

## EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON UN POSTBIÓTICO BASADO EN BACTERIAS LÁCTICAS Y LEVADURAS EN EL SISTEMA INMUNE DE TERNERAS LECHERAS DE REPOSICIÓN

Salama<sup>1</sup>, A.A.K. y Rovai<sup>2</sup>, M.

<sup>1</sup>Grup de Recerca en Remugants (G2R), Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193, Barcelona. <sup>2</sup>Dairy and Food Science Department, Box 2104, South Dakota State University, Brookings, 57007, SD, EEUU; ahmed.salama@uab.cat

### INTRODUCCIÓN

La microbiota intestinal afecta muy marcadamente al estado nutricional e inmunológico de los animales. En las últimas décadas, la suplementación de la dieta animal con suplementos fermentados ha mostrado resultados muy prometedores, aumentando la productividad y reduciendo las enfermedades, y por lo tanto la necesidad de antibióticos (Aguilar-Toalá et al., 2018). Los probióticos (microorganismos vivos) y prebióticos (alimento para la microflora) confieren un beneficio para la salud en el huésped (Fijan, 2014). Por otro lado, los postbióticos son una amplia gama de compuestos que se producen durante el proceso de fermentación o la actividad metabólica del microorganismo probiótico (Aguilar-Toalá et al., 2018). Estos compuestos juegan un papel extremadamente importante en la regulación de la salud y en el mantenimiento de un microbioma saludable.

Los terneros de edades tempranas se enfrentan a periodos de baja inmunidad (especialmente alrededor del destete) y tienen más riesgo de sufrir enfermedades (Chase et al., 2008). Por ello, el uso de postbióticos podría mejorar el estado inmunológico de los terneros, reduciendo su disposición a la infección y así mejorar la productividad.

Probisán<sup>®</sup> es un postbiótico obtenido del proceso de fermentación de un cultivo de bacterias lácticas y levaduras. La hipótesis del presente estudio fue que la suplementación con Probisán<sup>®</sup> tendría un efecto inmunomodulador y mejoraría el sistema inmunológico de las terneras, especialmente en periodos críticos de la vida productiva.

### MATERIAL Y MÉTODOS

**Animales y condiciones de manejo:** Se utilizaron un total de 70 terneras (Holstein×Jersey) desde el nacimiento hasta la semana 18, en un experimento de diseño de bloques completos al azar, en una granja lechera comercial (Hammink Dairy Farm; Bruce, SD, EEUU) durante el invierno (−35 a −4°C). Durante las primeras 7 semanas, las terneras recibieron 5,7 L/d (6 qt.US liq) de leche de vaca pasteurizada en 3 tomas/d (7, 13 y 18 h). Las terneras se destetaron en la semana 9 y se alimentaron con concentrado y heno ad libitum. A los 43 ± 2 d de edad se descornaron aplicando un descornador eléctrico, previa administración de un antiinflamatorio (Meloxicam 15 mg; Unichem, Goa, India) y un sedante (Rompun; Bayer HealthCare, KS, EEUU). En la semana 9, las terneras se vacunaron por vía intranasal contra los virus de sincitial respiratorio bovino (BRV), rinotraqueitis infecciosa bovina y parainfluenza-3 (Inforce 3, Zoetis Services, Parsippany, NJ, EEUU).

**Tratamientos:** Al día 3 de edad, las terneras se dividieron en 2 grupos experimentales:

- Control (**CON**; n = 35): terneras sin suplementación.
- Probisán<sup>®</sup> (**PRO**; n = 35): terneras suplementadas con un postbiótico (Probisán<sup>®</sup>, Pentabiol, Navarra, ES). Del día 3 al destete, se añadieron 3 g de PRO en la leche. Después del destete, se añadieron 1,5 g/kg de PRO al concentrado.

**Muestreo y medidas:** El peso vivo se registró semanalmente, utilizando una balanza digital Caf-Cart<sup>®</sup> (Raytec LLC, Ephrata, PA, EEUU). Se registró diariamente la ingestión de materia seca de concentrado. A los d 10 y 20 después del descornado se evaluó el estado de la herida utilizando una escala de calificación numérica de 1 a 3, donde: 1 = sin infección (exudado seco y cierre adecuado de la herida), 2 = inflamación (exudado seroso ligeramente húmedo y cierre levemente inadecuado de la herida), y 3 = infección (exudado purulento húmedo y cierre inadecuado de la herida).

En la semana 16, se recogieron muestras de secreciones nasales de 46 terneros (n = 23 por tratamiento) utilizando esponjas estériles insertadas en la cavidad nasal durante 5 min. A continuación, se obtuvieron las secreciones y se congelaron a −80°C hasta el análisis de IgA totales y específicas al BRV. El análisis del IgA se realizó mediante un kit ELISA (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, EEUU).

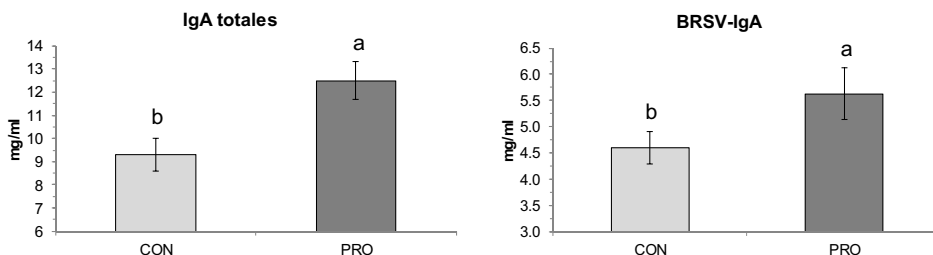
En la semana 17, se tomaron además muestras de sangre para realizar en condiciones *ex vivo* un reto con lipopolisacáridos (LPS) de *E. coli* (O111: B4, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) y *Salmonella* (*Salmonella typhimurium* SL1181; Sigma-Aldrich). El nivel de interleukina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) en sangre se midió mediante ELISA, para evaluar la respuesta inflamatoria a ambos LPS a dosis baja (0,01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y alta (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Los datos de ingestión y peso vivo se analizaron mediante el PROC MIXED (SAS 9.4) con medidas repetidas. Los niveles de IgA en las secreciones nasales e IL-1 $\beta$  (reto de LPS) se analizaron mediante el PROC GLM. Para los datos de descornado, se utilizó el PROC FREQ para la determinación del porcentaje de terneros en cada categoría. Dado que los datos de descornado son de tipo discreto (1, 2 o 3), en su análisis, se aplicó un modelo logístico.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se encontraron diferencias ( $P = 0,96$ ) entre los 2 tratamientos para el peso vivo (32,0 a 137,8 kg; peso medio =  $71,8 \pm 0,9$  kg) ni para el ritmo de crecimiento medio ( $785 \pm 11$  g/d) de la semana 1 a la 18. Además, ambos grupos consumieron una cantidad similar de concentrado de la semana 3 a la 5 ( $226 \pm 67$  g/d). Sin embargo, entre las semanas 6 y 10, las terneras PRO consumieron menos ( $P < 0,05$ ) cantidades de concentrado (CON =  $926 \pm 51$  g/d y PRO =  $804 \pm 50$  g/d). Este menor consumo para los animales PRO podría indicar una mejor eficiencia, ya que consumieron menos cantidades de concentrado pero crecieron al mismo nivel que las terneras CON.

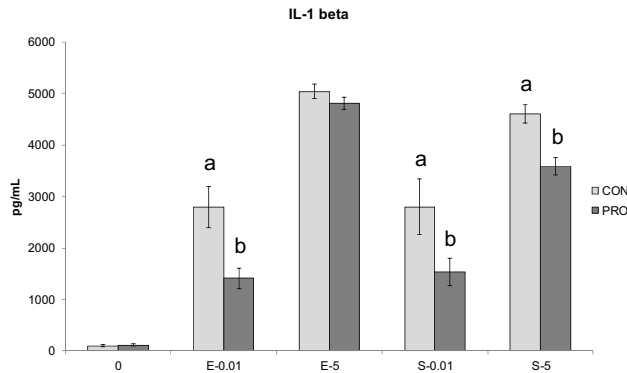
Las secreciones nasales de las terneras PRO contuvieron niveles más altos ( $P < 0,05$ ) de IgA total ( $12,5 \pm 0,80$  vs.  $9,3 \pm 0,71$  mg/mL) y específica al BRSV ( $5,63 \pm 0,50$  vs.  $4,60 \pm 0,31$  mg/mL) que las terneras CON, tal como se muestra en la Figura 1. Estos anticuerpos están presentes en las membranas mucosas que recubren las vías respiratorias y el tracto digestivo, indicando que las terneras PRO serían más resistentes a una eventual infección.



**Figura 1.** Concentraciones de anticuerpos IgA totales y específicos a la vacuna contra virus BRSV en las secreciones nasales de las terneras sin suplementación (CON) o suplementadas con Probisan® (PRO). <sup>a, b</sup> indican una diferencia significativa a  $P < 0,05$ .

En el proceso de respuesta inflamatoria, la IL-1 $\beta$  es un mediador clave para la respuesta del huésped a los patógenos (López-Castejon y Brough, 2011). En nuestro estudio, la concentración de IL-1 $\beta$  se usó como un indicador de la respuesta inflamatoria de las células sanguíneas al tratamiento con LPS de *E. coli* y *Salmonella*. Como se muestra en la Figura 2, las terneras PRO tuvieron una menor respuesta inflamatoria ( $P < 0,05$ ) a los LPS de *E. coli* ( $1413 \pm 200$  vs.  $2793 \pm 405$  pg IL-1 $\beta$ /mL) y *Salmonella* ( $1533 \pm 265$  vs.  $2797 \pm 540$  pg IL-1 $\beta$ /mL). Las terneras PRO, en comparación con el grupo CON, tuvieron valores de IL-1 $\beta$  más bajos en ambas dosis de LPS de *Salmonella*, pero esta diferencia desapareció con la dosis alta de LPS de *E. coli* (Figura 2). La dosis alta se usó para analizar el máximo potencial de la respuesta inmune, mientras que la dosis baja representa un desafío más fisiológico.

El grado de inflamación e infección por el descornado fue mayor ( $P < 0,05$ ) en CON que en PRO en los días 10 y 20 después de su realización. Además, 10 d después del descornado, el 50% de las terneras CON presentaron inflamación o infección (20% puntuación 2 y 28,6% puntuación 3). Por otro lado, el 73% de las terneras PRO fueron normales (puntuación 1 o no infectadas), mientras que solo el 27% presentó heridas (14,7% puntuación 2 y 11,8% puntuación 3).



**Figura 2.** Concentraciones de interleucina-1 $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) en respuesta al tratamiento de las células sanguíneas con LPS de *E. coli* (E) y *Salmonella* (S) en terneras sin suplementación (CON) o suplementadas con Probisán® (PRO). El LPS se aplicó en dosis baja (0,01  $\mu$ /mL) y alta (5  $\mu$ /mL). <sup>a, b</sup> indican una diferencia significativa a  $P < 0,05$  dentro de cada dosis de LPS.

En conclusión, la mayor concentración de IgA en las secreciones nasales, junto con la menor respuesta inflamatoria de las células sanguíneas al tratamiento con LPS, así como la menor inflamación e infección debidas al descornado, indicaron una mejoría en el estado inmunológico de las terneras suplementadas con el postbiótico Probisán®.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar-Toalá et al. 2018. Trends in Food Science & Technology 75:105-114.
- Chase, C.C., Hurley, D.J., & Reber, A.J. 2008. Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract. 24:87-104.
- Lopez-Castejon, G. & Brough, D. 2011. Cytokine Growth Factor Rev. 22:189-195.
- Fijan, S. 2014. Int. J. Environ. Res. Public Health. 11:4745-4767.

**Agradecimientos:** Los autores agradecen a Leyby S. Guifarro por la ayuda incondicional en realizar el trabajo, a Hammink Dairy LLC (Bruce, SD) por el excelente cuidado de los animales y a PENTABIOL, S. L. Navarra, España por el soporte del estudio.

#### EFFECT OF LACTIC ACID BACTERIA AND YEAST-BASED POSTBIOTIC ON THE IMMUNE SYSTEM OF DAIRY HEIFER CALVES

**ABSTRACT:** To evaluate the effect of a lactic acid bacteria and non-bitter fermented yeast on the immune system, 70 heifer-calves were randomly assigned to: 1) Control with no supplement (**CON**; n = 35) or 2) Supplemented with Probisán®, (**PRO**; n = 35). From birth to weaning (wk 8), PRO calves received Probisán in milk (3 g/d). From wk 9 to 18, Probisán was added to the concentrate mixture (1.5 g/kg). Body weight was recorded weekly. Calves were vaccinated intranasally at wk 9 with bovine respiratory syncytial virus (BRSV), infectious rhinotracheitis virus, and parainfluenza-3 virus. Nasal secretions were collected for the analysis of IgA and BRSV-IgA. Blood was also sampled for the ex vivo *E. coli* and *Salmonella* lipopolysaccharide (LPS) challenges. Body weight and blood IgG were similar ( $P > 0.10$ ). Nasal secretions of PRO contained greater ( $P < 0.05$ ) IgA ( $12.5 \pm 0.80$  vs.  $9.3 \pm 0.71$  mg/mL) and log<sub>2</sub> antibody titre of BRSV-IgA ( $5.63 \pm 0.50$  vs.  $4.60 \pm 0.31$ ). Additionally, PRO had lower ( $P < 0.05$ ) inflammatory response to *E. coli* ( $1,413 \pm 200$  vs.  $2,793 \pm 405$  pg IL-1 $\beta$ /mL) and *Salmonella* ( $1,533 \pm 265$  vs.  $2,797 \pm 540$  pg IL-1 $\beta$ /mL) LPS. Overall, the greater total and specific IgA in nasal secretions together with the lower inflammatory response to LPS indicates an improvement in the immune status of heifer calves supplemented with Probisán®.

**Keywords:** postbiotic, immune function, heifer calves.