizado no se almacena en condiciones de baja humedad, el glicerol puede absorber el agua del ambiente, aumentar la actividad del agua para los microorganismos y reducir su viabilidad. Dianawati y col. (2013) encontraron que el uso de glicerol tenía una tendencia a aumentar la actividad del agua en el producto liofilizado y Kanmani y col. (2011) informaron que el glicerol tiene un menor efecto protector durante el almacenamiento a TA. Cuanto mayor sea la actividad del agua y la temperatura de almacenamiento, mayor será la tasa de inactivación de microorganismos (Dianawati y col., 2011; Aschenbrenner y col., 2012; Broeckx y col., 2016). Por el contrario, para las cápsulas almacenadas a TA se observaron los mejores resultados para Per12.5X. El uso de disacáridos solo o en combinación con otros crioprotectores ha mostrado mejoras en la viabilidad de los productos liofilizados almacenados en TA (Broeckx y col., 2016). Las Gly12,5X mantuvieron la viabilidad durante el período de almacenamiento cuando se almacenó a -20 °C. El crioprotector que se agrega a una suspensión celular altamente concentrada durante la liofilización experimenta una transición del estado líquido al estado vítreo. La temperatura de transición vítrea es la temperatura a la que el material experimenta una transición del sólido al estado líquido (Aschenbrenner y col., 2012). En general, los productos liofilizados deben almacenarse por debajo de esta temperatura de transición donde pueden mantener este estado (Broeckx y col., 2016). La actividad del agua y la temperatura de transición vítrea son factores críticos que desencadenan reacciones fisicoquímicas adversas y causan la inactivación bacteriana. El glicerol y la lactosa son sustancias no ionizables de bajo peso molecular que causan solidificación amorfa y vítrea en lugar de cristalización, lo que mejoraría la viabilidad microbiana durante la liofilización y el almacenamiento a temperaturas de refrigeración y congelación (Hubálek y col., 2003).

### **5.1.2. Viabilidad bacteriana durante la digestión gastrointestinal simulada.**

Con el fin de ejercer sus efectos beneficiosos en el huésped, las bacterias probióticas deben estar vivas en el momento del consumo, y también ser capaces de alcanzar el intestino grueso en cantidades suficientemente altas para facilitar la colonización y proliferación (Li y col., 2011). Se estima que se deberían consumir al menos  $10^8$  UFC/día de células probióticas vivas para observar beneficios en la salud del

consumidor (Lopez-Rubio y col., 2006). Las cápsulas utilizadas en este trabajo (Gly12,5X) fueron seleccionadas por su alto contenido inicial de microorganismos probióticos y su capacidad de mantener una alta viabilidad bacteriana durante el periodo de almacenamiento. Con el fin de determinar la capacidad de tales cápsulas para proteger al inóculo de las barreras gastrointestinales se evaluó en este estudio la tasa de supervivencia de dicho inóculo encapsulado en condiciones gastrointestinales *in vitro*.

En este trabajo puede observarse que las cepas de *Lactobacillus* encapsuladas tuvieron mejor viabilidad al finalizar las dos horas de exposición gástrica comparada con las cepas sin encapsular, con una pérdida de viabilidad de 1,45 y de 4,62 respectivamente. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Chandramouli y col. (2004) que informaron que la encapsulación en matriz de alginato mejoró la viabilidad de *L. acidophilus* frente a condiciones gástricas a pH 2 en comparación a su forma libre. Mandal y col. (2014) informaron resultados similares para cepas de *L. casei*. Picot y Lacroix (2004), también observaron una mayor supervivencia de bifidobacterias inmovilizadas en alginato a pH ácido (Picot y Lacroix, 2004).

De Araújo Etchepare y col. (2016) estudiaron el comportamiento de dos tipos de cápsulas frente a condiciones gastrointestinales e informaron recuentos microbianos de 4,23 y 4,13 log UFC/g a las 2 h de estar en contacto con JGS y posteriormente, luego del aumento de pH, tuvieron recuentos de 5,41 log UFC/g y de 5,10 log UFC/g luego de 2 h de exposición a JIS. En este trabajo, los valores bajos observados en las Gly12,5X a las dos horas de estar en contacto con el JGS a pH 2, pueden deberse a que el pH bajo aumentó la liberación de bacterias de las cápsulas (De Araújo Etchepare y col., 2016). Las cápsulas de alginato son porosas y sensibles a pH ácidos, lo que puede afectar la viabilidad y la liberación de los microorganismos de las cápsulas (Lee y col., 2004). El pH bajo puede producir un daño parcial en las células, pero si el tiempo de contacto en este ambiente no es muy prolongado y luego el pH se acerca más a la neutralidad, estas células con daño parcial pueden recuperarse (Picot y Lacroix 2004). Probablemente en nuestro trabajo, el pH ácido pudo causar un daño parcial en bacterias de la periferia de las Gly12,5X, disminuyendo los recuentos luego de dos horas de exposición a pH 2. Sin embargo, luego de un tiempo en exposición a JIS con pH 5, los microorganismos se recuperaron del daño resultando en recuentos mayores.

Chandramouli, y col. (2004) encontraron que la viabilidad de *Lactobacillus* encapsulado en condiciones gástricas simuladas, aumentó con el aumento de tamaño de la cápsula de alginato. Lee y Heo. (2000) encontraron resultados similares, donde la

pérdida de viabilidad bacteriana en condiciones gastrointestinales fue mayor en cápsulas de menor tamaño. Por otro lado algunos estudios reportaron que las proteínas de la leche proporcionan buena protección para las cepas probióticas durante su tránsito en el ambiente ácido del estómago debido a su capacidad de amortiguación (Picot y Lacroix, 2004; Reid y col., 2005; Livney, 2010). Debido al tamaño de las cápsulas estudiadas en este trabajo y al alto contenido de proteínas de suero de queso, es probable que las mismas ejercieran un efecto protector adicional sobre las cepas probióticas, con lo que se disminuiría la pérdida de viabilidad.

En cuanto a la exposición a JIS en nuestro trabajo puede observarse que las cepas de *Lactobacillus* encapsuladas tuvieron mejor viabilidad al finalizar las 4 h de exposición a JIS comparada con las cepas sin encapsular. La pérdida de viabilidad para las Gly12,5X fue de 0,55 Log UFC/cap. Y de 4,50 Log UFC/ml para las CL. La supervivencia del probiótico a la acción del jugo intestinal simulado depende de la concentración de la bilis, tiempo de exposición y especies y cepas bacterianas (Dianawati y col., 2016). Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por De Araújo Etchepare y col. (2016), donde no tuvieron disminución de recuentos bacterianos durante el contacto con JIS. Esto coincide con nuestro trabajo y podría resultar en que las cepas estudiadas en nuestro estudio no sean afectadas por la presencia de sales biliares, por lo cual no se vería afectada su viabilidad. Las cepas utilizadas en este trabajo fueron seleccionadas por su supervivencia frente a las condiciones gastrointestinales simuladas realizada en trabajos anteriores (Frizzo y col., 2006; Soto y col., 2005).

Es de destacar que el gran tamaño de las cápsulas desarrolladas en esta tesis tiene una ventaja con respecto de las microcápsulas, que es la mayor resistencia a las condiciones gástricas. Esto está relacionado con la barrera física y el incremento de la distancia de las bacterias con el medio (Lee y Heo, 2000; Muthukumarasamy y col., 2006).

### **5.1.3. Evaluación de la viabilidad bacteriana durante el almacenamiento y condiciones gastrointestinales simuladas en cápsulas con 11 logUFC.**

Las cápsulas obtenidas a través de la técnica de concentración por centrifugación con una proporción 1:1 en cuanto a la matriz y al cultivo microbiano, tienen una elevada densidad de probióticos (10 log UFC/cápsula). Sin embargo, luego de la administración

de estas cápsulas a los terneros, la recuperación de los microorganismos probióticos en la materia fecal de los animales, no se encontraba en los niveles esperados como en el estudio llevado a cabo por Soto y col. (2014). Por tal motivo se desarrollaron cápsulas con alta densidad probiótica (11 log/UFC/cápsula) variando la proporción de la matriz y el medio de cultivo.

En cuanto a la viabilidad a lo largo del tiempo se pudo observar que las CAP11 presentaron un comportamiento similar al descrito para las Gly12,5X. La temperatura de conservación influyó en la viabilidad bacteriana. Las cápsulas conservadas a 4 °C y a -20 °C fueron las que mejor mantuvieron la viabilidad durante el transcurso del ensayo. Los recuentos microbianos se mantuvieron por encima del NMS durante todo el experimento en estas temperaturas de conservación. Las cápsulas conservadas a -20 °C conservaron la viabilidad por encima de los 10 log UFC/cápsula hasta finalizar el ensayo. Las cápsulas conservadas a 4 °C mantuvieron la viabilidad por encima de 10 log UFC/cápsula hasta el día 56 del ensayo. Esto probablemente es debido a que las temperaturas bajas reducen las reacciones químicas perjudiciales, como la oxidación de ácidos grasos (Heidebach y col., 2010), de modo que la mejor viabilidad de los probióticos se obtiene a temperaturas de refrigeración o de congelación (Kanmani y col., 2011; Shoji y col., 2013) logrando una vida útil más larga de las cápsulas (Holkem y col., 2016). Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con otros trabajos donde la adición de protectores mejoran la conservación microbiana a 4 °C o -20 °C (Miao y col., 2008; Dianawati y col., 2012; Dimitrellou y col., 2016).

Las cápsulas conservadas a temperatura ambiente solo mantuvieron la viabilidad por encima del NMS hasta el día 42 de experimento. Esta reducción en la viabilidad puede deberse probablemente a que el glicerol es una sustancia higroscópica, por lo tanto, si el producto liofilizado no se almacena en condiciones de baja humedad, el glicerol puede absorber el agua del ambiente, aumentar la actividad del agua para los microorganismos y reducir su viabilidad. Dianawati y col. (2013) encontraron que el uso de glicerol tenía una tendencia a aumentar la actividad del agua en el producto liofilizado y Kanmani y col. (2011) informaron que el glicerol tiene un menor efecto protector durante el almacenamiento a TA. Por otro lado, la conservación a temperatura ambiente puede hacer que los microorganismos se encuentren metabólicamente activos y emplear algunas sustancias que estén dentro de las cápsulas como fuente de azúcares. Además podría ocurrir que se produjera una acumulación de metabolitos producidos por los microorganismos dentro de las cápsulas resultando tóxicos para los mismos

(Jiménez y Pranteda, 2011). La tasa de inactivación de microorganismos es mayor cuanto mayor sea la actividad del agua y la temperatura de almacenamiento (Broeckx y col., 2016).

En cuanto a la digestión gastrointestinal simulada los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos para las Gly12,5X en los otros tipos de cápsulas. Las cepas de *Lactobacillus* encapsulados tuvieron una mayor tasa de supervivencia que los microorganismos no encapsulados con una pérdida de viabilidad de 1,07 log UFC/cap y de 4,35 log respectivamente. Esto concuerda con lo visto para las Gly12,5X y otros trabajos que informaron que las cápsulas de matriz de alginato brindan protección frente a la condiciones gastrointestinales (Chandramouli y col.,2004; Picot y Lacroix, 2004; Mandal y col., 2014).

Las cepas probióticas tuvieron mejor viabilidad al finalizar las dos horas de exposición gástrica comparada con las cepas sin encapsular, con una pérdida de viabilidad de 1,45 y de 4,62 respectivamente. Esto resultados coinciden con los obtenidos por Chandramouli y col. (2004) que informaron que la encapsulación en matriz de alginato mejoró la viabilidad *L. acidophilus* frente a condiciones gástricas a pH 2 en comparación a su forma libre. Mandal y col. (2014) informaron resultados similares para cepas de *L. casei*. También se observó una mayor supervivencia de bifidobacterias inmovilizadas en alginato a pH ácido (Picot y Lacroix, 2004).

La concentración de sales biliares, el tiempo de exposición de los microorganismos al JIS y las especies y cepas bacterianas influyen en la supervivencia del probiótico a la acción del jugo intestinal (Dianawati y col., 2016). De Araújo Etchepare y col. (2016) obtuvieron resultados similares a nuestro trabajo donde no tuvieron disminución de recuentos bacterianos durante el contacto con JIS. Esto coincide con nuestro trabajo y podría resultar en que las cepas estudiadas en esta tesis no sean afectadas por la presencia de sales biliares, por lo cual no se vería afectada su viabilidad. Las cepas utilizadas en este trabajo fueron seleccionadas por su supervivencia frente a las condiciones gastrointestinales simuladas realizada en trabajos anteriores (Frizzo y col., 2006; Soto y col., 2005).

De los diferentes tipos de cápsulas analizadas en esta tesis pudo determinarse que las cápsulas hechas con la técnica de concentración por centrifugación fue la única que permitió alcanzar densidades celulares  $> 9$  log (UFC / cápsula). Otra ventaja de la metodología de concentración es que es más rápida que la metodología de reincubación ya que no requiere tiempo de incubación. Otra determinación importante es que la etapa

de neutralización del medio de crecimiento antes de la centrifugación genera una mayor viabilidad bacteriana durante todo el tiempo. Este es un paso que genera altos beneficios y es de bajo costo y no requiere mucho tiempo. Por otro lado, existe una interacción entre otros factores evaluados en este estudio: temperatura de almacenamiento, recubrimiento de quitosano y tipo de crioprotector. La temperatura de almacenamiento es un factor crítico en el mantenimiento de la viabilidad. Solo a temperaturas de refrigeración y de congelación ha sido posible mantener durante algún tiempo la viabilidad por encima de 9 log (UFC/cápsula). En tales condiciones, la presencia de glicerol como crioprotector ha mejorado la viabilidad bacteriana, pero el recubrimiento con quitosano no generó beneficios. La propuesta para los ensayos posteriores fue la de utilizar cápsulas no recubiertas porque el proceso de recubrimiento no influyó en la viabilidad bacteriana.

Es de destacar que lograr cápsulas con una alta densidad bacteriana (mayor a 9 log UFC/cápsula) permitiría una dosificación de 1 cápsula/animal/d. Tener la dosis diaria en una sola cápsula reduciría la complejidad de administrar el inóculo probiótico a los animales en el campo. Otro beneficio adicional es que las cápsulas de alta densidad de microorganismos permitirían una mayor supervivencia de las cepas frente a condiciones gastrointestinales simuladas y esto ayudaría a alcanzar el colon en cantidades suficientes para facilitar la colonización del tracto digestivo.

## **5.2. Evaluación del efecto de microorganismos benéficos sobre la performance y microbiota intestinal de terneros jóvenes durante la crianza convencional de terneros jóvenes.**

Los sistemas de producción intensivos utilizados en las explotaciones lecheras disminuyen el tiempo de lactancia en terneros provocando numerosas modificaciones en el tracto gastrointestinal pudiendo, en algunos casos, ser responsables de los episodios de diarrea (Eckert y col., 2015)

La generación de cepas resistentes a rifampicina fue utilizada con éxito en otros trabajos con animales de abasto (Frizzo y col., 2011; Blajman y col., 2015) siendo importante para el monitoreo de las cepas probióticas en este estudio. En nuestro experimento, no se observó crecimiento de la microbiota láctica intestinal en MRSrif.

Esta inhibición del crecimiento de la microbiota láctica autóctona por parte de la rifampicina permitió rastrear el inóculo utilizado..

El inóculo administrado en cápsulas liofilizadas soportó las condiciones adversas del abomaso y de la porción proximal del intestino colonizando las porciones posteriores del mismo lo cual es una propiedad importante para los microorganismos con potencial probiótico (Rogelj y col., 2002). Por lo tanto, las cápsulas desarrolladas en este trabajo resultan vehículos adecuados para que los microorganismos probióticos lleguen viables a su sitio de acción.

La microbiota láctica de los terneros al iniciar el ensayo era similar en ambos grupos y se encontraba en valores normales para la edad de los terneros. Los recuentos de la microbiota láctica fueron disminuyendo a lo largo del ensayo como normalmente sucede en los terneros en crecimiento.

La población de coliformes al inicio del estudio presentaba valores similares en ambos grupos, encontrándose dentro de valores normales para la edad de los animales. Estos valores fueron disminuyendo a lo largo del ensayo como sucede normalmente en los animales en crecimiento.

Los terneros nacen con el tracto gastrointestinal estéril y los microorganismos se introducen durante el parto, a partir de la microbiota fecal, vaginal e intestinal. Durante la primera semana de vida la comunidad microbiana experimenta cambios dinámicos con aumento de la población de bacterias benéficas como los *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Agazzi y col., 2014) y de bacterias productoras de diarrea como los coliformes. La aparición de diarrea en los terneros se ha relacionado con una disminución de la flora beneficiosa y un aumento de la población de coliformes en las heces (Torrezan y col., 2016). Los microorganismos probióticos podrían suprimir el crecimiento de coliformes, reduciendo la incidencia de enfermedades diarreicas. Para disminuir las enfermedades diarreicas durante la crianza artificial de los terneros resulta importante optimizar la microbiota entérica aumentando el número de microorganismos potencialmente beneficiosos (Uyeno y col., 2013).

La forma de administrar los probióticos a los terneros puede tener influencia en la recuperación de los mismos en materia fecal. Los microorganismos probióticos pueden ser administrados a los terneros como células activas, por ejemplo a través de leches fermentadas, o en una forma inactiva, por ejemplo secadas por pulverización o generalmente liofilizado (Fasoli y col., 2003). Una ventaja que presenta la alimentación

de probióticos en forma inactiva (liofilizado) frente a la administración en forma activa (leche fermentada) es el menor volumen de administración (Geigerová y col., 2016).

En este estudio pudo observarse que la recuperación del inóculo probiótico fue mayor en las primeras dos semanas del estudio y posteriormente se recuperó en menor número hasta finalizar el ensayo. El mayor porcentaje de recuperación se alcanzó a los 14 días de ensayo. En un estudio realizado por Soto y col. (2014) donde administraron el mismo inóculo de cepas activas de *Lactobacillus*, en leche fermentada durante tres semanas, obtuvieron una tasa de recuperación de 5,11 % durante la primera semana. Este resultado es similar al obtenido en este trabajo en la primera semana, donde el porcentaje de recuperación fue del 3,13%. Sin embargo, en la segunda y tercera semana en el trabajo llevado a cabo por Soto y col. (2014) los porcentajes de recuperación fueron superiores, siendo de 23,29 % y de 41,86 % respectivamente, a los obtenidos en la primera semana. Estos resultados están en contraste con los obtenidos en esta tesis ya que los porcentajes de recuperación del inóculo probiótico fue de 4,27 y 0,87 % en la segunda y tercer semana respectivamente. Estas diferencias posiblemente se deban a que en nuestro ensayo las bacterias probióticas fueron administradas de forma inactiva (liofilizadas) mientras que en el otro ensayo los microorganismos se encontraban activos.

Geigerová y col. (2016) evaluaron la forma de administración de bifidobacterias en terneros. Por un lado administraron bifidobacterias activas, en leche fermentada, y por otro, cepas inactivas secadas mediante liofilización. Ellos encontraron que cuando las bacterias se administraban en forma activa se obtenían recuentos más altos en la materia fecal a partir del día 14 de tratamiento. Por otro lado, la administración de bacterias en forma inactiva alcanzaba valores similares a partir del día 21 de ensayo. Probablemente esta diferencia se deba a que las bacterias liofilizadas necesitan tiempo para volverse activas en el intestino. Además, la viabilidad de las bacterias secas también depende del método utilizado para su rehidratación (Champagne y col., 2010).

Además de la forma de administración de los probióticos, hay otros parámetros, tales como la intensificación del sistema de crianza, la composición de la dieta y las prácticas de alimentación, que también pueden influir en el equilibrio microbiano y la supervivencia de las bacterias probióticas administradas en el tracto gastrointestinal (Simpson y col., 2002; Chaucheyras-Durand y Durand, 2010). Todo esto afecta la capacidad para sobrevivir de los probióticos después de la administración. Bunešová y col. (2015) evaluaron la utilización de probióticos con diferentes tipos de alimentación

(dieta a base de leche y dieta mixta) y diferentes sistemas de crianza (intensivo y extensivo). Ellos encontraron que los terneros alimentados únicamente con leche tuvieron recuentos de *Lactobacillus* y bifidobacterias más altos que terneros alimentados con una dieta mixta, sobre todo aquellos terneros que se alimentan a través de la succión de los pezones de sus madres consumiendo mayor cantidad de leche que los terneros en estaca, favoreciendo esto el aumento de los recuentos de bacterias benéficas (Vlkova y col., (2008). En cuanto al tipo de sistema Vlkova y col. (2008) encontraron que en los terneros criados de manera intensiva la recuperación de probiótico fue significativamente inferior al grupo criado de forma extensiva. Los resultados de recuperación en nuestro estudio fueron similares a los recuperados en las primeras semanas del ensayo de Bunešová y col. (2015) lo cual puede ser atribuido al mayor estrés que sufren los animales en los sistemas de cría intensivos. El estrés puede inducir alteraciones significativas en la microbiota gastrointestinal, incluyendo una disminución en las bacterias beneficiosas y un aumento de microorganismos potencialmente patógenos (Hawrelak y Myers, 2004), alteración de la motilidad y secreciones del tracto gastrointestinal (inhibición de la liberación del ácido gástrico, aumento de la producción de bicarbonato intestinal). Estos cambios pueden resultar en un entorno intestinal menos propicio para la supervivencia, la adherencia y multiplicación de las cepas de *Lactobacillus*.

Uno de los objetivos de la crianza artificial de terneros es el rápido pasaje de una dieta líquida (láctea) a una dieta sólida (alimento balanceado y forrajes). Cuanto antes se introduzca el alimento sólido para los terneros más rápido será la transición de pre-rumiante a rumiante. La ingestión de alimentos sólidos de manera precoz (grano y/o forraje) asegura un normal desarrollo de los pre estómagos y de las papilas absortivas. En este ensayo, el consumo de leche fue administrado de forma similar y constante en todos los terneros para estimular el rápido consumo de concentrado. Sin embargo no pudo observarse un incremento precoz del consumo o un aumento del mismo entre ambos grupos. 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. Sin embargo, la contribución nutricional del concentrado al ternero durante los primeros 14 d de vida es baja, siendo la dieta líquida la principal fuente nutricional del animal para el mantenimiento y el crecimiento. El concentrado pasa a tener una contribución más expresiva cuando el animal presenta consumo de al menos 450g al día. Algunos autores afirman que monitorear el consumo de concentrado

durante la crianza artificial es un manejo importante para determinar la edad del desleche y recomiendan que el consumo de al menos 1 kg/día antes del mismo, para asegurar un crecimiento continuo y sin perjuicios sobre el animal (Stamey y col., 2012; Torrezan y col., 2016). Además una temprana eliminación del suministro de dieta líquida (leche) llevará a una disminución de los costos de producción, siempre que los terneros tengan acceso a la alimentación de concentrado en cantidad y calidad suficientes para evitar pérdidas de rendimiento. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que alimentar con más leche durante la fase de pre-destete promueve un mayor desarrollo de la glándula mamaria y, en consecuencia, un mayor potencial de producción de leche de las futuras vacas (Moallem y col., 2010; Rincker y col., 2011).

Las mediciones corporales (peso, altura de la cruz y perímetro torácico) son fácilmente evaluadas y de extrema importancia para el sistema de cría artificial de terneros, además, son buenos indicadores de fallas de manejo, sea alimentario, sanitario o de mano de obra. Las medidas corporales permiten a los establecimientos tamberos el seguimiento del crecimiento de los animales para el éxito del programa de crianza y, de necesario realizar ajustes en el manejo. En este experimento, los valores obtenidos de las medidas corporales no tuvieron diferencias entre ambos grupos. Los terneros mostraron aumentos de peso sostenido y continuo a partir de la primera semana de estudio y no hubo disminución del mismo a lo largo del ensayo. Esto se debe a que los animales ya habían superado los factores estresantes de la crianza artificial como el transporte, la separación de sus madres y el acostumbramiento a su nuevo hogar. Este desarrollo del peso a lo largo del experimento suele ser habitual para esta etapa de crecimiento y desarrollo de los animales.

Algunos autores que utilizaron preparados probióticos, durante la crianza artificial de terneros, tampoco observaron diferencias en el peso vivo de los animales entre los animales del grupo tratado y el grupo control (Mokhber-Dezfouli y col., 2007, Torrezan y col., 2016). En cuanto a la altura de la cruz y perímetro torácico, algunos autores que utilizaron diferentes preparados probióticos obtuvieron valores similares a los obtenidos en este trabajo y tampoco observaron diferencias significativas entre el grupo tratado y el grupo control (Jenny y col., 1991; Frizzo y col., 2010; Riddell y col., 2010).

La utilización de técnicas moleculares permite el estudio de las bacterias no cultivables sin las presiones selectivas inherentes a los métodos basados en cultivos tradicionales. El desarrollo de la microbiota predominante del intestino de los terneros que fueron suplementados con *L. casei* DSPV 318T y *L. plantarum* DSPV 354T fue

examinado usando DGGE. En este ensayo, terneros de la misma edad, criados en las mismas condiciones, presentaron diferentes patrones de bandas, lo que sugiere que factores específicos del hospedador son importantes en el establecimiento de la comunidad bacteriana del TGI.

Un total de 24 bandas fueron analizadas. Los perfiles de DGGE obtenidos de ampliaciones de la región V3 del ADNr 16S mostraron el desarrollo de la comunidad bacteriana e hicieron hincapié en una gran diversidad bacteriana en las heces de los terneros en el tiempo 0. En nuestro país, en la producción de bovinos de leche, es muy común que los terneros recién nacidos pasen los primeros días de vida junto a sus madres y otros terneros en corrales de parto que suele ser utilizado continuamente para las pariciones. Este ambiente alberga una alta carga de microorganismos, por lo cual los animales pueden adquirir una mayor flora microbiana lo que podría explicar el gran número de bandas en el gel de tiempo 0.

Lukáš, y col. (2007) determinaron la presencia de una alta inestabilidad de la comunidad bacteriana intestinal en los primeros días de vida. Muchas bandas dominantes desaparecieron después de unos pocos días y fueron sustituidas por otras bandas. Algo similar se puede observar en nuestro trabajo donde bandas dominantes en los geles del tiempo 0 no se encuentran en el siguiente gel. Es sabido que la microbiota intestinal de los animales se vuelve más compleja a medida que estos crecen (Danzeisen y col., 2011). En este ensayo, el número de bandas aumentó del día uno al día 51 lo cual puede atribuirse a una microbiota estable en el TGI de los terneros (Gong y col., 2002).

Sólo unas pocas secuencias pudieron ser identificadas a nivel de especie. La mayoría pudo ser clasificada a nivel de género, familia u orden. Las bacterias identificadas fueron predominantemente, por un lado, especies de bacterias benéficas capaces de degradar la celulosa como los *Ruminococcus* y, por otro lado, potencialmente patógenas de *Clostridium*. Además, algunos fragmentos alinearon con especies de los géneros *Escherichia*, de particular interés debido a la aparición de cepas patógenas de *E. coli* con la capacidad de colonizar simultáneamente el TGI de seres humanos y animales de consumo (Mora y col., 2010). Además, se evidenció la presencia de una alta proporción de bacterias no cultivables. Es interesante observar que nuestros resultados están de acuerdo con estudios previos. Blajman y col. (2017) reportaron que la mayoría de los clones de las secuencias estaban estrechamente relacionados con bacterias no cultivables.

La diversidad microbiana intestinal se asocia con cambios en la dieta (Maslowski y Mackay, 2011); sin embargo, la densidad bacteriana total parece no estar influenciada. Se ha demostrado que los tratamientos con antibióticos reducen la población bacteriana total y luego elevan las especies bacterianas resistentes a los antibióticos (Ubeda y col., 2010); también disminuyen algunas bacterias beneficiosas que pertenecen a las familias *Ruminococcaceae* y *Lachnospiraceae*, que producen butirato para el metabolismo energético del huésped (Dethlefsen y Relman, 2011). Por lo tanto, el mantenimiento de la densidad bacteriana estable a lo largo del TGI podría ser crucial para que el huésped mantenga la fermentación microbiana y la protección contra cualquier invasión patógena.

En nuestro estudio se ha administrado la misma dieta a ambos grupos y no se ha administrado antibióticos por lo que la diferencia en los perfiles entre el G-C y G-P puede deberse a la administración de los microorganismos probióticos. La principal diferencia observada en este estudio es un aumento de *Lactobacillus* potencialmente benéficos en el tracto gastrointestinal de los terneros de 51 días de vida. Estos resultados pueden atribuirse a la modulación de la microbiota por la suplementación del probiótico. Cuando la población de bacterias benéficas como *Lactobacillus* es comparativamente más baja que las de bacterias potencialmente patógenas como *Clostridium* o *E. coli*, es necesario intervenir para mejorar la salud intestinal. Los hallazgos obtenidos en esta tesis sugieren que la administración de probióticos de manera temprana puede tener un impacto directo en el desarrollo de la microbiota intestinal en los terneros jóvenes.

Otra alternativa, como la administración de prebióticos junto a los probióticos encapsulados, puede resultar interesante, para aumentar los recuentos de estas bacterias benéficas, y ser probadas en futuros trabajos. Heinrichs y col. (2003) probaron, con el fin de aumentar el recuento de bacterias beneficiosas en el tracto gastrointestinal de los terneros el uso de prebióticos. La adición de prebióticos podría modificar la microbiota intestinal, aumentando el recuento de bacterias beneficiosas en el tracto gastrointestinal (Heinrichs y col., 2003). Liu y col. (2008) encontraron que la administración de prebiótico aumenta el número de *Lactobacillus* y reduce el número de *E. coli* en las heces.

### **5.3. Generación del modelo experimental de infección por *Campylobacter jejuni* en terneros jóvenes.**

#### **5.3.1. Inhibición *in vitro***

En este trabajo se evaluó si las cepas *L. casei* DSPV 318T y *L. plantarum* DSPV 354T inhibían el crecimiento de *C. jejuni* NCTC 11168. Se evaluó si la producción de ácidos orgánicos por parte de estas cepas de *Lactobacillus* inhibía el crecimiento de este patógeno. Es reconocido que uno de los posibles mecanismos por el cual las BAL restringen el crecimiento de microorganismos patógenos es su capacidad de producir metabolitos inhibidores como los ácidos orgánicos (Kobierecka y col., 2017). Chaveerach y col. (2004) determinaron en estudios *in vitro* que la producción de ácidos orgánicos por BAL poseen efecto bactericida contra *C. jejuni*. El ácido láctico inhibe el crecimiento de varios microorganismos incluidas las bacterias patógenas (Neal-McKinney y col., 2012). En nuestro estudio pudo observarse que las cepas de *Lactobacillus* produjeron inhibición de la cepa de *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 *in vitro*, siendo la causa de la inhibición la presencia de ácido orgánicos. Kobierecka y col. (2017) reportaron resultados similares *in vitro* adjudicando esta inhibición a la producción de ácido láctico.

Debido a la propiedad de los ácidos orgánicos para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos algunos estudios han incorporado ácido láctico en el agua potable de los animales y han reducido con éxito la contaminación por *Salmonella* y *Campylobacter*, pero tuvieron efectos secundarios como la reducción del consumo de agua y alimento (Byrd y col., 2001). También es bien sabido que los ácidos orgánicos son amortiguados por la alimentación y son menos eficientes en el intestino (Tareb y col., 2013).

Tareb y col., (2013) realizaron un estudio con dos cepas de *Lactobacillus* y determinaron que la coagregación con las cepas de *Campylobacter* puede ser un mecanismo más eficaz en el control de este patógeno. El fenómeno de coagregación reduce las distancias célula-célula entre los probióticos y los patógenos, aumentando la eficacia de los metabolitos antimicrobianos producidos por los probióticos viables (ácidos orgánicos, bacteriocinas, entre otros) (Tarebb y col., 2013).

Además de la producción de ácidos orgánicos, la actividad antimicrobiana de las bacterias probióticas contra los patógenos se puede llevar a cabo por la producción de otras sustancias como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas (Ouweland y

Vesterlund, 2004). Schillinger y Lucke (1989) informaron que las bacteriocinas producidas por los probióticos tienen actividad de inhibición específica contra bacterias gram-negativas, incluidas *Campylobacter sp.*, que son más sensibles a los ácidos orgánicos. (Ghareeb y col., 2012).

Otro mecanismo por el cual las BAL pueden contrarrestar la infección por *Campylobacter* es la autoagregación, que es una propiedad que permite la formación de biofilms en el tracto intestinal que contribuye, como barrera físico-química, a la preservación de la pared del intestino, junto con la estimulación del sistema inmune (Jankovic y col., 2003; Castagliuolo y col., 2005; Voltan y col., 2007; Turpin y col., 2010) y a la protección contra la colonización de bacterias patógenas (Collado y col., 2007; Collado y col., 2008; Tareb y col., 2013). Además, las bacterias con un alto potencial de autoagregación colonizarán más fácilmente los tractos intestinal (Tareb y col., 2013)

En nuestro estudio *in vitro* la producción de ácidos orgánicos ha sido el mecanismo por el cual las cepas de *Lactobacillus* producen la inhibición de *Campylobacter* NCTC 11168.

### **5.3.2. Modelo de infección de *Campylobacter*.**

El desarrollo de modelos de infección de patógenos en animales resulta interesante para conocer el comportamiento de la infección en los mismos y de esta forma desarrollar futuros experimentos.

La ausencia de signos clínicos en los primeros 5 días de ensayo puso en evidencia el buen estado de salud de los terneros antes de la infección experimental. Luego de la inoculación con el patógeno, todos los animales, de ambos grupos infectados, mostraron al menos un signo de enfermedad. A pesar de los signos manifiestos de enfermedad los animales permanecieron alertas y con un buen estado mental durante todo el ensayo.

Los resultados obtenidos en el experimento indican que los terneros criados artificialmente fueron susceptibles a la infección por *C. jejuni* NCTC 11168. Esta cepa fue capaz de producir fiebre en todos los animales de ambos grupos infectados por el patógeno. Sin embargo no fue capaz de producir cambio en la consistencia de la materia fecal. El periodo de incubación para la infección por *C. jejuni* NCTC 11168 estuvo en 5 días y se observó un aumento de temperatura por encima de 40,5 °C en todos los animales de los grupos infectados con el patógeno, con una duración de 1 día. La

ausencia de diarrea y el corto periodo de fiebre puede deberse a la baja virulencia de esta cepa de *Campylobacter*.

*C. jejuni* se aisló de las heces de los animales inoculados en los dos grupos infectados, pero no se recuperó constantemente en todos los animales en todos los días donde se realizó el muestreo. Al-Mashat y Taylor (1980) reportaron que la recuperación de *Campylobacter* no fue constante atribuyendo esto a la utilización de medios no selectivos en el aislamiento de este microorganismo o al transcurso de un largo tiempo entre la toma de la muestra y su procesamiento. Morishita y col. (1997) realizaron un ensayo donde infectaron pollos con *C. jejuni* y observó una eliminación intermitente de este patógeno. Este desprendimiento cíclico puede estar relacionado con la afinidad de *C. jejuni* por asociarse con el moco dentro del tracto intestinal, asociándose la recuperación de este microorganismo con la motilidad y la eliminación del moco en el tracto intestinal (Beery y col., 1988). La utilización de medios selectivos y el procesamiento inmediato (pocos minutos) de las muestras en este estudio podrían indicar una eliminación intermitente del patógeno por parte de los animales.

#### **5.4. Evaluación del efecto de microorganismos benéficos sobre terneros jóvenes infectados con *Campylobacter jejuni*.**

Dado el aumento continuo de la incidencia de campilobacteriosis humana adquirida por el consumo de carne contaminada y el aumento de la resistencia de *C. jejuni* a los antibióticos (Kassem y col., 2016), nuevos métodos de control para reducir la colonización y/o la contaminación son deseables (Ganan y col., 2012). Las bacterias del ácido láctico pueden reducir el riesgo de infección por patógenos transmitidos por los alimentos en el intestino (Saint-Cyr y col., 2017).

La campilobacteriosis humana se encuentra asociada principalmente con las aves de corral (Klein-Jöbstl y col., 2016), sin embargo diferentes estudios enfatizaron el papel del ganado bovino en la transmisión de *Campylobacter* al humano. Después de las aves de corral, los bovinos se asociaron frecuentemente con infecciones humanas (Wilson y col., 2009; Haan y col., 2010; Mughini Gras y col., 2012; Begum y col., 2015). Se estima que alrededor del 70,9% de los casos humanos se atribuyeron a pollos, el 19,3% a bovinos y el 8,6% a perros (Kittl y col., 2013). La manipulación o el consumo de carne poco cocida o contaminada se considera como la fuente más importante de infección de *Campylobacter spp.* (Acke y col., 2011). La contaminación

de la superficie de las canales durante el proceso de sacrificio representa un importante problema de salud pública debido al riesgo de transmisión de patógenos a los humanos. Un nivel más bajo de *C. jejuni* a nivel de los sistemas primarios de producción puede mejorar la calidad de la carne bovina, reduciendo el impacto en la salud del consumidor. El uso de probióticos y prebióticos, combinado con estrategias de bioseguridad en los establecimientos de cría y engorde de bovinos junto a medidas higiénicas en la matanza, puede representar una herramienta importante para controlar la carga de *C. jejuni* (Gaggìa y col., 2011; Saint-Cyr y col., 2017).

En este trabajo, se utilizaron dos cepas probióticas de *Lactobacillus* teniendo en cuenta los resultados *in vitro* que mostraron que estas cepas inhibían el crecimiento de *C. jejuni* NCTC 11168. La cantidad de *Campylobacter* utilizada en este ensayo fue adecuada debido a que el objetivo era evaluar el efecto probiótico del inóculo administrado, por lo que todos los animales debían infectarse con el patógeno. Por lo tanto se utilizó la dosis en la cual *C. jejuni* NCTC 11168 fue eliminado en la materia fecal de los terneros en mayor cantidad en el modelo de infección desarrollado en esta tesis.

La ausencia de signos clínicos durante los primeros 7 días del experimento puso en evidencia el buen estado de salud de los terneros antes de la infección experimental. Luego de la administración del patógeno, todos los animales del G-C10 mostraron al menos 1 signo de enfermedad mientras que los terneros del G-P solamente un animal mostró síntomas. El periodo de incubación para la infección por *C. jejuni* NCTC 11168 estuvo en 6 días en el G-CP días y se observó un aumento de temperatura por encima de 40,5 °C en todos los animales del grupo con una duración de 1 día. A pesar de los signos manifiestos de enfermedad los animales permanecieron alertas y con un buen estado mental durante todo el ensayo.

La administración del inóculo de probiótico no ha sido eficiente para contrarrestar la infección por la cepa de *C. jejuni* NCTC 11168 para la concentración administrada. Aunque el tratamiento probiótico no pudo evitar la colonización por el patógeno, fue evidente que el inóculo modificó la respuesta de los animales ante el accionar del patógeno debido a la menor recuperación del patógeno en los primeros días del ensayo y a la menor temperatura corporal observada en los terneros del grupo probiótico.

Los estudios que investigan los probióticos han mostrado grandes discrepancias en términos de reducción de la carga de *Campylobacter* intestinal. Por un lado algunos investigadores han informado que las bacterias probióticas no siempre disminuyen

significativamente la colonización del patógeno (Wine y col., 2009; Hermans y col., 2010; Robyn y col. 2013; Epps y col., 2015; Thomrongsuwannakij y col., 2016). Stern y col. (2008) realizaron un ensayo donde administraron microorganismos antagonistas de *Campylobacter* capaces de producir bacteriocinas y no obtuvieron una reducción significativa de éste patógeno. Estos autores han manifestado que *C. jejuni* habita en las criptas de Lieberkühn, en las profundidades de las vellosidades intestinales. En este nicho la flora competidora con *C. jejuni* es limitada y se debe en parte a los nutrientes únicos que se explotan allí y a la atmósfera microaerobia, a la que *Campylobacter spp.* están adaptados. Esto podría explicar la falta de diferencia significativa entre los grupos en las últimas semanas de nuestro ensayo. Los microorganismos probióticos podrían haber quedado excluidos de ese nicho por lo que tuvieron una influencia limitada en la colonización de *C. jejuni*. Por otro lado, en las últimas 2 décadas, han aumentado los estudios que evidencian un posible papel de los probióticos en la prevención del desprendimiento de *C. jejuni* a nivel de la producción primaria (Ghareeb y col., 2012; Gharib Naseri y col., 2012; Robyn y col., 2013; Nishiyama y col., 2014; Cean y col., 2015). Sin embargo, sigue siendo poca la información disponible sobre el efecto antimicrobiano de microorganismos probióticos y su eficacia en la colonización de *C. jejuni* en los animales de abasto siendo la mayoría de los trabajos *in vivo* en pollos parrilleros.

Los microorganismos probióticos que más se han estudiado para reducir la prevalencia de *Campylobacter* en animales de abasto han sido los *Lactobacillus*, *Bacillus* y *Enterococcus* (Johnson y col., 2017). Se han sugerido varios mecanismos para la inhibición de patógenos; por ejemplo, algunos productos metabólicos de lactobacilos, como el ácido láctico y/o las bacteriocinas, pueden inhibir el crecimiento de bacterias patógenas (Servin y col., 2004), mientras que otros productos pueden mejorar la respuesta inmune sistemática, activando la actividad de los macrófagos (Campana y col., 2012).

Algunos investigadores redujeron la carga de *Campylobacter* utilizando probióticos cuyo mecanismo de acción fue la producción de metabolitos antibacterianos, principalmente productos ácidos, y probablemente a través de sustancias proteicas específicas no identificadas (Chaveerach y col., 2004; Santini y col., 2010; Marianelli y col., 2010;). Debido a que las cepas estudiadas en este trabajo inhibieron *in vitro*, por producción de ácidos orgánicos, la cepa de *C. jejuni* NCTC 11168, probablemente este mecanismo sea el responsable de la disminución de los

recuentos de este patógeno en los terneros en los primeros días pos-inoculación. Sin embargo, algunos investigadores han manifestado que la actividad antimicrobiana de las cepas de ácido láctico es multifactorial existiendo la posibilidad de que los mecanismos que subyacen a la actividad de *Lactobacillus* contra *Campylobacter* implican tanto cepas productoras de ácido láctico como de otras sustancias que actúan sinérgicamente, o a través de la coagregación o autoagregación. Por este motivo no se descarta en nuestro trabajo que otro mecanismo producido por estas cepas de *Lactobacillus* puedan intervenir en la inhibición del microorganismo patógeno.

Algunos estudios han informado previamente una coagregación entre *C. jejuni* y algunas especies de *Lactobacillus* (Tareb y col., 2013). Los experimentos *in vitro* demostraron que la presencia de probióticos puede conducir a la coagregación con *C. jejuni* y la inhibición de la adhesión del este último a las células epiteliales humanas. La capacidad de las bacterias probióticas para provocar la agregación (o coagregación) de *C. jejuni* e inhibir su unión a las células hospedadoras puede funcionar de forma sinérgica con otros factores antibacterianos. Lehri y col., (2017) demostraron que una acidificación del ambiente causada por *Lactobacillus fermentum* representó un fuerte factor antibacteriano y que la coagulación puede ayudar adicionalmente en la acción antagonista de los *Lactobacillus* al reducir la distancia entre las células probióticas y el patógeno (Tareb y col., 2013).

Varios estudios han utilizado bacteriocinas para controlar la colonización de *Campylobacter* en aves de corral (Stern y col., 2006, Santini y col., 2010, Ghareeb y col., 2012, Gharib Naseri y col., 2012, Robyn y col., 2013, Nishiyama y col., 2014). En el tracto digestivo del pollo, las bacteriocinas son producidas por las BAL tales como *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Estos son péptidos sintetizados ribosómicamente con un rango variable de actividad antimicrobiana. Pueden ser activos contra un amplio o estrecho espectro de bacterias, por lo que pueden ser seleccionados para matar a un patógeno particular sin alterar la microflora del animal. La mayoría de las bacteriocinas forman poros en la membrana externa de bacterias susceptibles, permitiendo la entrada de iones inorgánicos, o crean trastornos en la estructura y síntesis de las paredes celulares, lo que lleva en ambos casos a la muerte bacteriana (Svetoch y Stern 2010). Actualmente, se han purificado pocas bacteriocinas con actividad anti-*Campylobacter*. La mayoría de las cepas productoras se han aislado de pollos parrilleros. Stern y col., 2006 purificaron dos bacteriocinas y las administraron en un ensayo *in vivo* con pollos parrilleros y lograron una reducción significativa de los

recuentos de *C. jejuni* comparados el grupo control (de 4 a 5 log<sub>10</sub> UFC/g de diferencia). Sin embargo cuando administraron las cepas productoras de bacteriocinas a los animales no observaron diferencias entre el grupo tratado y el grupo control. Svetoch y col., (2008) también administraron una bacteriocina purificada a pollos parrilleros en el agua de bebida y lograron una disminución significativa de los recuentos de *C. jejuni* entre el grupo tratado y el grupo control. Los estudios descritos anteriormente sugieren que las bacteriocinas anti-*Campylobacter* purificadas son una forma generalmente más eficiente de disminuir la carga intestinal de los pollos que las cepas probióticas. Esto podría deberse al hecho de que las bacteriocinas producidas por las cepas probióticas administradas están presentes en menor concentración en comparación con las bacteriocinas administradas directamente (Meunier y col., 2016).

Helmy y col. (2017) demostraron que el tratamiento de pollos con probióticos resultó en un 70 % menos de pollos que liberan *C. jejuni* en comparación con los pollos de control a los 40 días de edad. En general, el número de aves que liberaron *C. jejuni* fue significativamente mayor en el grupo de control a lo largo de la vida de producción de los pollos de engorde. Helmy y col. (2017) pudieron observar que después de la inoculación oral, *C. jejuni* no se vertió en las heces hasta el segundo día después de la exposición, siendo esto similar a lo ocurrido a nuestro experimento.

Los resultados de la flora láctica, de *E. coli* y levaduras de los terneros al iniciar el ensayo eran similares entre ambos grupos y se encontraban en valores normales para la edad de los terneros. Anadón y col. (2006) proponen que la población de *Lactobacillus* en intestino está entre 10<sup>7</sup> y 10<sup>8</sup> UFC/g. Estos valores se pudieron observar en los diferentes grupos de nuestro estudio. En todos los terneros de nuestro ensayo pudo observarse que la población de *Lactobacillus*, *E. coli* y levaduras disminuyó de forma constante a lo largo del ensayo. La administración del patógeno y de las cepas probióticas no evidenció una modificación de las poblaciones de *Lactobacillus* y *E. coli* en los diferentes grupos. Es decir, que los terneros en un sistema de crianza artificial, alimentados con sustituto lácteos, fueron disminuyendo la población de *Lactobacillus* a medida que crecieron. Ozawa y col. (1983) observaron que la población de *Lactobacillus* disminuye con la utilización de una dieta que contiene antibióticos y que la administración periódica de BAL conlleva a la estabilización de esta población en los terneros.

Sin embargo, se observó en este estudio que la población de levaduras se modificó debido a la administración del probiótico. Ozawa y col. (1983) observaron que la

administración de BAL produjo una disminución de la población de levaduras, de igual manera a lo que ocurrió en nuestro estudio. La suplementación con levaduras vivas ha demostrado ser útil para mejorar la resistencia a enfermedades y la eficacia productiva (Cole y col., 1992). Esta población podría tener un efecto sobre las otras poblaciones, debido a componentes de pared de la levadura o a un efecto directo de la levadura viva evitando el establecimiento de bacterias patógenas y los efectos de los metabolitos tóxicos producidos por ellas (Frizzo y col, 2007).

Por otro lado, aunque la infección por *C. jejuni* rara vez causa enfermedad clínica en aves de corral, Lam y col., (1992) reportaron una reducción de peso en aves infectados *C. jejuni*, por lo que la reducción de este patógeno, tendrá efectos beneficiosos para las aves de corral a nivel de producción (Morishita y col., 1997). Ha sido demostrado por otros autores (Abe y col., 1995, Timmerman y col., 2005) que la administración de probióticos protege contra la enfermedad causada por bacterias patógenas. En este caso, la administración de dos cepas de *Lactobacillus* fue capaz de evitar la aparición de fiebre en los terneros y de disminuir los recuentos de *C. jejuni* NCTC 11168 en los primeros días del experimento. Estos resultados obtenidos, hacen suponer la posibilidad de que la administración del inóculo probiótico sea efectiva como herramienta profiláctica en el control de los patógenos. Esto fue observado en varios estudios que vieron disminuida la cantidad de *Campylobacter* en el intestino de animales luego de la administración de microorganismos probióticos (Ghareeb y col., 2012; Gharib Naseri y col., 2012; Robyn y col., 2013; Nishiyama y col., 2014; Cean y col., 2015).

El peso corporal es un parámetro fácilmente evaluable y de extrema importancia para el sistema de cría artificial de terneros, además, es un buen indicador de fallas de manejo, ya sea alimentario, sanitario o del personal. El peso corporal permite a los establecimientos tamberos el seguimiento del crecimiento de los animales para el éxito del programa de crianza y de ser necesario realizar ajustes en el manejo. En este experimento estas medidas no tuvieron diferencias entre ambos grupos. Los terneros mostraron aumentos de peso sostenido y continuo a partir de la primera semana de experimento y no hubo disminución del mismo a lo largo del ensayo. Esto se debe a que los animales ya habían superado los factores estresantes de la crianza artificial como el transporte, la separación de sus madres y el acostumbramiento a su nuevo hogar. Este desarrollo del peso a lo largo del experimento suele ser habitual para esta etapa de crecimiento y desarrollo de los animales.

Inglis y col, (2003) informaron que los animales de consumo se infectan por el ambiente contaminado y que la transmisión horizontal fue la vía de transmisión más probable para los animales. En estos casos, se podría estimar que la infección por *C. jejuni* podría ocurrir tan pronto como el primer día que entre en contacto con el ambiente contaminado (pudiendo ser el primer día de vida). Por lo tanto, es importante intentar establecer una flora con microorganismos benéficos, que evite o disminuya la colonización de *C. jejuni*, tan pronto como sea posible.

Si bien la reducción de *C. jejuni* por parte de las cepas probióticas utilizadas en este ensayo solo tuvo efecto en los primeros días post infección, estos microorganismos pueden usarse para reducir la carga de *C. jejuni*. Nuevos estudios deberían llevarse a cabo para mejorar el accionar de los mismos y podrían combinarse con otras cepas probióticas que posean diferentes mecanismos de acción sobre este patógeno. De esta forma se tendría una carga reducida de *Campylobacter* lo que conducirá a una menor contaminación de la canal y un mejor producto de calidad microbiológica para el consumidor.

Los valores de glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito permanecieron dentro de los valores normales en los 3 grupos a lo largo de toda la experiencia y no se observaron diferencias entre los diferentes grupos.

No se observaron diferencias entre los tres grupos experimentales en las respuestas inmunológicas a lo largo de la experiencia a pesar de la infección. Los valores de la serie leucocítica estuvieron dentro de los niveles normales, a excepción de la última semana donde los leucocitos totales, monocitos y neutrófilos estuvieron por encima de los valores de referencia. En cuanto a los linfocitos solamente el G-PC se encontró por encima de los valores normales.

En general, se sabe poco sobre la composición y la dinámica de la comunidad microbiana intestinal de los terneros. Los estudios sobre la composición de la microbiota intestinal se han llevado a cabo tradicionalmente utilizando métodos de cultivo microbiológicos clásicos (Coloe y col., 1984). Sin embargo, los estudios de diversidad basados en el cultivo están sesgados por el hecho de que no todas las bacterias son cultivables *in vitro*, y muchas se ha descubierto después de la introducción de métodos moleculares independientes del cultivo en ecología microbiana (Tannock y col., 2000). En la última década, la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE, Muyzer y col., 1993) se ha utilizado con éxito para investigar la diversidad de comunidades bacterianas complejas. Este método ha sido ampliamente

utilizado para monitorear los cambios temporales y espaciales en la estructura de la comunidad en respuesta a los cambios en los parámetros ambientales (Casamayor y col., 2002).

Un total de 20 bandas fueron analizadas. Los perfiles de DGGE obtenidos de amplicones de la región V3 del ADNr 16S mostraron una gran diversidad bacteriana en el tiempo 0. Esto puede deberse a que los animales en los primeros días de edad se encuentran en contacto con sus madres por lo cual pueden adquirir una gran diversidad de microorganismos influyendo en la microbiota intestinal.

En nuestro ensayo puede observarse que bandas dominantes pertenecientes al gel del tiempo 0 no se encuentran en el siguiente gel. En este periodo de vida encontraremos una mayor inestabilidad de la comunidad bacteriana (Lukáš y col., 2007). La microbiota intestinal de los animales se vuelve más compleja a medida que estos crecen (Danzeisen y col., 2011). En este ensayo, el número de bandas aumentó del día cero al día 42 lo cual puede atribuirse a una microbiota estable en el TGI de los terneros (Gong y col., 2002).

Sólo unas pocas secuencias pudieron ser identificadas a nivel de especie. La mayoría pudo ser clasificada a nivel de género u orden. Las bacterias identificadas fueron predominantemente, por un lado, especies de bacterias benéficas capaces de degradar la celulosa como los *Ruminococcus* y, por otro lado, potencialmente patógenas de *Clostridium*. Además, se evidenció la presencia de una alta proporción de bacterias no cultivables. Es interesante observar que nuestros resultados están de acuerdo con estudios previos. Blajman y col. (2017) reportaron que la mayoría de los clones de las secuencias estaban estrechamente relacionados con bacterias no cultivables.

La comunidad microbiana gastrointestinal de los animales de abasto juega un papel importante en el crecimiento y la salud de los mismos y que la composición bacteriana del intestino puede verse afectada por diversos factores como la dieta, el estrés, la presencia de patógenos, los probióticos y los antibióticos (Coates y col., 1963; Netherwood y col., 1999; Craven, 2000; Apajalahti y col., 2001; Knarreborg y col., 2002). En nuestro estudio la administración del patógeno y de los microorganismos probióticos no fue capaz de producir una modificación en la microbiota intestinal. Sin embargo pudo observarse recuperación lactobacillus en el G-PC en el día 21 y 42 mientras que en el G-CP solo se recuperó en el día 21 pero no se pudo recuperar en el GC. Por otro lado, no se han encontrado diferencias en los perfiles bacterianos de los

diferentes grupos. Esto podría indicar que el probiótico y el patógeno no han influenciado sobre la microbiota intestinal de los animales.

### **5.5. Evaluación de la diseminación del patógeno utilizando modelos probabilísticos.**

El ganado bovino es una fuente potencial de *Campylobacter spp.* a través de leche cruda, carne y su ambiente (Skirrow 1991; Fitzgerald y col., 2001; Minihan y col., 2004). El vínculo entre el ganado bovino como fuente de *Campylobacter spp.* y la transmisión al humano se ha relacionado por el aislamiento de serotipos comunes de *Campylobacter* idénticos de pacientes bovinos y humanos sanos (Nielsen y col., 2000, Minihan y col., 2004).

Se realizaron recuentos microbianos para asegurar que los animales eran libres de *Campylobacter*. La ausencia de recuentos positivos al patógeno y de signos clínicos durante los primeros 7 días del experimento puso en evidencia el buen estado de salud de los terneros antes de la infección experimental. Los animales que ingresaron al experimento resultaron ser libres de *Campylobacter*. Esto se corresponde con los animales provenientes de sistemas extensivos (sistemas de producción a pastoreo) donde la prevalencia de *C. jejuni* suele ser baja (< 5%) o en algunos rodeos no está presente (Besser y col., 2005).

Posterior a la inoculación se puede observar una rápida diseminación entre los animales de nuestro experimento, llegando al 100% de animales infectados cuatro días posterior a la infección. Teniendo en cuenta que el corral permaneció cerrado antes del inicio del ensayo y fue desinfectado previo al inicio del mismo se descarta la presencia de *Campylobacter* en el ambiente antes de la inoculación. En algunos estudios que recolectaron muestras ambientales de feedlot cerrados por largos periodos de tiempo (mayor un año) no detectaron la presencia de *Campylobacter* en el ambiente. Esto es debido a que este microorganismo no sobrevive en ambientes aireados, limpios y secos (Blaser y col., 1980; Luechtfeld y col., 1981; Doyle y Roman, 1982). Por lo tanto, la contaminación residual del ambiente por parte de *Campylobacter* en el feedlot resultaría insignificante y no influenciaría en la transmisión de este patógeno.

Stanley y col. (1998) realizaron un estudio donde muestrearon terneros de un rodeo lechero criados intensivamente desde el día de nacimiento hasta los 7 meses de edad. Ellos observaron que los terneros recién nacidos adquieren rápidamente el

organismo del entorno de la granja a través de la transmisión horizontal. Todos los terneros estaban libres de *Campylobacter* en el momento del nacimiento, pero la mayoría comenzó a eliminar este patógeno por materia fecal en 4 días. Obtuvieron los recuentos más altos aproximadamente al mes de vida de los animales (8 log) y posteriormente comenzó a disminuir la recuperación de los microorganismos hasta finalizar el muestro. Resultados similares se observaron en nuestro estudio donde los animales se infectaron en 4 días de entrar en contacto con el patógeno y se obtuvieron recuentos altos en los primeros muestreos para luego comenzar a disminuir.

Los terneros tienen contacto físico con sus camas todo el tiempo y es poco probable que pueda evitar la ingestión de material de origen fecal ya sea a través de sus propias pieles contaminadas o de los canales de agua o alimentos. Es probable que los animales alojados de esta manera vuelvan a infectarse constantemente de su propia camada y de otras fuentes (Stanley y col., 2003).

Estudios longitudinales llevados a cabo en feedlot mostraron una baja prevalencia de *Campylobacter* al momento del encierro de los bovinos. Besser y col. (2005) informaron una prevalencia de *Campylobacter* menor al 5% al momento del ingreso al feedlot. Con el paso de los meses se observa un aumento de la prevalencia de *Campylobacter* llegando a ser aproximadamente del 80 %. En otro estudio longitudinal en Irlanda, Minihan y col. (2004) muestrearon el ganado feedlot mensualmente desde el ingreso de los animales al feedlot hasta su salida y documentaron prevalencias mensuales promedio de 12, 52, 74 y 76%. Estas observaciones sugieren que los feedlot pueden proporcionar condiciones que favorezcan la diseminación y el desprendimiento de *Campylobacter* en el ganado. Estos resultados ilustran que *Campylobacter spp.* la colonización intestinal y el desprendimiento de materia fecal son comunes en el ganado de engorde. Este ganado también representa una fuente potencial de infección para el hombre.

La incidencia de *Campylobacter* es menor para los animales criados extensivamente (sistemas de pastoreo) que aquellos criados intensivamente (feedlot). Los posibles contribuyentes a la alta incidencia de *Campylobacter* en el ganado criado en feedlot son: la alta densidad de animales por superficie, el contacto constante con las heces de otros animales, la alta frecuencia de acceso a la alimentación y el agua comunitaria. Horrocks y col. (2009) encontraron que las tasas de prevalencia aumentaron en el ganado alimentado del 1,6% cerca o al ingresar al feedlot y del 63% cerca del final del período de acabado (Besser y col., 2005). Estos resultados sugieren

que el confinamiento puede promover un mayor transporte y transmisión horizontal de *Campylobacter*

La superficie destinada a los corrales de crianza artificial de terneros varía según el momento de la misma. En el período de adaptación a este sistema de crianza los metros cuadrados recomendados por animal son de 5 m<sup>2</sup>. Posterior al acostumbramiento, la superficie recomendada es de 15 a 20 m<sup>2</sup> por animal hasta los 50 días de vida. Sin embargo, si se desea disminuir la transmisión de patógenos en los sistemas de crianza colectivos, la superficie recomendada por animal es de 80 a 100 m<sup>2</sup> por animal (Osacar 2008). En nuestro experimento la superficies que cada animal contó fue de 3,61 m<sup>2</sup> por animal. Además en nuestro experimento los animales contaron con piso de hormigón y estuvieron bajo techo, mientras que en los sistemas de crianza suelen estar a la intemperie y con piso de tierra con cobertura variable de pasto. Estas condiciones en nuestro experimento pueden favorecer la supervivencia del microorganismo patógeno. Además, la poca superficie por animal en nuestro experimento aumentó el contacto entre los terneros lo que facilitó la transmisión de *Campylobacter*, explicando la alta velocidad de transmisión y la proporción del 100 % de animales infectados.

La mayor carga de *Campylobacter* se recuperó del ternero al cual se le inoculó el patógeno. Los demás terneros no tuvieron niveles tan altos de *Campylobacter*. Esto podría explicar la ausencia de temperatura en estos animales. La recuperación cíclica del patógeno se puede relacionar con la afinidad que posee *Campylobacter* por asociarse con el moco dentro del tracto intestinal, por lo que su recuperación se asocia con la motilidad y eliminación del moco intestinal (Beery y col., 1988).

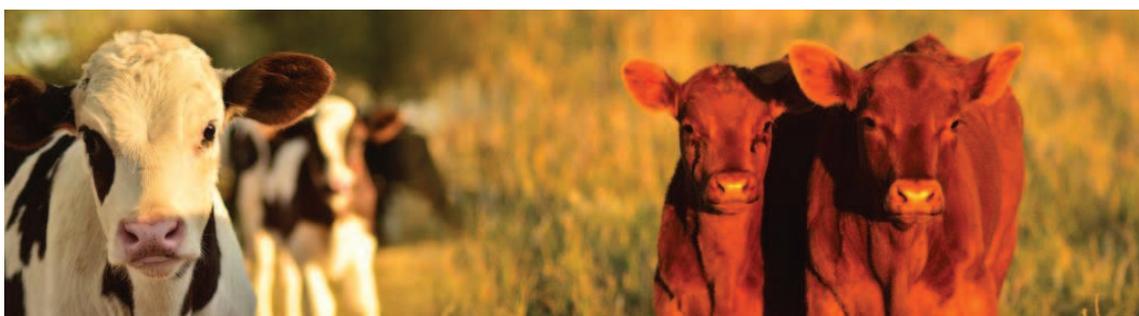
Numerosas investigaciones de la prevalencia de *C. jejuni* en poblaciones de ganado bovino en feedlot informan prevalencias que varían según la edad del animal, el tipo de ganado (ganado de carne o ganado lechero) y la estación del año (Garcia y col., 1985; Stanley y col., 1998, Nielsen y col., 2000; Grundmann y col., 2001; Besser y col., 2005). Se ha observado una variación estacional en la prevalencia de la diseminación de *Campylobacter* fecal bovino (Stanley y col., 1998) con picos en la eliminación que tienden a ocurrir en las temporadas de primavera y otoño. Dado que el presente estudio se llevó a cabo en invierno es posible que la época del año haya llevado a una disminución de la proporción de animales infectados en el experimento. Por otro lado los investigadores se han planteado si el aumento de la prevalencia observada representa nuevas infecciones o son el producto del recrudecimiento de infecciones previamente

indetectables. En algunos feedlot se ha determinado la eliminación de diferentes especies de *Campylobacter* spp. en muestreos consecutivos en ganado que eliminaba este patógeno. Esto se debió a la adquisición de nuevas infecciones por *Campylobacter*, a infecciones mixtas por *Campylobacter* o por el cambio de las cepas dominantes dentro del ambiente del corral o dentro del tracto intestinal de los animales. Esto explicaría la alta prevalencia de *Campylobacter* durante el tiempo que los bovinos permanecen en los corrales de engorde (Besser y col., 2005).

Debido a las condiciones ambientales en las cuales se llevó nuestro ensayo (alta carga animal por metro cuadrado y el corral de cemento) es probable que la diseminación del patógeno entre los animales se vea aumentada. Nuevos ensayo realizados en condiciones a campo donde la carga animal se ajuste a lo recomendado y el suelo del corral sea el utilizado en las explotaciones ganaderas para una crianza optima resulta interesante para ver el comportamiento del patógeno.



## **6. CONCLUSIONES.**



- El inóculo probiótico integrado por *L. casei* DSPV318T y *L. plantarum* DSPV354T para terneros lactantes requiere una administración de al menos 9 log (UFC)/día/ternero para ejercer el efecto probiótico. Las cápsulas elaboradas por el método de concentración por centrifugación, con neutralización del medio y compuestas con alginato de sodio, suero de leche y glicerol, alcanzaron la densidad celular requerida. Para el almacenamiento a lo largo del tiempo, las condiciones de refrigeración mantienen una viabilidad superior a 9 log (UFC/cápsula) durante 70 d y en condiciones de congelación durante al menos 84 d.
- Las cápsulas de alta densidad probióticas (11 log UFC/cápsula) elaboradas por el método de concentración por centrifugación, con neutralización del medio y compuestas con alginato de sodio, permeado de suero y glicerol, mantuvieron la viabilidad celular en condiciones de congelación durante al menos 84 días. Para el almacenamiento a lo largo del tiempo, las condiciones de refrigeración mantienen una viabilidad superior a 9 log UFC/cápsula durante 70 días y en condiciones de congelación mantienen una viabilidad superior a 10 log UFC/cápsula durante al menos 84 d.
- Las cápsulas desarrolladas en este trabajo fueron capaces de mantener la viabilidad de las BAL frente a las condiciones gastrointestinales simuladas.
- Las BAL de origen bovino *L. casei* DSPV 318T, *L. plantarum* DSPV 354T encapsuladas y secadas mediante liofilización fueron capaces de superar las barreras biológicas, alojarse y permanecer en el TGI de los terneros.
- La generación de mutantes resistentes a rifampicina facilitó el aislamiento y la enumeración del inóculo probiótico administrado a los terneros y permitió diferenciarla fácilmente de la microbiota indígena intestinal.
- La utilización de las cepas *L. casei* DSPV 318T y *L. plantarum* DSPV 354T encapsuladas y secas por liofilización, en las condiciones que se realizó el ensayo, no tuvo influencia sobre la performance de crecimiento y salud de los animales, probablemente debido a la excelentes condiciones en la cual se realizó la crianza artificial.
- La administración de las cepas probióticas no produjo efectos adversos sobre el estado de salud general de los animales. La supervivencia normal de los individuos, junto a la ausencia de síntomas clínicos en ambos grupos sugieren que las cepas utilizadas no son patogénicas.

- La administración de cepas probióticas modificó la microbiota intestinal aumentando la presencia de especies benéficas.
- El modelo de infección desarrollado en esta tesis demostró ser eficaz para infectar a terneros con ambas dosis de *Campylobacter jejuni* NCTC 11168. Este patógeno desarrolló signos clínicos en los animales (aumento de temperatura por encima de los valores normales para los terneros)
- Aunque el inóculo probiótico (*L. casei* DSPV 318T, *L. plantarum* DSPV 354T) no fue capaz de contrarrestar la infección por *C. jejuni* NCTC 11168, evitó el desarrollo de signos clínicos y disminuyó la excreción en materia fecal en los primeros días de la infección.
- *Campylobacter jejuni* tuvo una rápida diseminación entre los animales criados en sistemas colectivos donde el contacto entre animales es estrecho. Los sistemas intensivos de crianza de animales de abasto tienden a facilitar la diseminación de microorganismos patógenos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA



- Abbaszadeh S, Gandomi H, Misaghi A, Bokaei S, Noori N. 2014. The effect of alginate and chitosan concentrations on some properties of chitosan-coated alginate beads and survivability of encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* in simulated gastrointestinal conditions and during heat processing. *J Sci Food Agric.* 94: 2210-2216.
- Abe F, Ishibashi N, Shimamura S. 1995. Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *J Dairy Sci.* 78: 2838-2846.
- Acke E, Carroll C, O'Leary A, McGill K, Kelly L, Lawlor A, Madden RH, Moran L, Scates P, McNamara E, Moore JE, Jones BR, Fanning S, Whyte P. 2011. Genotypic characterization and cluster analysis of *Campylobacter jejuni* isolates from domestic pets, human clinical cases and retail food. *Iran Vet J.* 64: 6
- Adams MC, Luo J, Rayward D, King S, Gibson R, Moghaddam GH. 2008. Selection of a novel direct-fed microbial to enhance weight gain in intensively reared calves. *Anim Feed Sci Technol.* 145: 41-52.
- Agarwal N, Kamra DN, Chaudhary LC, Agarwal L, Sahoo A, Pathak NN, 2002. Microbial status and rumen enzyme profile of crossbred calves on different microbial feed additives. *Lett Appl Microbiol.* 34: 329-336.
- Agazzi A, Tirloni E, Stella S, Marocolo S, Ripamonti B, Bersani C, Caputo JM, Dell'Orto V, Rota N, Savoin G. 2014. Effects of species-specific probiotic addition to milk replacer on calf health and performance during the first month of life. *Ann Anim Sci.* 14: 101-115.
- Alais C. 1985. Composición de la leche. EN: Ciencia de la leche: principios de técnica lechera. p 21-31. Ed. Reverté S.A., Barcelona, España.
- Albertini B, Vitali B, Passerini N, Cruciani F, Di Sabatino M., Rodriguez L, Brigidi P. 2010. Development of microparticulate systems for intestinal delivery of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*. *Eur J Pharm Sci.* 40: 359-366.
- Alfredson DA, Korolik V. 2007. Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 277: 123-132.
- Al-Mashat RR, Taylor DJ. 1980. Production of diarrhoea and dysentery in experimental calves by feeding pure cultures of *Campylobacter fetus subspecies jejuni*. *Vet Rec.* 107: 459-464.
- Altekruze, SF. 1998. *Campylobacter jejuni* in foods. *J Am Vet Med Assoc.* 213: 1734-1735.

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215: 403-410.
- Anadón A, Martínez-Larrañaga MR, Martínez MA. 2006. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. *Regul Toxicol Pharmacol.* 45: 91-95.
- Anal AK, Singh H. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Sci Technol.* 18: 240-251.
- Apajalahti JH, Kettunen A, Bedford MR, Holben WE. 2001. Percent G+ C profiling accurately reveals diet-related differences in the gastrointestinal microbial community of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 67: 5656-5667.
- Aschenbrenner M, Kulozik U, Foerst P. 2012. Evaluation of the relevance of the glassy state as stability criterion for freeze-dried bacteria by application of the Arrhenius and WLF model. *Cryobiology.* 65: 308-318.
- Bajpai SK, Sharma S. 2004. Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca<sup>2+</sup> and Ba<sup>2+</sup> ions. *React Funct Polym* 59: 129-140.
- Basholli-Saliu M, Mueller M, Salar-Behzadi S, Unger FM, Viernstein H. 2014. Effect of lyoprotectants on  $\beta$ -glucosidase activity and viability of *Bifidobacterium infantis* after freeze-drying and storage in milk and low pH juices. *LWT- Food Sci Technol.* 57: 276-282.
- Bayatkouhsar J, Tahmasebi AM, Naserian AA, Mokarram RR, Valizadeh R. 2013. Effects of supplementation of lactic acid bacteria on growth performance, blood metabolites and fecal coliform and lactobacilli of young dairy calves. *Anim Feed Sci Technol.* 186: 1-11.
- Beery JT, Hugdahl MB, Doyle MP. 1988. Colonization of gastrointestinal tracts of chicks by *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol.* 54: 2365-2370.
- Begum S, Sekar M, Gunaseelan L, Gawande M, Suganya G, Malar PAS, Karthikeyan A. 2015. Molecular identification of *Campylobacter jejuni* and coli from chicken, calves and dogs to determine its potential threat on human being. *Vet World.* 8: 1420.
- Benoit SR, Lopez B, Arvelo W, Henao O, Parsons MB, Reyes L, Moir JC, Lindblade K. 2014. Burden of laboratory-confirmed *Campylobacter* infections in Guatemala 2008–2012: results from a facility-based surveillance system. *J Epidemiol Glob Health* 4: 51–59.

- Besser TE, LeJeune JT, Rice DH, Berg J, Stilborn RP, Kaya KW, Hancock DD. 2005. Increasing prevalence of *Campylobacter jejuni* in feedlot cattle through the feeding period. *Appl Environ Microbiol.* 71: 5752-5758.
- Black RE, Levine MM, Clements CML, Hughes TP, Blaser MJ. 1988. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J Infect Dis.* 157: 472-479.
- Blajman J, Gaziano C, Zbrun MV, Soto L, Astesana DM, Berisvil A, Romero Scharpen A, Signorini M, Frizzo L. 2015. *In vitro* and *in vivo* screening of native lactic acid bacteria toward their selection as a probiotic in broiler chickens. *Res Vet Sci.* 101: 50-56.
- Blajman JE, Zbrun MV, Signorini ML, Zimmermann, JA, Rossler E, Berisvil AP, Romero Scharpen A, Astesana DM, Soto LP, Frizzo LS. 2017. Development of cecal-predominant microbiota in broilers during a complete rearing using denaturing gradient gel electrophoresis. *Anim Prod Sci.* 57: 458-465.
- Blaser M, Powers B, Cravens J, Wang WL. 1978. *Campylobacter enteritis* associated with canine infection. *Lancet.* 312: 979-981.
- Blaser MJ, Hardesty HL, Powers B, Wang WLL, 1980. Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in biological milieus. *J Clin Microbiol.* 2: 309-313.
- Borch E, Arinder P. 2002. Bacteriological safety issues in red meat and ready-to-eat meat products, as well as control measures. *Meat Sci.* 62: 381-390.
- Bouttefroy A, Milliere J. 2000. Nisin-curvaticin 13 combinations for avoiding the regrowth of bacteriocin resistant cells of bacteriocin resistant cells of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. *Int J Food Microbiol.* 62: 65-75.
- Brashears MM, Galyean ML, Lonergan GH, Mann JE, Killinger-Mann K, 2003. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and performance by beef feedlot cattle given *Lactobacillus* direct-fed microbials. *J Food Prot.* 66: 748-754.
- Broeckx G, Vandenheuvel D, Claes IJ, Lebeer S, Kiekens F. 2016. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *Int J Biol Pharm.* 505: 303-318.
- Bunešová V, Vlková E, Geigerová M, Rada V. 2015. Effect of rearing systems and diets composition on the survival of probiotic *bifidobacteria* in the digestive tract of calves. *Livest Sci.* 178: 317-321.
- Burgain J, Gaiani C, Linder M, Scher J. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *J Food Eng.* 104: 467-483.

- Byrd JA, Hargis BM, Caldwell DJ, Bailey RH, Herron KL, McReynolds JL, Kubena LF. 2001. Effect of Lactic Acid Administration in the Drinking Water During Preslaughter Feed Withdrawal on *Salmonella* and *Campylobacter* Contamination of Broilers. *Poult Sci*, 80: 278-283.
- Byrd W, de Lorimier A, Zheng ZR, Cassels FJ. 2005. Microencapsulated subunit vaccine approach to enterotoxigenic *Escherichia coli* and other mucosal pathogens. *Adv. Drug Deliv Rev*. 57: 1362-1380.
- Bywater R, Deluyker H, Deroover E, Jong A, Marion H, McConville M, Rowan T, Shryock T, Shuster D, Thomas V, Valle M, Walters J. 2004. A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals. *J Antimicrob Chemother*. 54: 744–754.
- Campana R, Federici S, Ciandrini E, Baffone W. 2012. Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 on the growth and adhesion/invasion characteristics of human *Campylobacter jejuni*. *Curr Microbiol*. 64: 371-378.
- Capela P, Hay TKC, Shah NP. 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Res Int*. 39: 203-211.
- Casamayor EO, Pedrós-Alió C, Muyzer G, Amann R. 2002. Microheterogeneity in 16S ribosomal DNA-defined bacterial populations from a stratified planktonic environment is related to temporal changes and to ecological adaptations. *Appl Environ Microbiol*. 68: 1706-1714.
- Castagliuolo I, Galeazzi F, Ferrari S, Elli M, Brun P, Cavaggioni A, Tormen D, Sturniolo GC, Morelli L, Palù G. 2005. Beneficial effect of autoaggregating *Lactobacillus crispatus* on experimentally induced colitis in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 43: 197–204.
- Cean A, Stef L, Simiz E, Julean C, Dumitrescu G, Vasile A, Pet E, Drinceanu D, Corcionivoschi N. 2015. Effect of human isolated probiotic bacteria on preventing *Campylobacter jejuni* colonization of poultry. *Foodborne Pathog Dis*. 12: 122–130.
- Chai LC, Lee HY, Ghazali FM, Abu BF, Malakar PK, Nishibuchi M, Nakaguchi Y, Radu S. 2008. Simulation of cross-contamination and decontamination of *Campylobacter jejuni* during handling of contaminated raw vegetables in a domestic kitchen. *J. Food Prot*. 71: 2448-2452.

- Champagne CP, Gardner NJ, Soullignac L, Innocent JP. 2000. The production of freeze-dried immobilized cultures of *Streptococcus thermophilus* and their acidification properties in milk medium. *J Appl Microbiol.* 88: 124–31.
- Champagne CP, Gardner NJ. 2001. The effect of protective ingredients on the survival of immobilized cells of *Streptococcus thermophilus* to air and freeze-drying. *Electron J Biotechnol.* 4: 7-8.
- Champagne CP, Raymond Y, Tompkins TA. 2010. The determination of viable counts in probiotic cultures microencapsulated by spray-coating. *Food Microbiol.* 27: 1104-1111.
- Chandramouli V, Kailasapathy K, Peiris P, Jones M. 2004. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus spp.* in simulated gastric conditions. *J Microbiol Methods.* 56: 27-35.
- Chatre P, Haenni M, Meunier D, Botrel MA, Calavas D, Madec JY. 2010. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from cattle between 2002 and 2006 in France. *J Food Prot* 73: 825–831.
- Chaucheyras-Durand F, Walker ND, Bach A. 2008. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145: 5-26.
- Chaucheyras-Durand F, Durand H. 2010. Probiotics in animal nutrition and health. *Benef. Microbes.* 1: 3–9.
- Chaveerach P, Lipman LJA, van Knapen F. 2004. Antagonistic activities of several bacteria on in vitro growth of 10 strains of *Campylobacter jejuni/coli*. *Int J Food Microbiol.* 90: 43–50.
- Chen G, Wang W. 2007. Role of freeze drying in nanotechnology. *Dry Technol.* 25: 29-35.
- Chen MJ, Chen KN, Kuo YT. 2007. Optimal thermotolerance of *Bifidobacterium bifidum* in gellan–alginate microparticles. *Biotechnol Bioeng.* 98: 411-419.
- Chen T, Wang M, Jiang S, Xiong S, Zhu D, Wei H. 2011. Investigation of the microbial changes during koji-making process of Douchi by culture-dependent techniques and PCR-DGGE. *Int J Food Sci Tech.* 46: 1878-1883.
- Cheow WS, Hadinoto K. 2013. Biofilm-like *Lactobacillus rhamnosus* probiotics encapsulated in alginate and carrageenan microcapsules exhibiting enhanced thermotolerance and freeze-drying resistance. *Biomacromolecules.* 14: 3214-3222.

- Coates ME, Fuller R, Harrison GF, Lev M, Suffolk SF. 1963. Comparison of the growth of chicks in the Gustafsson germ-free apparatus and in a conventional environment, with and without dietary supplements of penicillin. *Br J Nutr.* 17: 141–153.
- Cole NA, Purdy CW, Hutcheson DP. 1992. Influence of yeast culture on feeder calves and lambs. *J Anim Sci.* 70: 1682-1690.
- Collado MC, Surono I, Meriluoto J, Salminen S. 2007. Indigenous dadih lactic acid bacteria: cell-surface properties and interactions with pathogens. *J Food Sci.* 72: 89–93.
- Collado MC, Meriluoto J, Salminen S. 2008. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *Eur Food Res Technol.* 226: 1065–1073.
- Coloe PJ, Bagust TJ, Ireland L. 1984. Development of the normal gastrointestinal microflora of specific pathogen-free chickens. *Epidemiol Infect.* 92: 79-87.
- Corry JE, Atabay HI. 2001. Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. *J Appl Microbiol.* 90: 96–114.
- Coulibaly I, Dubois-Dauphin R, Destain J, Fauconnier ML, Lognay G, Thonart P. 2010. The resistance to freeze-drying and to storage was determined as the cellular ability to recover its survival rate and acidification activity. *Int J Microbiol.* 2010: 1-9.
- Craven SE. 2000. Colonization of the intestinal tract by *Clostridium perfringens* and fecal shedding in diet-stressed and unstressed broiler chickens. *Poult Sci.* 79: 843–849.
- Crittenden R, Laitila A, Forssell P, Mättö J, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Myllärinen P. 2001. Adhesion of bifidobacteria to granular starch and its implications in probiotic technologies. *Appl Environ Microbiol.* 67: 3469-3475.
- Dahiya RS, Speck ML. 1968. Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on *Staphylococcus aureus*. *J Dairy Sci.* 51: 1569–1572
- Danzeisen JL, Kim HB, Isaacson RE, Tu ZJ, Johnson TJ. 2011. Modulations of the chicken cecal microbiome and metagenome in response to anticoccidial and growth promoter treatment. *Poult Sci.* 6: 278-283.
- Dayan N, Revivo D, Even L, Elkayam O, Glikman D. 2010. *Campylobacter* is the leading cause of bacterial gastroenteritis and dysentery in hospitalized children in the Western Galilee Region in Israel. *Epidemiol Infect.* 138: 1405-1406.
- De Araújo Etchepare M, Raddatz GC, Moraes Flores ÉM, Zepka LQ, Jacob-Lopes E, Barin JS, Ferreira Grosso CR, Menezes CR. 2016. Effect of resistant starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. *LWT- Food Sci Technol.* 65: 511-517.

- De Heinzelin J, Clark D, White T, Hart W, Renne P, Woldegabriel G, Beyene Y. 1999. Environment and Behavior of 2.5-Million-Year-Old Bouri Hominids Science. 284: 625-629.
- De Vos P, Faas MM, Spasojevic M, Sikkema J. 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. Int Dairy J. 20: 292-302.
- Del Panno MT, Morelli IS, Engelen B, Berthe-Corti L. 2005. Effect of petrochemical sludge concentrations on microbial communities during soil bioremediation. FEMS Microbiol Ecol. 53: 305-316.
- Demecková V, Kelly D, Coutts AGP, Brooks PH, 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.
- Dethlefsen L, Relman DA. 2011. Incomplete recovery individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. Proc Natl Acad Sci. 108: 4554–4561.
- Dianawati D, Shah NP. 2011. Survival, acid and bile tolerance, and surface hydrophobicity of microencapsulated *B. animalis ssp. lactis* Bb12 during storage at room temperature. J Food Sci. 76: 592-599.
- Dianawati D, Mishra V, Shah NP. 2012. Role of calcium alginate and mannitol in protecting *Bifidobacterium*. Appl Environ Microbiol. 78: 6914-6921.
- Dianawati D, Mishra V, Shah NP. 2013. Stability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Lactococcus lactis ssp. cremoris* during storage at room temperature at low aw. Food Res Int. 50: 259-265.
- Dianawati D, Mishra V, Shah NP. 2016. Survival of microencapsulated probiotic bacteria after processing and during storage: a review. Crit Rev Biotechnol. 56: 1685-1716.
- Dimitrellou D, Kandyli P, Kourkoutas Y. 2016. Effect of cooling rate, freeze-drying, and storage on survival of free and immobilized *Lactobacillus casei* ATCC 393. Food Sci Technol. 69: 468-473.
- Dobson A, Cotter PD, Ross PR, Hill C. 2012. Bacteriocin production: a probiotic trait Appl Environ Microbiol. 78: 1-6.
- Doleyres Y, Lacroix C. 2005. Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. Int Dairy J. 15: 973–988.

- Doyle MP, Roman DJ. 1982. Sensitivity of *Campylobacter jejuni* to drying. J Food Prot. 45: 507–510.
- Dolly P, Anishaparvin A, Joseph GS, Anandharamakrishnan C. 2011. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (mtcc 5422) by spray-freeze-drying method and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. J Microencapsul. 28: 568-574.
- Dykes GA, JW. Hastings. 1998. Fitness cost associated with class IIa bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* b73. Lett Appl Microbiol. 26: 5-8.
- Eckert E, Brown HE, Leslie KE, DeVries TJ, Steele MA. 2015. Weaning age affects growth, feed intake, gastrointestinal development, and behavior in Holstein calves fed an elevated plane of nutrition during the preweaning stage. J Dairy Sci. 98: 6315-6326.
- EFSA. 2007. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. EFSA J 5: 130.
- EFSA 2010. Scientific Opinion on Quantification of the risk posed by broiler meat to human Campylobacteriosis in the EU. EFSA J. 8: 1437.
- EFSA. 2013. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. EFSA J. 11: 3196.
- Engberg J, Aarestrup FM, Taylor DE, Gerner-Smidt P, Nachamkin I. 2001. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. Emerg Infect Dis. 7: 24-35.
- Englen MD, Hill AE, Dargatz DA, Ladely SR, Fedorka-Cray PJ. 2007. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* in US dairy cattle. J Appl Microbiol. 102: 1570-1577.
- Epps SV, Harvey RB, Byrd JA, Petrujkic BT, Sedej I, Beier RC, Phillips TD, Hume, ME. 2015. Comparative effect of thymol or its glucose conjugate, thymol-beta-D-glucopyranoside, on *Campylobacter* in avian gut contents. J Environ Sci Health. 50: 55-61.
- FAO/WHO. 2009. Risk assessment of *Campylobacter* spp. in broiler chickens: Interpretative Summary. Microbiological Risk Assessment Series. [http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/MRA11\\_En.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/MRA11_En.pdf)

- Fasoli S, Marzotto M, Rizzotti L, Rossi F, Dellaglio F, Torriani S. 2003. Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *Int J Food Microbiol.* 82: 59-70.
- 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. p 80-84.
- Fernández RD. 2013. Probióticos y salud humana Probiotics and human health. *Mediciego.* 19: 1-12.
- Fitzgerald C, Stanley K, Andrew S, Jones K. 2001. Use of pulsed-field gel electrophoresis and flagellin gene typing in identifying clonal groups of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in farm and clinical environments. *Appl Environ Microbiol.* 67: 1429-1436.
- Frizzo LS, Soto LP, Bertozzi E, Sequeira G, Martí LE, Rosmini MR. 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 Secc Cienc Vet.* 5: 69-80.
- Frizzo LS, Zbrun MV, Bertozzi E, Soto LP, Sequeira G, Martí E, Lajmanovich R, Rosmini MR. 2007. *Lactobacillus casei* DSPV 318T capacity to colonize and remain in mouse gastrointestinal tract. *J Anim Vet Adv.* 6: 1158-1166.
- Frizzo LS, Soto LP, Zbrun MV, Bertozzi E, Sequeira G, Armesto RR, Rosmini MR. 2010. Lactic acid bacteria to improve growth performance in young calves fed milk replacer and spray-dried whey powder. *Anim Feed Sci Technol.* 157: 159-167.
- Frizzo LS, Soto LP, Zbrun MV, Signorini ML, Bertozzi E, Sequeira G, Rodríguez Armesto R, Rosmini MR. 2011. Effect of lactic acid bacteria and lactose on growth performance and intestinal microbial balance of artificially reared calves. *Livest Sci* 140: 246-252.
- Frizzo LS, Soto LP, Bertozzi E, Zbrun MV, Signorini ML, Sequeira G, Rodriguez Armesto R, Rosmini MR. 2011. 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. *Anim Feed Sci Technol.* 170: 12-20.
- Frizzo LS, Astesana DM, Soto LP, Blajman JE, Zbrun MV, Signorini ML, Martí LE, Sequeira GJ, Rosmini MR. 2013. La seguridad en la cadena agroalimentaria de la carne:

problemáticas, estrategias y posibles soluciones pre-faena. FAVE Secc Cienc Agrar. 12: 35-54.

- Fuller R. 1989 Probiotics in man and animal. J Appl Bacteriol. 66: 365-378.
- Gaggia F, Di Gioia D, Baffoni L, Biavati B. 2011. The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact in food safety. Trends Food Sci Technol. 22: 58-66.
- Galvão KN, Santos JE, Coscioni A, Villaseñor M, Sisco WM, Berge ACB. 2005. Effect of feeding live yeast products to calves with failure of passive transfer on performance and patterns of antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli*. Reprod Nutr Dev. 45: 427-440.
- Garcia MM, Lior H, Stewart RB, Ruckerbauer GM, Trudel JRR, Skljarevski A. 1985. Isolation, characterization and serotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from slaughter cattle. Appl Environ Microbiol. 49: 667-672.
- Gbassi GK, Vandamme T, Ennahar S, Marchioni E. 2009. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. Int J Food Microbiol. 129: 103-105.
- Geigerová M, Vlková E, Bunešová V, Rada V. 2016. Persistence of *bifidobacteria* in the intestines of calves after administration in freeze-dried form or in fermented milk. Czech J Anim Sci. 61: 49-56.
- Gentile FT, Doherty EJ, Rein DH, Shoichet MS, Winn SR. 1995. Polymer science for macroencapsulation of cells for central nervous system transplantation. React Polym. 25: 207-227.
- Ghareeb K, Awad WA, Mohnl M, Porta R, Biarnes M, Böhm J, Schatzmayr G. 2012. Evaluating the efficacy of an avian-specific probiotic to reduce the colonization of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. Poult Sci. 91: 1825-1832.
- Gharib Naseri K, Rahimi S, Khaki P. 2012. Comparison of the effects of probiotic, organic acid and medicinal plant on *Campylobacter jejuni* challenged broiler chickens. J Agric Sci Technol. 14: 1485-1496.
- Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML, Gopal PK. 2001. Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. Am J Clin Nutr. 74: 833-839.
- Gilliss D, Cronquist AB, Cartter M, Tobin-D'Angelo M, Blythe D, Smith K, Lathrop S, Zansky S, Cieslak PR, Dunn J, Holt KG, Lance S, Crim SM, Henao OL, Patrick M,

Griffin PM, Tauxe RV. 2013. Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food-foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. sites, 1996-2012. *Morb Mortal Wkly Rep.* 62: 283-287.

- Gong J, Forster RJ, Yu H, Chambers JR, Sabour PM, Wheatcroft R, Chen S. 2002. Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. *FEMS Microbiol. Lett.* 208: 1-7.
- Gong J, Yu H, Liu T, Gill JJ, Chambers JR, Wheatcroft R, Saviour PM. 2008. Effects of zinc bacitracin, bird age and access to range on bacterial microbiota in the ileum and caeca of broiler chickens. *J Appl Microbiol.* 104: 1372-1382.
- Gouin S. 2004. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends Food Sci Technol.* 15: 330-347.
- Griffin PM, Tauxe RV. 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev.* 13: 60-98.
- Grundmann H, Hori S, Tanner G. 2001. Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. *J Clin Microbiol.* 39: 4190-4192.
- Guedes CM, Gonçalves D, Rodrigues MAM, Dias-Da-Silva A. 2008. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* yeast on ruminal fermentation and fibre degradation of maize silages in cows. *Anim Feed Sci Technol.* 14: 27-40.
- Gustavsson J, Cederberg CH, Sonesson U, Van Otterdijk R, Meybeck A. 2012. Pérdidas y desperdicios de alimentos en el mundo. Alcances, causas y prevención. Roma, FAO. ISBN 978-92-5-307205-7.
- Haan CP, Kivisto R, Hakkinen M, Rautelin H, Hanninen ML. 2010. Decreasing trend of overlapping multilocus sequence types between human and chicken *Campylobacter jejuni* isolates over a decade in Finland. *Appl Environ Microbiol.* 76: 5228-5236.
- Havelaar AH, Van Koningsveld R, Van kempen E. 2000. Health burden in the Netherlands due to infection with thermophilic *Campylobacter spp.* *Epidemiol Infect.* 125: 505-522.
- Havelaar AH, van Pelt W, Ang CW, Wagenaar JA, van Putten JP, Gross U, Newell DG. 2009. Immunity to *Campylobacter*: its role in risk assessment and epidemiology. *Crit Rev Microbiol.* 35: 1-22.

- Havelaar AH, Ivarsson S, Lofdahl M, Nauta MJ. 2013. Estimating the true incidence of campylobacteriosis and salmonellosis in the European Union, 2009. *Epidemiol Infect* 141: 293-302.
- Hawrelak JA, Myers SP. 2004. The causes of intestinal dysbiosis: a review. *Altern Med Rev*. 9: 180-197.
- Heidebach T, Först P, Kulozik U. 2009. Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocoll*. 23: 1670-1677.
- Heidebach T, Först P, Kulozik U. 2010. Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. *J Food Eng*. 98: 309-316.
- Heidebach T, Först P, Kulozik U. 2012. Microencapsulation of probiotic cells for food applications. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 52: 291-311.
- Heinrichs AJ, Jones CM, Heinrichs BS. 2003. Effects of mannan oligosaccharide or antibiotics in neonatal diets on health and growth of dairy calves. *J Dairy Sci*. 86: 4064-4069.
- Helmy YA, Kassem II, Kumar A, Rajashekara G. 2017. *In Vitro* Evaluation of the Impact of the Probiotic *E. coli* Nissle 1917 on *Campylobacter jejuni*'s Invasion and Intracellular Survival in Human Colonic Cells. *Front Microbiol*. 8: 1-10.
- Hermans D, Martel A, Van Deun K, Verlinden M, Van Immerseel F, Garmyn A, Messens W, Heyndrickx M. 2010. Intestinal mucus protects *Campylobacter jejuni* in the ceca of colonized broiler chickens against the bactericidal effects of medium-chain fatty acids. *Poult Sci*. 89: 1144-1155.
- Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson, GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. 2014. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 11: 506-514.
- Hoffmann S, Batz MB, Morris JG Jr. 2012. Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. *J Food Prot*. 75: 1292-1302.
- Holkem AT, Raddatz GC, Nunes GL, Cichoski AJ, Jacob-Lopes E, Grosso CRF, De Menezes CR. 2016. Development and characterization of alginate microcapsules containing *Bifidobacterium* BB-12 produced by emulsification/internal gelation followed by freeze drying. *LWT-Food Sci Technol*. 71: 302-308.

- Horrocks SM, Anderson RC, Nisbet DJ, Ricke SC. 2009. Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. *Anaerobe*. 15: 18-25.
- Huang S, Vignolles M, Chen X, Le Loir Y, Jan G, Schuck P, Jeantet R. 2017. Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends Food Sci Technol*. 63: 1-17.
- Hubálek Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. 46: 205-229.
- Hugenholtz J. 1993. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 12: 165-178.
- Humphrey T, O'Brien S, Madsen M. 2007. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. *Int J Biol Macromol*. 117: 237-257.
- Hyndman CL, Groboillot AF, Poncelet D, Champagne CP, Neufeld RP. 1993. Microencapsulation of *Lactococcus lactis* within cross-linked gelatin membranes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 56: 259-263.
- ICMSF 1998. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Campylobacter*. Microorganismos de los alimentos. Características de los patógenos microbianos, 55-76. Zaragoza: Acribia, S.A.
- Inglis GD, Kalischuk LD, Busz HW. 2003. A survey of *Campylobacter* species shed in faeces of beef cattle using polymerase chain reaction. *Can J Microbiol*. 49: 655-661.
- Ishikawa H, Akedo I, Umesaki Y, Tanaka R, Imaoka A, Otani T. 2003. Randomized controlled trial of the effect of bifidobacteria fermented milk on ulcerative colitis. *J Am Coll Nutr*. 22: 56-63.
- Jagannath A, Raju PS, Bawa AS. 2010. Comparative evaluation of bacterial cellulose (nata) as a cryoprotectant and carrier support during the freeze drying process of probiotic lactic acid bacteria. *LWT-Food Sci Technol*. 43: 1197-1203.
- Jankovic I, Ventura M, Meylan V, Rouvet M, Elli M, Zink R. 2003. Contribution of aggregation-promoting factor to maintenance of cell shape in *Lactobacillus gasseri* 4B2. *J Bacteriol*. 185: 3288-3296.
- Jay JM. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ Microbiol*. 44: 525-531.
- Jenny BF, Vandijk HJ, Collins JA. 1991. Performance and fecal flora of calves fed a *Bacillus subtilis* concentrate. *J Dairy Sci*. 74: 1968-1973.

- Jensen H, Roos S, Jonsson H, Rud I, Grimmer S, van Pijkeren JP, Britton RA, Axelsson L. 2014. Role of *Lactobacillus reuteri* cell and mucus-binding protein A (CmbA) in adhesion to intestinal epithelial cells and mucus *in vitro*. *Microbiology*. 160: 671-681.
- Pranteda M, L Jiménez. 2011. Microorganismos probióticos encapsulados en polímeros microbianos: Evaluación de la capacidad protectora de la encapsulación para su administración oral. Facultad de Farmacia, Ed. Universidad de Granada, Granada, España.
- John RP, Tyagi RD, Brar SK, Surampalli RY, Prevost D, 2011. Bioencapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. *Crit Rev Biotechnol*. 31: 211-226.
- Johnson TJ, Shank JM, Johnson JG. 2017. Current and potential treatments for reducing *Campylobacter* colonization in animal hosts and disease in humans. *Front Microbiol*. 8: 1-10.
- Jones FS, Orcutt M, Little RB. 1931. Vibrios (*Vibrio jejuni*, n. sp.) associated with intestinal disorders of cows and calves. *J Exp Med*. 53: 853-863.
- Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell HM, Man SM. 2015. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clin Microbiol Rev*. 28: 687-720.
- Kanmani P, Kumar RS, Yuvaraj N, Paari KA, Pattukumar V, Arul V. 2011a. Cryopreservation and microencapsulation of a probiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastrointestinal conditions. *Biotechnol Bioprocess Eng*. 16: 1106-1114.
- Kanmani P, Satish Kumar R, Yuvaraj N, Paari KA, Pattukumar VA, Venkatesan A. 2011b. Effect of cryopreservation and microencapsulation of lactic acid bacterium *Enterococcus faecium* MC13 for long-term storage. *Biochem Eng J*. 58: 140-147.
- Kapperud G, Skjerve E, Bean NH, Ostroff SM, Lassen J. 1992. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infections: results of a case-control study in southeastern Norway. *J Clin Microbiol*. 30: 3117-3121.
- Kassem II, Kehinde O, Helmy YA, Pina-Mimbela R, Kumar A, Chandrashekhar K, Rajashekara G. 2016. *Campylobacter* in poultry: The conundrums of highly adaptable and ubiquitous foodborne pathogens. *Foodborne Diseases Case Studies of Outbreaks in the Agri-Food Industries*. 79-112.
- Kendall ME, Crim S, Fullerton K, Han PV, Cronquist AB, Shiferaw B, Ingram LA, Rounds J, Mintz ED, Mahon BE. 2012. Travel-associated enteric infections diagnosed

after return to the United States, Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), 2004–2009. *Clin Infect Dis.* 54: 480–487.

- Kets E, Teunissen P, De Bont J. 1996. Effect of compatible solutes on survival of Lactic Acid bacteria subjected to drying. *Appl Environ Microbiol.* 62: 259-261.
- Khem S, Small DM, May BK. 2016. The behaviour of whey protein isolate in protecting *Lactobacillus plantarum*. *Food Chem.* 190: 717-723.
- Kitazawa H, Ueha S, Itoh S, Watanabe H, Konno K, Kawai Y, Saito T, Itoh T, Yamaguchi T. 2001. AT oligonucleotides inducing B lymphocyte activation exist in probiotic *Lactobacillus gasseri*. *Int J Food Microbiol.* 10: 149-162.
- Kittl S, Heckel G, Korczak BM, Kuhnert P. 2013. Source attribution of human *Campylobacter* isolates by MLST and Fla-Typing and association of genotypes with quinolone resistance. *PloS one.* 8: 1-11.
- Klaenhammer TR. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochemie.* 70: 337-349.
- Kleessen B, Stoof G, Proll J, Schmiedl D, Noack J, Blaut M. 1997. Feeding resistant starch affects fecal and cecal microflora and short-chain fatty acids in rats. *J Anim Sci.* 75: 2453-2462.
- Klein-Jöbstl D, Sofka, D, Iwersen M, Drillich M, Hilbert F. 2016. Multilocus sequence typing and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* Isolated from Dairy Calves in Austria. *Front Microbiol.* 7: 72-80.
- Knarreborg A, Simon MA, Engberg RM, Jensen BB, Tannock GW. 2002. Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. *Appl Environ Microbiol.* 68: 5918-5924.
- Knorr D. 1998. Technology aspects related to microorganisms in functional foods. *Trends Food Sci Technol.* 9: 295-306.
- Kobierecka PA, Wszyńska AK, Aleksandrak-Piekarczyk T, Kuczkowski M, Tuzimek A, Piotrowska W, Górecki A, Adamska I, Wieliczko A, Bardowski J, Jagusztyn-Krynicka EK. 2017. *In vitro* characteristics of *Lactobacillus spp.* strains isolated from the chicken digestive tract and their role in the inhibition of *Campylobacter* colonization. *MicrobiologyOpen.* 6: 1-15.
- Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *Int Dairy J.* 13: 3-13.

- Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *Int Dairy J.* 14: 737-743.
- Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth HC. 2006. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT-and conventionally treated milk during storage. *LWT-Food Sci Technol.* 39: 177-183.
- Kurzak P, Ehrmann MA, Vogel R. 1998. Diversity of lactic acid bacteria associated with ducks. *Syst Appl Microbiol.* 21: 588-592.
- Lam KM, DaMassa AJ, Morishita TY, Shivaprasad HL, Bickford AA. 1992. Pathogenicity of *Campylobacter jejuni* for turkeys and chickens. *Avian Dis.* 359-363.
- Larrosa-Haro A, Macias-Rosales R, Sanchez-Ramirez CA, Cortes-Lopez MC, Aguilar-Benavides S. 2010. Seasonal variation of enteropathogens in infants and preschoolers with acute diarrhea in western Mexico. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 51:534-536.
- Lee KY, Heo TR. 2000. Survival of *Bifidobacterium longum* Immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. *Appl Environ Microbiol.* 66: 869-873.
- Lee JS, Cha DS, Park HJ. 2004. Survival of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in chitosan-coated calcium alginate microparticles. *J Agric Food Chem.* 52: 7300-7305.
- Lehri B, Seddon AM, Karlyshev AV. 2017. *Lactobacillus fermentum* 3872 as a potential tool for combatting *Campylobacter jejuni* infections. *Virulence*, 8: 1753-1760.
- Lejeune JT, Wetzel AN. 2007. Preharvest control of *Escherichia coli* O157 in cattle. *J Anim Sci.* 85: 73–80.
- Li J, Ren F, Gu H, Li X, Gan B. 2011. Safety evaluation in vitro of *Enterococcus durans* from Tibetan traditional fermented yak milk. *J Microbiol.* 49: 721-728.
- Lian WC, Hsiao HC, Chou CC. 2003. Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *Int J Microbiol.* 86: 293-301.
- Line J, Hiatt K, Conlan A. 2008. Comparison of challenge models for determining the colonization dose of *Campylobacter jejuni* in broiler chicks. *Poult Sci.* 87: 1700-1706.
- Liu P, Piao XS, Kim SW, Wang L, Shen YB, Lee HS, Li SY. 2008. Effects of chito-oligosaccharide supplementation on the growth performance, nutrient digestibility, intestinal morphology, and fecal shedding of and in weaning pigs. *J Anim Sci.* 86: 2609-2618.

- Livney YD. 2010. Milk proteins as vehicles for bioactives. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 15: 73-83.
- Lopez-Rubio A, Gavara R, Lagaron JM. 2006. Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials. *Trends Food Sci Technol* 17: 567-575.
- Luangtongkum T, Jeon B, Han J, Plummer P, Logue CM, Zhang Q. 2009. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. *Future Microbiol.* 4: 189-200.
- Lucas L, Vilca L, Ramos D. 2013. Presencia de *Campylobacter spp.* en canales y ciegos de pollos de engorde en Lima, Perú. *Rev Inv Vet Perú.* 24: 346-352.
- Luechtfeld NW, Wang WLL, Blaser MJ. 1981. Evaluation of transport and storage techniques for isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from turkey fecal samples. *J Clin Microbiol.* 13: 438-443.
- Lukáš F, Koppová I, Kudrna V, Kopečný J. 2007. Postnatal development of bacterial population in the gastrointestinal tract of calves. *Folia Microbiol.* 52: 99-104.
- Mandal S, Hati S, Puniya AK, Khamrui K, Singh K. 2014. Enhancement of survival of alginate-encapsulated *Lactobacillus casei* NCDC 298. *J Sci Food Agric.* 94: 1994-2001.
- Mantovani HC, Russel JB. 2001. Nisin resistance of *Sreptococcus bovis*. *Appl Environ Microbiol* 67: 808-813.
- Manual Merck de Veterinaria. 2000. 5Ed en español. Grupo Editorial Océano. Madrid España. P 150-152.
- Marden JP, Julien C, Monteils V, Auclair E, Moncoulon R, Bayourthe C. 2008. How does live yeast differ from sodium bicarbonate to stabilize ruminal pH in high- yielding dairy cows? *J Dairy Sci.* 91: 3528-3535.
- Marianelli C, Cifani N, Pasquali P. 2010. Evaluation of antimicrobial activity of probiotic bacteria against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhimurium* 1344 in a common medium under different environmental conditions. *Curr Res Microbiol Biotechnol.* 161: 673-680.
- Martín MJ, Lara-Villoslada F, Ruiz MA, Morales ME. 2015. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 27: 15-25.
- Martin-Dejardin F, Ebel B, Lemetais G, Minh HNT, Gervais P, Cachon R, Chambin O. 2013. A way to follow the viability of encapsulated *Bifidobacterium bifidum* subjected

to a freeze-drying process in order to target the colon: Interest of flow cytometry. Eur J Pharm Sci. 49: 166-174.

- Maslowski KM, Mackay CR. 2011. Diet, gut microbiota and immune responses. Nat Immunol. 12: 5-9.
- Mason J, Iturriza-Gomara M, O'Brien SJ, Ngwira BM, Dove W, Maiden MC, Cunliffe NA. 2013. *Campylobacter* infection in children in Malawi is common and is frequently associated with enteric virus co-infections. PLoS One 8: 1-5.
- Meunier M, Guyard-Nicodème M, Dory D, Chemaly M. 2016. Control strategies against *Campylobacter* at the poultry production level: biosecurity measures, feed additives and vaccination. J Appl Microbiol. 120: 1139-1173.
- Meyer PM, Vaz Pires A, Vagadlo AR, Correia De Simas JM, Susin I. 2001. Adição de probiótico ao leite integral ou sucedâneo e desempenho de bezerros da raça holandesa. Sci Agric. 58: 215-221.
- Miao S, Mills S, Stanton C, Fitzgerald GF, Roos Y, Ross RP. 2008. Effect of disaccharides on survival during storage of freeze dried probiotics. Dairy Sci Technol. 88: 19-30.
- Ming LC, Rahim RA, Wan HY, Ariff AB. 2009. Formulation of protective agents for improvement of *Lactobacillus salivarius* I 24 survival rate subjected to freeze drying for production of live cells in powderized form. Food Bioprocess Tech. 2: 431-441.
- Minihan D, Whyte P, O'Mahony M, Fanning S, McGill K, Collins JD. 2004. *Campylobacter* spp. in Irish Feedlot Cattle: A Longitudinal Study Involving Pre-harvest and Harvest Phases of the Food Chain. Zoonoses Public Hlth. 51: 28-33.
- Ministerio de salud. Presidencia de la Nación Argentina. 2016. Boletín Integrado de Vigilancia. [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/boletin\\_integrado\\_vigilancia\\_n340-se51.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/boletin_integrado_vigilancia_n340-se51.pdf)
- Moallem U, Werner D, Lehrer H, Zachut M, Livshitz L, Yakoby S, Shamay A. 2010. Long-term effects of ad libitum whole milk prior to weaning and prepubertal protein supplementation on skeletal growth rate and first-lactation milk production. J Dairy Sci. 93: 2639-2650.
- Mohammadi SA, Prasanna BM. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and considerations. Crop science. 43: 1235-1248.

- Mokhber-Dezfouli MR, Tajik P, Bolourchi M, Mahmoudzadeh H. 2007. Effects of probiotics supplementation in daily milk intake of newborn calves on body weight gain, body height, diarrhea occurrence and health condition. *Pak J Biol Sci.* 10: 3136-3140.
- Moore JE, Corcoran D, Dooley JSG, Fanning S, Lucey B, Matsuda M, McDowell DA, Mégraud F, Millar BC, O'mahony R, O'riordan L, O'rourke M, Rao JR, Rooney PJ, Sails A, Whyte P. 2005. *Campylobacter*. *Vet Res.* 36: 351-382.
- Moore JE, Barton MD, Blair IS, Corcoran D, Dooley JS, Fanning S, Kempf I, Lastovica AJ, Lowery CJ, Matsuda M, McDowell DA, Mc-Mahon A, Millar BC, Rao JR, Rooney PJ, Seal BS, Snelling WJ, Tolba O. 2006. The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. *Microbes Infect.* 8: 1955-1966.
- Mora A, Herrera A, Mamani R, López C, Alonso MP, Blanco JE, Blanco M, Dahbi G, García-Garrote F, Pita JM, Coira A, Bernárdez MI, Blanco J. 2010. Recent emergence of clonal group O25b:K1:H4-B2-ST131 *ibeA* strains among *Escherichia coli* poultry isolates, including CTX-M-9-producing strains, and comparison with clinical human isolates. *Appl Environ Microbiol.* 76: 6991-6997.
- Morishita TY, Aye PP, Harr BS, Cobb CW, Clifford JR. 1997. Evaluation of an avian-specific probiotic to reduce the colonization and shedding of *Campylobacter jejuni* in broilers. *Avian Dis.* 850-855.
- Mortazavian AM, Ehsani MR, Mousavi SM, Rezaei K, Sohrabvandi S, Reinheimer JA. 2007. Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic microorganisms in yogurt. *Int J Dairy Technol.* 60: 123-127.
- Mortazavian AM, Ehsani MR, Azizi A, Razavi SH, Mousavi SM, Sohrabvandi S, Reinheimer JA. 2008. Viability of calcium-alginate-microencapsulated probiotic bacteria in Iranian yogurt drink (Doogh) during refrigerated storage and under simulated gastrointestinal conditions. *Aust J Dairy Technol.* 63: 25-30.
- Mughini Gras L, Smid JH, Wagenaar JA, de Boer AG, Havelaar AH, Friesema IH. 2012. Risk factors for campylobacteriosis of chicken, ruminant, and environmental origin: a combined case-control and source attribution analysis. *PLoS ONE* 7: 1-10.
- Mukherjee P, Ramamurthy T, Bhattacharya MK, Rajendran K, Mukhopadhyay AK. 2013. *Campylobacter jejuni* in hospitalized patients with diarrhea, Kolkata, India. *Emerg Infect Dis* 19: 1155-1156.
- Mulder RWA, Havenaar R, Huis JHJ. 1997. Intervention strategies: the use of probiotics and competitive exclusion microfloras against contamination with pathogens

in pigs and poultry. Probiotics 2. Application and Practical Aspects, R. Fuller Ed. Londres, Chapman and Hall, p 187-207

- Muñoz J. 2003. Bacteriocinas: una estrategia de competencia microbiana propuesta como alternativa de antibióticos dirigidos para el futuro humano. Programa de Ecología Molecular y Microbiana, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Disponible desde URL: [www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO\\_03/Capitulo03.pdf](http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_03/Capitulo03.pdf).
- Muthukumarasamy P, Allan-Wojtas P, Holley RA. 2006. Stability of *Lactobacillus reuteri* in different types of microcapsules. J Food Sci. 71: 20-24.
- Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial population by DGGE analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol. 62: 2676-2680.
- Nachamkin I. Blases MJ. 1995. *Campylobacter*, 2nd Edition. ASM Press. p 511-528.
- Ndoye B, Weekers F, Diawara B, Guiro AT, Thonart P. 2007. Survival and preservation after freeze-drying process of thermoresistant acetic acid bacteria isolated from tropical products of Sub-Saharan Africa. J Food Eng. 79: 1374-1382.
- Neal-McKinney JM, Lu X, Duong T, Larson CL, Call DR, Shah DH, Konkel ME. 2012. Production of organic acids by probiotic *lactobacilli* can be used to reduce pathogen load in poultry. Plos One. 7:1-11.
- Nei M, Li WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc Natl Acad Sci. 76: 5269-5273.
- Netherwood T, Gilbert HJ, Parker DS, O'donnell AG. 1999. Probiotics shown to change bacterial community structure in the avian gastrointestinal tract. Appl Environ Microbiol. 65: 5134-5138.
- Nielsen EM, Engberg J, Fussing V, Petersen L, Brogren C.H. 2000. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry, and cattle. J Clin Microbiol. 38: 3800-3810.
- Nishiyama K, Seto Y, Yoshioka K, Kakuda T, Takai S, Yamamoto Y, Mukai T. 2014. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 reduces infection by and colonization of *Campylobacter jejuni*. Plos One. 9: 1-9.
- Noori M, Alikhani M, Jahanian R. 2016. Effect of partial substitution of milk with probiotic yogurt of different pH on performance, body conformation and blood biochemical parameters of Holstein calves. J Appl Anim Res. 44: 221-229.

- Novik GI, Samartsev AA, Astapovich NI, Kavrus MA, Mikhalyuk AN. 2006. Biological activity of probiotic microorganisms. *Appl Biochem Micro.* 42: 166-172.
- Nualkaekul S, Lenton D, Cook MT, Khutoryanskiy VV, Charalampopoulos D. 2012. Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in pomegranate juice. *Carbohydr Polym.* 90: 1281-1287.
- Nugent AP. 2005. Health properties of resistant starch. *Nutr Bull.* 30: 27-54.
- Ogawa T, Asai Y, Tamai R, Makimura Y, Sakamoto H, Hashikawa S, Yasuda K. 2006. Natural killer cell activities of synbiotic *Lactobacillus casei* ssp. *casei* in conjunction with dextran. *Clin Exp Immunol.* 143: 103-109.
- OMS. 2002. Estrategia global de la OMS sobre inocuidad de los alimentos: Alimentos más sanos para una salud mejor. Ginebra. OMS. <http://www.who.int/iris/handle/10665/42705>
- ONU. 2012. El futuro que queremos: los alimentos. Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo Sostenible, 20 al 22 de junio. Río de Janeiro, ONU. [https://rio20.un.org/sites/rio20.un.org/files/a-conf.216-1-1\\_spanish.pdf](https://rio20.un.org/sites/rio20.un.org/files/a-conf.216-1-1_spanish.pdf)
- Ouwehand AC, Vesterlund S. 2004. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. *Food Sci Technol.* 139: 375-396.
- Osacar G. 2008. El sistema de crianza y el bienestar animal ¿estarán cómodos mis temeros? 2008. *Rev Prod Anim.* [http://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_bovina\\_de\\_leche/cria\\_artificial/119-comodos.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_bovina_de_leche/cria_artificial/119-comodos.pdf)
- Ozawa K, Yabu-Uchi K, Yamanaka K, Yamashita Y, Nomura S, Oku I. 1983. Effect of *Streptococcus faecalis* BIO-4R on intestinal flora of weanling piglets and calves. *Appl Environ Microbiol.* 45: 1513-1518.
- OzFoodNet Working Group. 2009. Monitoring the incidence and causes of diseases potentially transmitted by food in Australia: annual report of the OzFoodNet network, 2008. *Commun Dis Intell Q Rep.* 33: 389-413.
- OzFoodNet Working Group. 2012. Monitoring the incidence and causes of diseases potentially transmitted by food in Australia: annual report of the OzFoodNet network, 2010. *Commun Dis Intell Q Rep.* 36: 213-241.
- Pasteris SE, Pingitore EV, Ale CE, Nader-Macías MEF. 2014. Characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* CRL 1584 isolated from a *Lithobates catesbeianus* hatchery. *World J Microbiol Biotechnol.* 30: 1053-1062.

- Pérez-Leonard H, Bueno-García G, Brizuela-Herrada MA, Tortoló-Cabañas K, Gastón-Peña C. 2013. Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos. ICIDCA. 47: 14-25.
- Peterson MC. 2003. *Campylobacter jejuni* enteritis associated with consumption of raw milk. J Environ Health. 65: 20-21.
- Peterson RE, Klopfenstein TJ, Erickson GE, Folmer J, Hinkley S, Moxley RA, Smith DR. 2007. Effect of *Lactobacillus acidophilus* strain NP51 on *Escherichia coli* O157:H7 fecal shedding and finishing performance in beef feedlot cattle. J Food Prot. 70: 287-291.
- Picot A, Lacroix C. 2004. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. Int Dairy J. 14: 505-515.
- Radostits O, Gay C, Blood D, Hinchcliff K. 2002 Enfermedades causadas por bacterias-V. Medicina Veterinaria; tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. 9ª Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España, p 1145-1147.
- Reid AA, Vuilleumard JC, Britten M, Arcand Y, Farnworth E, Champagne CP. 2005. Microentrapment of probiotic bacteria in a Ca<sup>2+</sup>-induced whey protein gel and effects on their viability in a dynamic gastro-intestinal model. J Microencapsul. 22: 603-619.
- Reis CP, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. 2006. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. Nanomed Nanotech Biol Med. 2: 8-21.
- Reis JA, Paula AT, Casarotti SN, Penna ALB. 2012. Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. Food Eng Rev. 4: 124-140.
- Riddell JB, Gallegos AJ, Harmon DL, McLeod KR. 2010. Addition of a *Bacillus* based probiotic to the diet of preruminant calves: Influence on growth, health, and blood parameters 1, 2, 3. Intern J Appl Res Vet Med. 8: 80-85.
- Rincker LD, VandeHaar MJ, Wolf CA, Liesman JS, Chapin LT, Nielsen MW. 2011. Effect of intensified feeding of heifer calves on growth, pubertal age, calving age, milk yield, and economics. J Dairy Sci. 94: 3554-3567.
- Rinne M, Kalliomaki M, Arvilommi H, Salminen S, Isolauri E. 2005. Effect of probiotics and breastfeeding on the *bifidobacterium* and *lactobacillus/enterococcus* microbiota and humoral immune responses. J Pediatr. 147: 186-191.

- Robyn J, Rasschaert G, Hermans D, Pasmans F, Heyndrickx M. 2013. Is allicin able to reduce *Campylobacter jejuni* colonization in broilers when added to drinking water? *Poult Sci.* 92: 1408-1418.
- Robyn J, Rasschaert G, Hermans D, Pasmans F, Heyndrickx M. 2013. *In vivo* broiler experiments to assess anti-*Campylobacter jejuni* activity of a live *Enterococcus faecalis* strain. *Poult Sci.* 92: 265-271.
- Rogelj I, Matijas BB, Majhenic AC, Stojkovic S. 2002. The survival and persistence of *Lactobacillus acidophilus* LF221 in different ecosystems. *Int J Food Microbiol.* 76: 83-91.
- Rokka S, Rantamäki P. 2010. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *Eur Food Res Technol.* 231: 1-12.
- Rosmini MR, Sequeira G, Guerrero Legarreta I, Marti L, Dalla Santina R, Frizzo L, Bonazza JC. 2004. Producción de probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. *Rev Mex Ing Qca.* 3: 187-197.
- Ross RP, Desmond C, Fitzgerald GF, Stanton C. 2005. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *J Appl Microbiol.* 98: 1410-1417.
- Rossler E. 2014. Presencia de *Campylobacter* termotolerantes en la cadena cárnica aviar: evaluación de los perfiles de resistencia frente a antimicrobianos y estimación de la proporción de *C. jejuni* potencialmente asociados al Síndrome de Guillain-Barré. Universidad Nacional del Litoral. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Tesina.
- Saint-Cyr MJ, Haddad N, Taminiou B, Poezevara T, Quesne S, Amelot M, Daube G, Chemaly M, Dousset X, Guyard-Nicodème M. 2017. Use of the potential probiotic strain *Lactobacillus salivarius* SMXD51 to control *Campylobacter jejuni* in broilers. *Int J Food Microbiol.* 247: 9-17.
- Sajilata M., Rekha S., Singhal, and Pushpa R. 2006. Resistant Starch, A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 8: 1-17.
- Sanderson GR. 1981. Polysaccharides in foods. *Food Technol.* 7: 50-57.
- Santander J, Kilbourne J, Park JY, Martin T, Loh A, Diaz I, Rojas R, Segovia C, De Nardo D, Curtiss R. 2014. Inflammatory effects of Edwardsiella ictaluri lipopolysaccharide modifications in catfish gut. *Infect Immun.* 82: 3394-3404.

- Santini C, Baffoni L, Gaggia F, Granata M, Gasbarri R, Di Gioia D, Biavati, B. 2010. Characterization of probiotic strains: an application as feed additives in poultry against *Campylobacter jejuni*. Int J Food Microbiol. 141: 98-108.
- Sashiwa H, Aiba SI. 2004. Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials. Prog Polym Sci. 29: 887-908.
- Savini M, Cecchini C, Verdenelli MC, Silvi S, Orpianesi C, Cresci A. 2010. Pilot-scale production and viability analysis of freeze-dried probiotic bacteria using different protective agents. Nutrients. 2: 330-339.
- Schamberger GP, Ronald L, Phillips RL, Jennifer L, Jacobs JL, Diez-Gonzalez F, 2004. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 populations in cattle by addition of colicin E7-producing *E. coli* to feed. Appl Environ Microbiol. 70: 6053-6060.
- Schillinger U, Lücke FK. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl Environ Microbiol. 55: 1901-1906.
- SENASA 2015. Resolución 294/2015 <http://www.senasa.gov.ar/senasa-comunica/noticias/nuevas-pautas-tecnicas-para-la-elaboracion-de-productos-destinados-la-alimentacion-de-animales>.
- Servin AL 2004. Antagonistic activity of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. FEMS Microbiol Rev. 28: 405-440.
- Shiba T, Aiba Y, Ishikawa H, Ushiyama A, Takagi A, Mine T. 2003. The suppressive effect of bifidobacteria on *Bacteroides vulgatus*, a putative pathogenic microbe in inflammatory bowel disease. Microbiol Immunol. 47: 371-378.
- Shoji AS, Oliveira AC, Balieiro JCC, Freitas O, Thomazini M, Heinemann RJB, Okuro PK, Favaro-Trindade CS. 2013. Viability of *L. acidophilus* microcapsules and their application to buffalo milk yoghurt. Food Bioprod Process. 91: 83-88.
- 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.
- Simpson JM, Martineau B, Jones WE, Ballam JM, Mackie RI. 2002. Characterization of fecal bacterial populations in canines: effects of age, breed and dietary fiber. Microb Ecol. 44: 186-197.
- Skirrow MB. 1991: Epidemiology of *Campylobacter* enteritis. Int J Food Microbiol. 12: 9-16.

- Solanki HK, Pawar DD, Shah DA, Prajapati VD, Jani GK, Mulla AM, Thakar PM. 2013. Development of microencapsulation delivery system for long-term preservation of probiotics as biotherapeutics agent. *Biomed Res.* 2013: 1-21.
- Soto LP, Frizzo LS, Bertozzi E, Bonazza JC, Sequeira G, Martí E, Rosmini MR. Aislamiento de ADN a partir de materia fecal de terneros lactantes para la obtención de amplicones del 16S rRNA del ecosistema bacteriano. VI Jornadas de Comunicaciones Técnico-Científicas de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL, 16, 17 y 18 de junio de 2005. p 37.
- Soto LP, Frizzo LS, Bertozzi E, Diaz A, Martí LE, Dalla Santina R, Sequeira GJ, Rosmini MR. 2009. Milk evaluation as growth and cold preservation medium of a probiotic inoculum for young calves. *J Anim Vet Adv.* 8: 1353-1360.
- Soto LP, Frizzo LS, Avataneo E, Zbrun MV, Bertozzia E, Sequeira G, Signorini ML, Rosmini MR. 2011. Design of macrocapsules to improve bacterial viability and supplementation with a probiotic for young calves. *Anim Feed Sci Technol.* 165: 176-183.
- Soto LP, Zbrun MV, Frizzo LS, Signorini ML, Sequeira GJ, Rosmini MR. 2014. Effects of bacterial inoculants in milk on the performance of intensively reared calves. *Anim Feed Sci Technol.* 189: 117-122.
- Soto LP, Astesana DM, Zbrun MV, Blajman JE, Salvetti NR, Berisvil AP, Rosmini MR, Signorini ML, Frizzo LS. 2016. Probiotic effect on calves infected with *Salmonella Dublin*: haematological parameters and serum biochemical profile. *Benef Microbes.* 7: 23-33.
- Stanley KN, Wallace JS, Currie J, Diggle P, Jones K. 1998 The seasonal variation of thermophilic campylobacters in cattle. *J Appl Microbiol.* 85: 472-480.
- Stanley K, Jones K. 2003. Cattle and sheep farms as reservoirs of *Campylobacter*. *J Appl. Microbiol.* 94: 104-113.
- Stern NJ, Svetoch EA, Eruslanov BV, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Pokhilenko VD, Lecghuck VP, Svetoch OE, Seal BS. 2006. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. *Antimicrob Agents Chemother.* 50: 3111-3116.
- Stern NJ, Eruslanov BV, Pokhilenko VD, Kovalev YN, Volodina LL, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Borzenkov VN, Levchuk VP, Svetoch OE, Stepanshin

- YG, Svetoch EA. 2008. Bacteriocins reduce *Campylobacter jejuni* colonization while bacteria producing bacteriocins are ineffective. *Microb Ecol Health Dis.* 20: 74-79.
- Sultana K, Godward G, Reynolds N, Arumugaswamy R, Peiris P, Kailasapathy K. 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Int J Food Microbiol.* 62: 47-55.
  - Sun W, Griffiths MW. 2000. Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan–xanthan beads. *Int J Dairy Technol.* 61: 17-25.
  - Svetoch EA, Eruslanov BV, Pereygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Borzenkov VN, Svetoch OE, Kovalev YN, Stepanshin YG, Siragusa GR, Sea BS, Stern NJ. 2008. Diverse antimicrobial killing by *Enterococcus faecium* E 50-52 bacteriocin. *J Agric Food Chem.* 56: 1942-1948.
  - Svetoch EA, Stern NJ. 2010. Bacteriocins to control *Campylobacter spp.* in poultry—a review. *Poult Sci.* 89: 1763-1768.
  - Tabe ES, Oloya J, Doetkott DK, Bauer ML, Gibbs PS, Khaita ML. 2008. Comparative effect of direct-fed microbials on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in naturally infected feedlot cattle. *J Food Prot.* 71: 539-544.
  - Tannock GW, Munro K, Harmsen HJM, Welling GW, Smart J, Gopal PK. 2000. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl Environ Microbiol.* 66: 2578-2588.
  - Tareb R, Bernardeau M, Gueguen M, Vernoux JP. 2013. *In vitro* characterization of aggregation and adhesion properties of viable and heat-killed forms of two probiotic *Lactobacillus strains* and interaction with foodborne zoonotic bacteria, especially *Campylobacter jejuni*. *J Med Microbiol.* 62: 637-649.
  - Terzolo HR. 1984. *Campylobacters* in enteric infections of cattle and sheep. PhD. Thesis. Department of Veterinary Pathology, University of Edinburgh, Scotland.
  - Thomrongsuwannakij T, Chuanchuen R, Chansiripornchai N. 2016. Identification of competitive exclusion and its ability to protect against *Campylobacter jejuni* in broilers. *Thai J Vet Med.* 46: 279-286.
  - Tian W, Song J, Wang Y, Yue L, Wang J, Dan T, Menghe B, Zhang H. 2015. Effect of different calcium salts and methods for triggering gelation on the characteristics of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* LIP-1. *RSC Adv.* 5: 73352-73362.

- Timmerman HM, Mulder L, Everts H, Van Espen DC, Van Der Wal E, Klaassen G, Rouwers SMG, Hartemink R, Rombouts FM, Beynen AC. 2005. Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. *J Dairy Sci.* 88: 2154-2165.
- Torrezan TM, SILVA JTD, Miqueo E, Rocha NB, Silva FLM, Baldassin S, Bittar CMM. 2016. Performance of calves receiving probiotic containing “*Bacillus subtilis*” and “*Bacillus licheniformis*”. *Rev Bras Saúde Prod Anim.* 17: 508-519.
- Trabelsi I, Bejar W, Ayadi D, Chouayekh H, Kammoun R, Bejar S, Salah RB. 2013. Encapsulation in alginate and alginate coated-chitosan improved the survival of newly probiotic in oxgall and gastric juice. *Int J Biol Macromol.* 61: 36-42.
- Truelstrup HL, Allan-Wojtas PM, Jin YL, Paulson AT. 2002. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium spp.* in milk and simulated gastrointestinal conditions. *J Food Microbiol.* 19: 35-45.
- Turpin W, Humblot C, Thomas M, Guyot JP. 2010. *Lactobacilli* as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms. *Int J Food Microbiol.* 143: 87–102.
- UE. 2003. Recomendación de la Comisión, del 2 de marzo de 2005, relativa al programa coordinado de controles en el ámbito de la alimentación animal para el año 2005 de conformidad con la Directiva 95/53/CE del Consejo.
- Uyeno Y, Kawashima K, Hasunuma T, Wakimoto W, Noda M, Nagashima S, Akiyama K, Tabata M, Kushibiki S. 2013. Effects of cellooligosaccharide or a combination of cellooligosaccharide and live *Clostridium butyricum* culture on performance and intestinal ecology in Holstein calves fed milk or milk replacer. *Livest Sci.* 153: 88-93.
- Van Schaik W, Gahan CG, Hill C. 1999. Acid-adapted *Listeria monocytogenes* displays enhanced tolerance against the lantibiotics nisin and lactacin 3147. *J Food Prot.* 62: 536-540.
- Vignolo G, Palacios J, Farias ME, Sesma F, Schillinger U. 2000. Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Curr. Microbiol.* 41: 410-416.
- Vlkova E, Rada V, Trojanova I, Killer J, Smehilova M, Molatova Z, 2008. Occurrence of *bifidobacteria* in faeces of calves fed milk or a combined diet. *Arch Anim Nutr.* 62: 359–365.
- Voltan S, Castagliuolo I, Elli M, Longo S, Brun P, D’Inca R, Porzionato A, Macchi V, Palù, Martines D. 2007. Aggregating Phenotype in *Lactobacillus crispatus* Determines

Intestinal Colonization and TLR2 and TLR4 Modulation in Murine Colonic Mucosa. *Clin Vaccine Immunol.* 14: 1138-1148.

- Von Buenau R, Jaekel L, Schubotz E, Schwarz S, Stroff T, Krueger M, 2005. *Escherichia coli* strain Nissle 1917: significant reduction of neonatal calf diarrhoea. *J Dairy Sci.* 88: 317-323.
- Wagenaar JA, French NP, Havelaar AH. 2013. Preventing *Campylobacter* at the source: why is it so difficult?. *Clin Infect Dis.* 57: 1600-1606.
- Wassenaar TM. 1997. Toxin production by *Campylobacter spp.* *Clin Microbiol. Rev.* 10: 466-476.
- Weinbreck F, Bodnár I, Marco ML. 2010. Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? *Int J Food Microbiol.* 136: 364-367.
- Weng L, Chen C, Zuo J, Li W. 2011. Molecular dynamics study of effects of temperature and concentration on hydrogen-bond abilities of ethylene glycol and glycerol: implications for cryopreservation. *J Phys Chem A.* 115: 4729-4737.
- Wilson, DJ, Gabriel E, Leatherbarrow AJ, Cheesbrough J, Gee S, Bolton E, 2009. Rapid evolution and the importance of recombination to the gastroenteric pathogen *Campylobacter jejuni*. *Mol Biol Evol.* 26: 385-397.
- Wine E, Gareau MG, Johnson-Henry K, Sherman PM. 2009. Strain-specific probiotic (*Lactobacillus helveticus*) inhibition of *Campylobacter jejuni* invasion of human intestinal epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett.* 300: 146-152.
- Ying DY, Phoon MC, SanguanRCi L, Weerakkody R, Burgar I, Augustin MA. 2010. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG powders: relationship of powder physical properties to probiotic survival during storage. *J. Food Sci.* 75: 588-595.
- Yirga H. 2015. The Use of Probiotics in Animal Nutrition. *J Prob Health* 3: 4172-4182.
- Younts-Dahl SM, Galyean ML, Lonergan GH, Elam NA, Brashears MM, 2004. Dietary supplementation with *Lactobacillus-Propionibacterium*-based direct-fed with microbials and prevalence of *Escherichia coli* O157 in beef feedlot cattle and on hides at harvest. *J Food Prot.* 67: 889-893.
- Zbrun MV, Romero-Scharpen A, Olivero C, Rossler E, Soto LP, Rosmini MR, Sequeira GJ, Signorini ML, Frizzo LS. 2013. Occurrence of thermotolerant *Campylobacter spp.* at different stages of the poultry meat supply chain in Argentina. *N Z Vet J.* 61: 337-343.

Astesana, D M (2017)

- Zeng Z, Luo J, Zuo F, Zhang Y, Ma H, Chen S. 2016. Screening for potential novel probiotic *Lactobacillus* strains based on high dipeptidyl peptidase IV and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity. J Funct Foods. 20: 486-495.