

POTENCIAL DE UN NUEVO PROBIÓTICO, *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* SUBSP. *INFANTIS*, FRENTE A *SALMONELLA* O ETEC K88 *COLI* EN LECHONES AL DESTETE

Barba-Vidal¹, E., Castillejos¹, L., Rivero², M., Moreno², J.A. y Martín-Orúe¹, S.M.

¹Servicio de Nutrición y Bienestar Animal, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, España

²Laboratorios Ordesa S. L., Parc Científic de Barcelona, 08028 Barcelona, España
Emili.Barba@uab.cat

INTRODUCCIÓN

El incremento de resistencias microbianas provocó la prohibición por parte de la Unión Europea del uso de antibióticos como promotores de crecimiento (Eur-Lex, 2003) y una necesidad de reducir su uso a nivel mundial (Dewey et al., 1997; Pugh D., 2002). Desde entonces, el sector porcino busca alternativas a los antibióticos, entre las que destacan los probióticos como una forma de mejorar la resistencia de los animales a la enfermedad (Gallois, et al., 2009). Dos de las principales patologías que afronta hoy en día la producción porcina son la colibacilosis post-destete y la salmonelosis por sus implicaciones en la seguridad alimentaria.

En el presente trabajo se evalúa el potencial de un nuevo probiótico (*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210) frente a dos patógenos digestivos (*Salmonella* Typhimurium y *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) K88) utilizando sendos modelos experimentales de enfermedad en lechones recién destetados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron dos ensayos (Ensayo 1. Salmonelosis; Ensayo 2. Colibacilosis). En cada uno, se utilizaron 72 animales de 24 y 21 (± 2) días de edad y $7,9 \pm 0,13$ kg y $6,8 \pm 0,55$ kg de peso vivo (PV), respectivamente. Los animales, de granjas con un elevado estado sanitario, se trasladaron a las instalaciones de la Universidad Autónoma de Barcelona de nivel de bioseguridad 2. En el Ensayo 1 se seleccionaron animales de madres serológicamente negativas frente a *Salmonella* y en el Ensayo 2 de madres que no estuvieran vacunadas frente a *E. coli*.

Los animales se distribuyeron en 24 corrales y 4 grupos experimentales en un diseño 2x2 desequilibrado: con o sin probiótico, e inoculados o no oralmente con el patógeno: IC (infectados control, sin suplementación probiótica, n=8), IP (infectados suplementados con probiótico, n=8), NIC (no infectados control, sin suplementación probiótica, n=4) y NIP (no infectados suplementados con probiótico, n=4).

Las dietas fueron formuladas para satisfacer las necesidades de lechones al destete (De Blas et al., 2010) siendo las mismas para las dos pruebas y todos los tratamientos. El tratamiento probiótico fue administrado diariamente vía oral (10^9 UFC/ddía) durante todo el ensayo. No se administró tratamiento antibiótico en ninguno caso.

Cada ensayo duró 16 días. Tras una semana de adaptación, se realizó una doble-inoculación con *Salmonella* Typhimurium (2×10^9 y 6×10^9 UFC/d) (Ensayo 1) o ETEC K88 (5×10^9 y 6×10^{10} UFC/d) (Ensayo 2). Durante el periodo post-inoculación (PI) de 8 días, se controló el consumo y el peso de los animales, la clínica (consistencia fecal y temperatura) y se tomaron muestras fecales para microbiología. Los días 4 y 8 PI se muestreó sangre de un animal por corral para el análisis de citoquinas pro-inflamatorias (TNF α) y proteínas de fase aguda (PigMAP). Posteriormente, se sacrificó y muestreó el contenido intestinal para analizar los productos de fermentación (ácidos grasos volátiles (AGVs) y ácido láctico) y la presencia de patógenos (*Salmonella* en colon y heces en el primer ensayo, y enterobacterias y coliformes adheridos en raspados de mucosa ileal y heces en el segundo ensayo).

Se realizaron análisis de varianza utilizando el modelo general lineal o mixto de SAS (SAS Institute Inc., USA) excepto en las analíticas microbiológicas, donde se analizó las frecuencias de animales positivos mediante el test de Fisher. En caso de significación de efectos, las medias se separaron mediante el test de Tukey-Kramer utilizando el valor α para la significación en $P=0,05$ y tendencia hasta $P=0,10$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

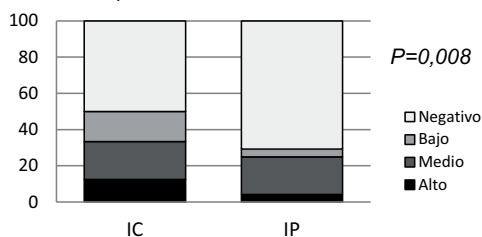
Durante la semana de adaptación, los animales mostraron un buen estado de salud. La inoculación produjo en ambos casos un cuadro clínico leve que no requirió tratamiento antibiótico ni el sacrificio humanitario de ningún animal.

En referencia a los datos productivos, en el ensayo con *Salmonella* la inoculación provocó una reducción en el consumo, la ganancia media diaria (GMD) y la eficiencia alimentaria (GMD: 118g infectados vs. 209g no infectados, $P < 0,001$) pero no en el ensayo con *E. coli* (GMD: 114g infectados vs. 120g no infectados, $P = 0,801$). No se observaron diferencias significativas asociadas al consumo del probiótico en ninguno de los dos estudios.

En los parámetros clínicos hubo un empeoramiento de la consistencia fecal ($P < 0,001$) con la inoculación de ambos patógenos e incrementos en la temperatura rectal en el caso de *Salmonella* (39,6°C infectados vs. 39,3°C no infectados a día 4 PI, $P = 0,005$). El tratamiento probiótico no contrarrestó los cambios clínicos observados.

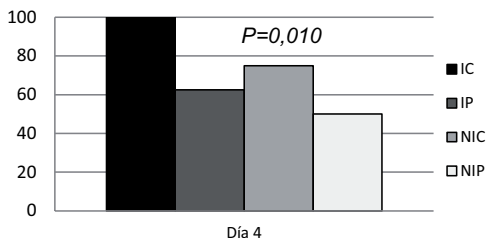
Sobre la excreción de patógenos decir que sólo los animales inoculados con *Salmonella* excretaron el patógeno de forma contable ($> 10^3$ UFC/g) y que el tratamiento probiótico produjo una reducción significativa de los niveles de excreción fecal de *Salmonella* tanto, en determinados días PI (día 3 PI; $P = 0,040$), como considerando todos los días en conjunto ($P = 0,008$; Figura 1). Por otra parte, en el ensayo de *E. coli* la inoculación no incrementó el recuento de coliformes ni de enterobacterias en la digesta ileal o colónica. Este resultado no sorprende al no ser éste un recuento específico de la cepa inoculada y concuerda con otros estudios similares (Bhandari et al., 2008). No obstante, la cepa que se inoculó fue caracterizada (Blanco et al. 1997), es fimbriada y al analizar los recuentos de bacterias adheridas a la mucosa ileal en el grupo infectado sí que se observó un aumento del porcentaje de animales con contajes $> 10^5$ UFC/g a día 4 PI (coliformes $P = 0,010$ y enterobacterias $P = 0,031$) (Figura 2). Este parámetro también disminuyó en los animales que recibieron el probiótico ($P = 0,010$; Figura 2).

Figura 1. Niveles de excreción de *Salmonella* considerando la totalidad del periodo post-inoculación (% total muestras analizadas).



Niveles: Negativo ($10 - 10^2$ UFC/g), Bajo ($10^3 - 10^4$ UFC/g), Medio ($10^4 - 10^5$ UFC/g), Alto ($10^5 - 10^6$ UFC/g). P-valores calculados con el test de Fisher ($n = 24$).

Figura 2. Coliformes adheridos a intestino. Porcentaje de animales con $> 10^5$ UFC/g a día 4 post-inoculación.



P-valores calculados con el test de Fisher. Grupos IC y IP, $n = 8$; NIP y NIC, $n = 4$.

En relación a los productos de la fermentación (Tabla 1) la inoculación provocó cambios en ambos ensayos. En el ensayo de *Salmonella* se redujo el total de AGVs a día 4 PI, mientras que en el ensayo con *E. coli* hubo un aumento de láctico y acético en el íleon a día 8 PI ($P = 0,076$ y $P = 0,051$, respectivamente). Por otro lado, el tratamiento probiótico produjo una interacción consistente en los dos ensayos donde el probiótico incrementó el total de AGVs en los no inoculados a día 4 PI y no así en los infectados, reduciéndolos numéricamente.

Finalmente, la respuesta inflamatoria también se vio modificada por la inoculación con un incremento en las citoquinas pro-inflamatorias TNF α en el día 4 PI en los dos estudios (Ensayo 1: 150,6 pg/ml en infectados vs. 90,16 pg/ml en no infectados, $P < 0,001$; Ensayo 2: 81,5 pg/ml en infectados vs. 57,0 pg/ml en no infectados $P = 0,003$) y en PigMAP en el ensayo de *Salmonella* (2,11 mg/ml en infectados vs. 0,81 mg/ml en no infectados, $P = 0,003$).

No se observaron cambios relevantes en estos parámetros relacionados con la administración del probiótico, exceptuando una interacción en las PigMAP en el Ensayo 2 a día 4 PI, donde se detectó una evolución distinta en función de que estuvieran inoculados o no (0,80 ; 0,92 ; 0,87 y 0,67 mg/ml $DER=0,148$ para IC, IP, NIC y NIP, respectivamente; $P=0,022$). Estos resultados podrían sugerir una reducción respuesta inflamatoria en los animales no infectados promovida por el probiótico que, sin embargo, no es evidente en los animales expuestos al patógeno. Esta respuesta sería también coherente con la evolución descrita previamente para los productos de fermentación que aumentan únicamente en el grupo no infectado.

Los resultados demuestran que *Bifidobacterium longum subsp. infantis* CECT 7210 podría reducir la colonización intestinal por *Salmonella* y ETEC durante procesos entéricos leves.

Tabla 1. Efecto sobre la concentración total de AGVs en el colon (mmol/kg) a distintos días post-inoculación (PI)

	Días PI	Tratamiento ¹					P-valor		
		IC	IP	NIC	NIP	DER	Inoculación	Probiótico	Interacción
Salmonella	4	116,5b	90,2b	123,3b	141,3a	17,49	0,001	0,587	0,008
	8	142,3	129,9	131,5	142,1	16,95	0,925	0,905	0,131
ETEC K88	4	130,7	124,2	113,9	130,4	14,57	0,409	0,435	0,082
	8	147,3	142,0	123,5	136,0	22,00	0,133	0,711	0,363

¹IC: infectados control, sin suplementación probiótica (n=8); IP: infectados suplementados con probiótico (n=8); NIC: no infectados control, sin suplementación probiótica (n=4); NIP: no infectados suplementados con probiótico (n=4). Las medias fueron calculadas con el LSMEANS y los p-valores obtenidos con el PROC GLM (SAS).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bhandari et al., 2008. J. Anim. Sci. 86: 836–847
- Blanco et al., 1997. J. Clin. Microbiol. 35:2958–2963
- De Blas et al., 2010. FEDNA • Dewey et al., 1997. Prev. Vet. Med. 31:133–146
- Gallois et al., 2009. Animal 3: 1644–61 • Official Journal of the European Union. L 268
- Pugh D. 2002. Toxicol. Lett. 128: 35–44.

Agradecimientos: Financiado por Laboratorios Ordesa S.L. El presente trabajo forma parte del proyecto “INCOMES” (Programa INNPRONTA) subvencionado por el CDTI y el ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España.

EFFECT OF A NOVEL PROBIOTIC *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* SUBSP. *INFANTIS* IN PIGS EXPERIMENTALLY CHALLENGED WITH *SALMONELLA* OR *E. COLI*

ABSTRACT: A novel probiotic *Bifidobacterium longum subsp. infantis* CECT 7210 (Laboratorios Ordesa S.L.) was tested in two experimental models with *Salmonella* Typhimurium and ETEC K88 during 16 days. In each trial 72 piglets (24 pens, 3 piglets/pen) were distributed in a 2x2 unbalanced design: inoculated or not with pathogens and treated or not with the probiotic. Animal performance and clinical parameters were monitored before (8 days) and after the inoculation (8 days). Moreover, pathogen excretion, fermentation and immune response were monitored at slaughter at days 4 and 8 post inoculation (PI).

Inoculation provoked mild clinical outcomes and significant changes in many of the parameters studied. Probiotic treatment increased the total concentration of VFAs in the non inoculated animals. Acute phase proteins (PigMAP) were increased with the probiotic in the *Salmonella* inoculated animals and decreased in the non-inoculated ($P=0.022$). All these changes could be concomitant with reductions in the intestinal colonization by *Salmonella* or ETEC K88 with the probiotic treatment ($P<0.05$).

Keywords: probiotic, oral challenge, *Salmonella*, ETEC K88.