



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

Evaluación de la capacidad probiótica de una cepa de  
*Lactobacillus murinus* y su uso en el tratamiento de  
diarreas virales en caninos

Dr. Luis Delucchi

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

**URUGUAY  
2013**





**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

Evaluación de la capacidad probiótica de una cepa de  
*Lactobacillus murinus* y su uso en el tratamiento de  
diarreas virales en caninos

Dr. Luis Delucchi

---

**Dr. Pablo Zunino PhD**  
**Director de Tesis**

**2013**

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE  
DEFENSA DE TESIS**

**Celia Tasende Bolon; DMV, PhD.  
Facultad de Veterinaria.  
Universidad de la República – Uruguay.**

**Fernando Dutra Quintela; DMV, PhD  
Dirección de Laboratorio Veterinario Miguel C. Rubino  
Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca –  
Uruguay.**

**Gustavo Varela Pensado; DM, Mag.  
Facultad de Medicina.  
Universidad de la República - Uruguay**

**AÑO 2013**

**EN ESTA HOJA VA LA COPIA DEL  
ACTA DE DEFENSA DE TESIS**

**En esta hoja va el Informe del Tribunal**

# Índice

<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
Antecedentes.....	1
Propiedades bacterianas asociadas al potencial probiótico.....	3
Probióticos y tratamiento de la diarrea.....	4
<b>Antecedentes específicos</b> .....	<b>5</b>
Probióticos y su uso en caninos.....	5
Probióticos y modulación de la respuesta inmune.....	6
Translocación.....	7
<i>Lactobacillus murinus</i> como potencial probiótico.....	7
<b>Hipótesis</b> .....	<b>8</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>8</b>
Objetivo general.....	8
Objetivos específicos.....	8
<b>Estrategia experimental</b> .....	<b>9</b>
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>10</b>
Cepas bacterianas.....	10
Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	10
Liofilización y estabilidad de <i>Lactobacillus murinus</i> .....	11
Poblaciones caninas.....	11
<i>Ensayo de capacidad colonizadora de L. murinus LbP2-RR</i> .....	11
<i>Evaluación del efecto de L. murinus en la IgA total fecal</i> .....	12
<i>Ensayo clínico para evaluar el efecto del potencial probiótico en la evolución de diarreas virales</i> .....	12
Parámetros hemáticos y séricos.....	13
<i>Ensayo de capacidad colonizadora de L. murinus LbP2-RR</i> .....	13
<i>Ensayo clínico para evaluar el efecto de un potencial probiótico en la evolución de diarreas asociadas a Distemper canino</i> .....	13
Determinación de IgA en materia fecal.....	14
Análisis estadístico.....	14
<b>Resultados</b> .....	<b>15</b>
<i>Ensayo de capacidad colonizadora de L. murinus LbP2-RR</i> .....	15
Estabilidad de la cepa mutante LbP2-RR.....	15
Persistencia de LbP2-RR en el tracto intestinal.....	15
Evolución del peso de los animales.....	16
Consumo del alimento.....	16
Evaluación de la translocación bacteriana.....	16
Parámetros hemáticos.....	16
<i>Evaluación del efecto de L. murinus en IgA fecal total</i> .....	18
<i>Ensayo clínico para evaluar el efecto de un potencial probiótico en la evolución de diarreas virales</i> .....	19
Estabilidad de la preparación bacteriana sometida a liofilización.....	19

Score clínico.....	20
Parámetros hemáticos.....	22
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>25</b>
Capacidad colonizadora de <i>Lactobacillus murinus</i> LbP2.....	26
Evaluación del efecto de <i>L. murinus</i> en la IgA fecal total.....	27
Efecto de <i>L. murinus</i> en caninos con diarrea asociada a Distemper.....	28
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>29</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>30</b>

## Lista de Tablas y Figuras

<b>Fig. 1. Recuperación de la cepa <i>L. murinus</i> LbP2-RR durante el ensayo en los 4 animales del grupo tratado.....</b>	<b>pag.15</b>
<b>Tabla I. Valores sanguíneos en el grupo de caninos tratados con <i>L. murinus</i> LbP2-RR durante el ensayo.....</b>	<b>pag.17</b>
<b>Tabla II. Valores sanguíneos en el grupo de caninos control tratados con PBS estéril durante el ensayo.....</b>	<b>pag.17</b>
<b>Tabla III. Valores de IgA fecal de los caninos tratados con <i>L. murinus</i> LbP2 y solo con PBS. ....</b>	<b>pag.18</b>
<b>Figura 2. Box plot donde se comparan las concentraciones de IgA fecal por gramo de materia fecal. ....</b>	<b>pag.19</b>
<b>Tabla IV. Viabilidad de <i>Lactobacillus murinus</i> LbP2 liofilizado, bajo diferentes condiciones de conservación.....</b>	<b>pag.20</b>
<b>Tabla V. Resultado del score clínico total por animal y por signo clínico en caninos tratados con <i>Lactobacillus murinus</i> LbP2.....</b>	<b>pag.21</b>
<b>Tabla VI. Resultado del score clínico total por animal y por signo clínico en caninos tratados con placebo.....</b>	<b>pag.21</b>
<b>Tabla VIIa. Evaluación del efecto de <i>L. murinus</i> LbP2 en el ensayo clínico de caninos con Distemper. Parámetros hemáticos. Caninos tratados con el probiótico.....</b>	<b>pag.22</b>
<b>Tabla VIIb. Evaluación del efecto de <i>L. murinus</i> LbP2 en el ensayo clínico de caninos con Distemper. Leucograma. Caninos tratados con el probiótico.....</b>	<b>pag.23</b>
<b>Tabla VIIIa. Evaluación del efecto de <i>L. murinus</i> LbP2 en el ensayo clínico de caninos con Distemper. Parámetros hemáticos. Caninos grupo control.....</b>	<b>pag.23</b>
<b>Tabla VIIIb. Evaluación del efecto de <i>L. murinus</i> LbP2 en el ensayo clínico de caninos con Distemper. Leucograma. Caninos grupo control.....</b>	<b>pag.24</b>

## RESUMEN

Los probióticos son microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud del huésped. Su uso clínico toma cada vez más importancia en la medida que se van comprobando sus efectos tanto en salud como en enfermedad del hombre y los animales dejando de ser paulatinamente una terapia alternativa para convertirse en parte de la terapéutica convencional. Para poder ser clasificado como probiótico, el microorganismo debe cumplir determinados requisitos *in vitro* e *in vivo* para lograr resultados específicos. Microorganismos provenientes de las microbiotas nativas serían útiles en el restablecimiento del equilibrio interno ya que se encuentran adaptados al medio sobre el cual se pretende actuar.

En el presente trabajo se empleó la cepa de *Lactobacillus murinus* LbP2 aislada previamente de heces de caninos para ser evaluada como potencial probiótico.

El objetivo general fue evaluar la persistencia en el medio intestinal, su efecto sobre parámetros generales, su capacidad probiótica por medio de la modulación de IgA fecal y su efecto en el tratamiento de las diarreas virales por Distemper.

En términos generales, los resultados indicaron que la cepa en cuestión presenta propiedades como probiótico y que ejerció efectos beneficiosos sobre las poblaciones de caninos empleadas en el estudio.

En el futuro se evaluarán aspectos adicionales vinculados al potencial probiótico de *L. murinus* LbP2 con el fin de avalar su administración en caninos.

## SUMMARY

Probiotics are live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit to the host. Their use as clinical tools has been getting more frequent every day based on scientific evidence and could change the roll of alternative therapy to become a conventional treatment for a number of diseases.

Prerequisites for a bacterial strain to be considered as a probiotic are the need to show in vitro and in vivo attributes to obtain good results with its use. Microorganism of the native microbiota could be useful to restore the natural balance of the enteric microorganism because they are adapted to the medium that is the target of the therapy.

The aim of the present work was to evaluate the probiotic potential of *Lactobacillus murinus* LbP2 isolated from canine faeces; its ability to colonize the intestinal media, its effect on hematic parameters, its immunomodulatory effects on fecal IgA levels and the clinical effect in dogs with diarrhea provoked by canine distemper virus.

In general terms the strain showed interesting probiotic properties and exerted beneficial effects on the dogs populations used in the present assays.

## INTRODUCCIÓN

Los probióticos fueron definidos inicialmente como microorganismos que podían contribuir con el balance de la microbiota intestinal al ser suministrados en forma oral (Fuller, 1989). Sin embargo, esta definición se ha venido modificando a lo largo del tiempo a medida que se atribuyen nuevas propiedades a los probióticos. Actualmente se acepta definir a los probióticos como microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud del huésped (FAO/OMS, 2001).

Diferentes microorganismos han sido usados como potenciales probióticos, incluyendo desde bacilos de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Propionibacterium*, cocos de los géneros *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* o *Enterococcus* y levaduras y mohos de los géneros *Saccharomyces*, *Candida* y *Aspergillus* (Narayan et al. 2010).

Las bacterias probióticas más comúnmente utilizadas pertenecen al grupo de las bacterias del ácido láctico (BAL) como lactobacilos, bifidobacterias y enterococos. Las BAL conforman un grupo de bacterias caracterizadas por ser Gram positivas, usualmente no móviles y no esporuladas, que producen ácido láctico como único o principal producto de metabolismo fermentativo.

Las BAL se dividen en dos grupos, homofermentadoras y heterofermentadoras, de acuerdo a la naturaleza de los productos formados durante la fermentación de la glucosa. Las homofermentadoras transforman la glucosa en ácido láctico usando la ruta de Embden-Meyerhoff y tienen como producto final principal el ácido láctico, mientras que las segundas carecen de la enzima aldolasa y utilizan la ruta de las pentosas obteniendo como resultado final ácido láctico, etanol y CO<sub>2</sub> (König & Fröhlich, 2009). El rendimiento de la homofermentación es más alto que la heterofermentación en una razón de 2 moles de ATP por mol de glucosa frente a 1 mol de ATP por una de glucosa (heterofermentativas) (Kandler, 1983).

La capacidad probiótica de un microorganismo depende fuertemente de la cepa, incluso dentro de una misma especie. Distintas cepas presentan capacidades particulares como probióticos en el marco de diversas situaciones clínicas (Heczko et al. 2006). Es por ello que es necesario desarrollar y ajustar métodos de evaluación in vitro e in vivo del microorganismo para evaluar su posterior uso en la clínica (Heczko et al. 2006).

### Antecedentes

El interés por los efectos beneficiosos de la biota láctica se debe principalmente al científico ruso Elie Metchnikoff (1845-1919) quien sostenía que la longevidad de las poblaciones humanas de los Balcanes se debía al hábito de ingerir derivados lácteos fermentados y que muchas enfermedades gastrointestinales se debían al crecimiento de “flora putrefactiva” la cual podía ser controlada por las bacterias lácticas.

El papel de las bacterias lácticas en el tracto gastrointestinal ha sido sujeto de controversia en el área de la microbiología entérica. Para Hove et al. (1999) no hay otro grupo de bacterias al que se le hayan atribuido tantos efectos benéficos para mejorar la salud del huésped, aunque para estos investigadores los resultados

obtenidos no fueran concluyentes. Metchnikoff utilizaba el *Bacillus bulgaricus* para reemplazar la microbiota digestiva afectada. Su uso fue de primera elección en las décadas del 10 al 30 en USA para el tratamiento de enfermedades digestivas aunque el mismo fue cayendo paulatinamente debido a que se comprobó que *B. bulgaricus* no sobrevivía en el colon, siendo sustituido por otras bacterias lácticas (Podolsky, 2012).

El apogeo de la terapia con lactobacilos termina con la aparición de las sulfas y se refuerza por el descubrimiento de la “promoción del crecimiento” de los antibióticos en los animales de producción al final de la década del 40. Sin embargo, ya en los años 50 los investigadores en el campo de la medicina advierten los potenciales efectos negativos del mal uso de antibióticos en el ser humano fueron puestos en evidencia con el advenimiento de las “superinfecciones” (por *Clostridium difficile* por ejemplo) puso aun más énfasis en el sobreuso y resistencia a los antibióticos. Esto marcaría el surgimiento de una era “post antibióticos” que se debió en gran medida a que el peligro de la liberación al ambiente de microorganismos resistentes que llevó a los investigadores a volver la mirada sobre la importancia de mantener o restablecer el equilibrio en la ecología microbiana proveyendo un terreno fértil para retomar el estudio acerca del efecto benéfico de los probióticos (Podolsky, 2012).

Los antibióticos se han usado durante décadas en el tratamiento de infecciones tanto en medicina humana como veterinaria, pero también en producción animal como estimulantes del crecimiento en bovinos, aves, suinos e incluso en la agricultura (Gaggia et al. 2010). La discusión usualmente se centra en la diseminación de los genes de resistencia a los antibióticos entre las comunidades bacterianas asociadas al huésped y al ambiente y entre patógenos lo que implica un gran problema en el tratamiento de enfermedades. También se debe tener en cuenta el efecto colateral de los antibióticos en el huésped y en la microbiota asociada. Los efectos colaterales de los antibióticos se definen como los efectos desconocidos, inexplicados o accidentales, secundarios al resultado esperado del uso del mismo (Looft & Allen, 2012).

La microbiota responde de forma distinta frente a distintos antibióticos. En base al análisis de la secuencia de genes del 16S rRNA en la comunidad microbiana intestinal se demostró que el uso de ciprofloxacina en seres humanos, afectó a la mayoría de la taxa bacteriana intestinal provocando una disminución del número y la diversidad de la microbiota (Dethlefsen et al. 2008). En contraste con la ciprofloxacina, el uso oral de vancomicina en ratones no disminuyó la abundancia de bacterias asociadas a la mucosa intestinal (Robinson & Young, 2010). En suinos, luego de la administración de clortetraciclina, sulfametazina y penicilina se observó un aumento de la población de *Escherichia coli* y de genes de resistencia a antibióticos en la microbiota intestinal (Looft et al. 2012). Este cambio también se observó con el uso de amoxicilina parenteral en lechones tratados al día de nacimiento, observándose un aumento de la población de enterobacterias, por ejemplo especies pertenecientes a los géneros *Escherichia*, *Salmonella* y *Shigella* (Janczyk et al. 2007). También se ha descrito un aumento de *E. coli* asociado al uso de otros antibióticos como amoxicilina con metronidazol en el ser humano (Antonopoulos et al. 2009) y ratas (Pélissier et al. 2010) y vancomicina e imipenem en la misma especie (Manichanh et al. 2010). Los efectos no deseados por el uso de antibióticos llevaron en los últimos años a la revalorización del uso de probióticos.

## Propiedades bacterianas asociadas al potencial probiótico

Entre las propiedades necesarias para que un microorganismo pueda ser considerado probiótico se incluyen la resistencia a pH ácidos y la supervivencia frente a la acción biliar. El microorganismo administrado oralmente, debe enfrentarse al medio gástrico en primer lugar y luego sobrevivir frente a la acción de la bilis en su pasaje por el medio entérico (Reid, 2001).

En un ensayo donde se utilizaron 9 cepas de *Lactobacillus plantarum* subespecie *plantarum* de diversos orígenes, se observó un efecto importante de la cepa así como de la concentración de bilis utilizada. Esto se debería en parte a la expresión de diferentes proteínas que darían protección contra el stress oxidativo, proveerían integridad a la envoltura celular y serían capaces de remover factores de stress asociados a la bilis (Hamonn et al. 2011).

Por lo menos son atribuidos cuatro mecanismos a los probióticos que explicarían sus efectos benéficos vinculados al control de microorganismos patógenos: a) antagonismo con patógenos a través de la producción de sustancias antimicrobianas (Vandenbergh et al. 1993; Nardi et al. 2005); b) competencia con otros microorganismos patógenos por los sitios de adhesión celular o nutrientes (Bernet et al. 1994; Rinkinen et al. 2003); c) inmunomodulación del huésped (Rinkinen et al. 2003); d) inhibición de toxinas bacterianas, siendo esta última propiedad más que nada atribuida a levaduras del género *Saccharomyces* (Brandão et al. 1998).

La producción de sustancias antimicrobianas por parte de los probióticos reduce la viabilidad de bacterias patógenas. La síntesis de ácido láctico o bacteriocinas puede inhibir el crecimiento de enteropatógenos como *Salmonella enterica* ser. Typhimurium (Casey et al. 2004; Casey et al. 2007) mientras que la capacidad de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sería necesaria por ejemplo para el control de la candidiasis vaginal en la mujer (Strus et al. 2005; Falagas et al. 2006). Otra vía para prevenir la colonización es la capacidad de los probióticos de interferir con la adhesión de patógenos en los receptores de las células mucosas.

Otra característica esperada para una bacteria probiótica es su habilidad para persistir y eventualmente multiplicarse en el tracto gastrointestinal como en el vaginal lo cual sería necesario para ejercer sus efectos benéficos. Una forma de medir la persistencia y multiplicación en el intestino es la recuperación de las bacterias probióticas en la materia fecal. Hay microorganismos como *Lactobacillus rhamnosus* GG que persisten por más tiempo en la mucosa intestinal con respecto al período durante el cual puede ser recuperado en heces. Esto se observó en biopsias de colon, teniendo una multiplicación mayor a la tasa de recambio del epitelio (Alander et al. 1999)

También son propiedades atrayentes de estos microorganismos la posibilidad de reducir el uso de antibióticos y el margen de seguridad en su uso. El margen de seguridad de los probióticos se ha comprobado en la mayoría de los trabajos pero también hay reportes que indican que su manejo debe ser cuidadoso ya que podrían actuar como agentes de diarrea luego de tratamientos prolongados con *Saccharomyces cerevisiae* (Milner et al. 1997) o pueden facilitar la adhesión de patógenos a la mucosa intestinal, como se ha demostrado con *Enterococcus faecium* en su interacción con *Campylobacter jejuni* (Rinkinen et al. 2003). En general se acepta que es deseable emplear cepas nativas que se adapten a sus nichos originales y que aseguren una buena persistencia y seguridad para su administración (Salminen et al. 1996).

La seguridad de la cepa utilizada con fines terapéuticos se puede controlar evaluando la concentración de los productos metabólicos del probiótico, la toxicidad aguda o subaguda de acuerdo a concentraciones administradas del mismo además de requerir otros estudios para su uso en clínica entre ellos la respuesta a la dosis (Salminen et al. 1996).

Sin embargo y a pesar de las propiedades benéficas halladas, el concepto de probiótico puede llegar a ser vago debido a numerosos aspectos; existe una gran cantidad de cepas y especies lo que arroja confusión sobre los resultados de ensayos realizados con cepas inadecuadamente identificadas o descriptas, donde no se pondera la calidad del almacenamiento y su pérdida de actividad o no hay ensayos donde se confronte una cepa versus un placebo (Klaenhammer, 2000).

Además, en el campo de la salud animal, existen compañías productoras de alimentos para mascotas que hacen uso incorrecto de los mismos ya que muchas veces no coincide el probiótico o concentración del mismo con lo declarado por el fabricante en la etiqueta y lo que se encuentra realmente en el producto (Weese et al. 2003; Weese & Martin, 2011).

Debido a la gran cantidad de cepas y especies, hay pocos trabajos realizados y se desconocen los efectos benéficos de la mayoría de ellas.

### **Probióticos y tratamiento de la diarrea**

Distintas cepas han sido evaluadas de acuerdo a su potencial probiótico y han sido recomendados tanto en el ser humano como en animales para el tratamiento o la prevención de enfermedades gastrointestinales cuyo signo principal es la diarrea (Isolauri et al. 1994; Gionchetti et al. 2000; Gionchetti et al. 2006).

Diversas cepas bacterianas han sido empleadas extensamente como probióticos en el tratamiento de diarreas de causa infecciosa, bacteriana y viral, solas o asociadas a antibióticos (Narayan et al. 2010). En 1917 durante la Primera Guerra mundial, Alfred Nissl aisló una cepa de *Escherichia coli* de heces de soldados que no desarrollaban enfermedad en un brote severo de shigelosis y los usó posteriormente con singular suceso en el tratamiento de enfermos de shigelosis o salmonelosis, a pesar de ser una cepa no perteneciente a las BAL (Nissle, 1959).

Otros ejemplos más modernos pueden ser el uso de probióticos en el tratamiento de las diarreas infantiles por rotavirus o asociadas al uso de antibióticos por *Clostridium difficile* (Ayyagari et al. 2003; Narayan et al. 2010). También se han usado probióticos en otras afecciones del tracto digestivo como las Enfermedad Intestinal Inflamatoria dando resultados promisorios en sus tratamientos en el ser humano (Meijer & Dieleman. 2011).

Está comprobado el efecto favorable de *Lactobacillus rhamnosus* GG en diarreas virales pero también otros lactobacilos como *Lactobacillus reuteri* pueden ejercer efectos beneficiosos. También se han usado para el tratamiento de la Enfermedad Intestinal Inflamatoria, Diverticulitis, Intestino Irritable e infección por *Helicobacter pylori* (Heczko et al. 2006).

Estos lactobacilos resultaron efectivos en la diarrea infantil por rotavirus. La colonización con *L. reuteri* disminuiría la inflamación por supresión de la quimiotaxis de monocitos y macrófagos y la activación celular mientras que *L. rhamnosus* GG actuaría mejorando las condiciones de la barrera intestinal mediante la inducción de la síntesis de proteínas citoprotectoras. Aunque sus acciones no estarían limitadas al tratamiento de diarrea por rotavirus como en el caso de *L.*

*reuteri* liberarían sustancias activas contra distintas cepas de *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Shigella sonnei* y *Salmonella enterica* (Petrof, 2009). El uso de probióticos desde el momento de aparición de la diarrea, reduciría en un día la duración de la afección (Huanget al. 2002) y lo mismo sucedería en caninos (Herstadet al. 2010).

## **Antecedentes específicos**

### **Probióticos y su uso en caninos**

A pesar del uso difundido tanto en el hombre como en los animales, existen muy pocos trabajos en los cuales se evalúe el uso de probióticos en caninos (Weese et al. 2002) y en particular su aplicación en la clínica (Herstadet al. 2010).

En caninos con cuadros de alergia y digestivos han sido usado probióticos con buen resultado. En un ensayo clínico controlado, fueron incluidos 36 caninos con diarrea usándose un probiótico preparado comercialmente con cepas de *Lactobacillus farcimis* de origen porcino, *Pediococcus acidilactici*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* del suelo y *Lactobacillus acidophilus* de origen humano. En este estudio se encontró que el tiempo entre el comienzo del tratamiento y la última deposición anormal fue significativamente más corto en el grupo tratado que en el grupo que recibió el placebo (Herstad et al. 2010).

El suministro de estos probióticos por vía oral en dicha especie aumenta la digestibilidad de las proteínas, la producción de lactato y reduce el pH en el íleon canino (Biourge et al. 1998). Cuando se administró *Lactobacillus acidophilus* cepa 13241 a caninos sanos se obtuvo una mejora en los parámetros hemáticos y en la IgG sérica así como un aumento del número de lactobacilos fecales y disminución de clostridios en la materia fecal (Baillon et al. 2004) aunque las cepas suministradas no colonizaron de forma permanente el tubo digestivo del canino donde preexiste una microbiota intestinal nativa (Manninen et al. 2006).

En la clínica de animales de compañía se ha comunicado el hallazgo de cepas resistentes de microorganismos con potencial zoonótico, lo que implica un riesgo para el hombre y para aquellos animales destinados a consumo debiéndose ser cuidadoso en la antibioticoterapia y reservar su uso a los casos en que sea absolutamente necesaria (Guardabassi et al. 2004).

En el ser humano se ha comprobado que el uso de probióticos acorta el periodo de recuperación en las diarreas por *Clostridium difficile* (Narayan et al. 2010; Ayyagari et al. 2003). Dicho microorganismo también es un agente etiológico de diarreas en caninos y felinos. En perros la diarrea por infección del *Clostridium difficile* tiene incidencias reportadas entre un 10 % y un 21 % de las mismas. (Markset al. 2011) sospechándose incluso que podría ser el agente del Síndrome de Diarrea Hemorrágica Aguda llegando a ser fatal en horas de aparecido el cuadro.

En los caninos el tratamiento de las diarreas y particularmente las secretorias, constituye una causa común de consulta y un desafío terapéutico ya que no existe un tratamiento etiológico en la mayoría de los casos, o cuando existe, el mismo lleva un período de tiempo tal que hace prolongando el estado de debilidad del animal. Enfermedades virales como Distemper o Parvovirus canino o parasitarias como giardiasis, cursan con este tipo de signos. Asimismo, por ser la diarrea un signo clínico común a muchas patologías, muchas veces se hace un uso

indiscriminado de antibióticos favoreciendo la emergencia de cepas de microorganismos resistentes y agravando el cuadro clínico por eliminación de la microbiota nativa o provocando sobrecrecimiento bacteriano cuando en realidad su uso está indicado en primera instancia ante un daño de la barrera mucosa que se evidencia por melena o hematoquezia.

En enfermedades cutáneas como la dermatitis atópica del perro, el uso de *Lactobacillus rhamnosus* disminuye los indicadores inmunológicos de dicha enfermedad (Marsella 2009). En cambio, el uso de *Enterococcus faecium* para el tratamiento de giardiasis, una afección parasitaria que es también una zoonosis, no demostró mayores beneficios que el uso de placebo en 20 perros adultos afectados por dicho protozoo parásito. Sin embargo, a pesar de estos resultados, la administración del microorganismo disminuyó la eliminación fecal de quistes y aumentó la respuesta inmune innata y adaptativa en modelos animales (caninos jóvenes y roedores) (Simpson et al. 2009).

Por lo expuesto es necesario contar con una ayuda terapéutica que mejore el estado del aparato digestivo del canino afectado, mejore su sistema inmune, que no altere o restablezca sus parámetros hemáticos a la normalidad, disminuya la necesidad de antibióticos y sea de bajo costo al mismo tiempo.

### **Probióticos y modulación de la respuesta inmune**

Los probióticos pueden actuar modulando tanto la respuesta inmune innata como la respuesta inmune adquirida (Delcenserie y col 2008).

Uno de los efectos inmunomoduladores de los probióticos se manifiesta por su acción en la inhibición de los productos proinflamatorios como por ejemplo citoquinas pero la respuesta puede ser variable dependiendo de la especie de microorganismo y la cepa empleada.

A nivel digestivo, la cepa de *L. rhamnosus* Lcr35 indujo respuestas modulatorias en las células dendríticas del sistema digestivo dependiendo de la dosis. Estas células actúan como presentadoras de antígeno y regulan la respuesta inmune adaptativa a la vez que inducen tolerancia e inmunidad. En ensayos in vitro, dicha cepa aumentaría la secreción de citoquinas, como la Interleukina 10 (IL-10) dependiendo de la dosis aunque esto por sí solo no explicaría su efecto inmunomodulatorio y la buena respuesta del uso de dicha cepa en el tratamiento del asma (Evrard et al. 2011).

Los probióticos estimulan la inmunidad a través de la secreción de inmunoglobulina A (IgA) intestinal en etapas tempranas de la vida en niños ayudando a la prevención de enfermedades intestinales por antígenos alimentarios como alergias y diarreas (Grönlund et al. 2000; Viljanen et al. 2005). El suministro de *L. rhamnosus* (*Lactobacillus* GG) durante 4 semanas en niños con síndromes dérmicos provocó un aumento significativo de IgA secretoria en el intestino contribuyendo a mejorar su recuperación (Viljanen et al. 2005).

Otra característica que puede merecer ser estudiada en los probióticos es su ventaja comparativa en relación al uso de antibióticos. En este sentido Soifer et al. (2010) encontraron que aquellos pacientes que padecían de sobrecrecimiento bacteriano intestinal y distensión abdominal crónica respondían mejor al tratamiento con probióticos (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus faecalis* y *Bifidobacterium brevis*) que al uso de metronidazol. Esto abre un campo de enorme potencialidad ya que así se podría usar de forma más

acotada los antibióticos lo que disminuiría el riesgo de seleccionar microorganismos resistentes ; esta resistencia podría ocurrir incluso en el caso de cepas de probióticos aunque sin aparente relevancia clínica (Klein, 2011).

La FAO/OMS en el año 2002, determinó guías para el desarrollo y la evaluación de probióticos. Las recomendaciones incluyen (1) que se cuenten con métodos apropiados para la identificación del género, especie y cepa del probiótico, (2) test *in vitro* para evaluar el potencial probiótico del microorganismos y que se puedan relacionar con resultados *in vivo* (3) estándares que aseguren que la cepa es segura y libre de contaminación, (4) ensayos *in vivo* en animales o seres humanos (ensayos clínicos) para evaluar los beneficios de la cepa en estudio y (5) guías de conservación, número mínimo de microorganismos viables al fin de su almacenamiento recomendado (Reid, 2005).

## **Translocación**

Al tratarse de microorganismos vivos se debe siempre tener en cuenta su potencial capacidad de atravesar las barreras biológicas y colonizar otros órganos pudiendo provocar cuadros sépticos graves. Esto se debe a la capacidad de translocación que pueda tener el microorganismo. La translocación se define como el pasaje de microorganismos viables, no viables o productos bacterianos como las endotoxinas a través de la barrera anatómica gastrointestinal intacta (Jeppsson et al. 2004). Para que ello ocurra debe haber pérdida de la integridad de las barreras naturales o un grado de compromiso demostrable o no. Varias especies perteneciente al género *Lactobacillus* son capaces de provocar bacteriemia en el hombre y patologías como endocarditis, neumonía o septicemia (Salminen et al. 2006; Yazdankhah et al. 2009) respondiendo a la antibioticoterapia en la mayoría de los casos (81% de los casos) (Salminen et al. 2006). En la perspectiva entonces de la evaluación de una cepa como potencial probiótico es importante por lo dicho que no transloque pero a su vez como beneficio, que impida translocar a otros microorganismos patógenos. Esta última capacidad es tema de controversia aunque en casos de pancreatitis aguda los probióticos parecen disminuir las complicaciones de infecciones (Olahet al. 2002 y 2007) pudiendo ocurrir lo mismo en pacientes con trasplantes hepáticos, comparado con otros métodos de prevención (Raveset al. 2002).

## ***Lactobacillus murinus* como potencial probiótico**

*L. murinus* es uno de los componentes más importantes de la microbiota dominante en tracto digestivo de rata, ratón y perro (Rinkinen y col 2004). Cepas de este microorganismo han demostrado actividad inhibitoria sobre *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* entre otros patógenos pero no actuaría sobre otras BAL, siendo además productor de ácido láctico y de fracciones de fenilalanina y heptosas aún no bien identificadas, con actividad antimicrobiana (Nardiet al. 2005).

Entre estas han sido reportados peróxidos, bacteriocinas, ácido láctico y sustancias antibióticas. Esta batería de sustancias afecta a una diversidad de

microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos pero no afectaría otras cepas de *Lactobacillus* spp. (Nardi et al., 2005).

También se ha aislado *L. murinus* de la leche de perras Boston terrier, Cocker spaniel, Dálmatas y Golden retriever. Las concentraciones de *Lactobacillus* de diferentes especies en las perras fue similar a las encontradas en la mujer entre (1,3 a 6,1 x 10<sup>2</sup> unidades formadoras de colonias (UFC) /mL) aunque en los aislamientos realizados en leche ninguna cepa produjo bacteriocinas a diferencia de Nardi et al. (2005). Muchas de las especies identificadas en la leche canina dentro de la que se encuentran los lactobacilos también se encuentran en las heces, existiendo entonces un patrón de especificidad del individuo. Esto indicaría que la principal fuente de *Lactobacillus* spp. para el cachorro sería la leche materna (Martín et al., 2010).

Por lo tanto el uso de un probiótico que sea componente natural de la microbiota del perro y que tenga muchas de estas capacidades comprobadas sería una herramienta que contribuiría a evaluar la capacidad probiótica y mejorar la inmunidad animal. *L. murinus* cumpliría con muchas de las características anteriormente nombradas como BAL integrante de la microbiota intestinal de los caninos aunque no se conoce el potencial probiótico in vivo.

## **HIPOTESIS**

Las microbiotas nativas cumplen funciones beneficiosas para el mantenimiento de la salud del huésped. En particular, la microbiota intestinal canina posee microorganismos que pueden ser útiles para la promoción de la salud al tener funciones como probióticos a través de la modulación del sistema inmunitario y el posible control de distintos procesos patológicos.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar la persistencia en el medio intestinal de una cepa canina nativa de origen fecal de *Lactobacillus murinus* LbP2 así como su capacidad probiótica por medio de la modulación de IgA fecal y su efecto en el tratamiento de las diarreas virales por Distemper.

### **Objetivos específicos**

Evaluar la persistencia de una cepa nativa potencialmente probiótica de *L. murinus* LbP2 en el intestino canino.

Ya que no se conocen sus efectos sobre los parámetros hemáticos compararlos entre animales sanos tratados con probiótico y placebo al inicio y luego de 5 días del tratamiento y evaluar la recuperación del microorganismo en la materia fecal.

Determinar si existe translocación intestinal de *L. murinus* LbP2 en animales sanos.

Determinar los niveles de IgA fecal total en caninos sanos tratados con *L. murinus* LbP2.

Evaluar el efecto del probiótico sobre el curso de diarrea de origen viral provocada por Distemper canino entre animales afectados tratados con probiótico y con placebo de acuerdo a un score.

Comparar los parámetros hemáticos entre animales afectados tratados con probiótico y placebo al inicio y luego de siete días del tratamiento.

Comparar el nivel de proteínas séricas totales y de albúmina entre animales afectados tratados con probiótico y con placebo al inicio y luego de siete días del tratamiento

## **ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**

En el presente estudio se realizaron tres ensayos con el fin de evaluar diversos aspectos vinculados con la potencial actividad probiótica de la cepa nativa canina de origen fecal *Lactobacillus murinus* LbP2: ensayo de la capacidad colonizadora de *L. murinus* suministrado a caninos sanos por vía oral, evaluación del efecto de *L. murinus* en la producción de IgA intestinal y ensayo clínico para evaluar el efecto en la evolución de diarreas virales. Evaluación de parámetros hemáticos y séricos en los tres ensayos en animales tratados y control.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas bacterianas

Para el ensayo de evaluación de la capacidad colonizadora de *L. murinus* se empleó una cepa mutante espontánea resistente a rifampicina (LbP2-RR) generada a partir de *L. murinus* LbP2 en el Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (Perelmuter et al., 2011).

Para el ensayo clínico y la evaluación de la inducción de IgA total fecal se usó la cepa canina nativa de origen fecal de *L. murinus* LbP2, aislada de materia fecal de un canino sano. Su identificación molecular se realizó mediante extracción de ADN, PCR y posterior secuenciación del gen que codifica para el rADN 16S, comparándose posteriormente las frecuencias obtenidas con la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology (NCBI) (Perelmuter et al., 2008).

### Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

El cultivo de la cepa LbP2 se realizó en forma rutinaria en el medio Mann-Rogosa-Sharpe (MRS) (peptona 1%, extracto de levadura 0.5%, glucosa 2%, Tween 80 0.1%, fosfato dipotásico 0.2%, acetato de sodio 0.5%, citrato de amonio 0.2%, sulfato de magnesio 0.02%, sulfato de manganeso 0.005%, pH 6.2-6.5) en forma de caldo o en agar (1.5%) a 37 °C en condiciones de microerofilia (Perelmuter et al. 2008).

La cepa mutante de *L. murinus* LbP2-RR, usada en el ensayo de estabilidad y capacidad colonizadora fue obtenida a partir de una siembra de 100 µl de un cultivo de una noche en un caldo Mann-Rogosa-Sharpe de una cepa de *L. murinus* LbP2 (Perelmuter y col, 2008) en placa de MRS-rifampicina agar con un gradiente de concentración de 0 a 100 µg/ml (Eisenstadt et al., 1994). Se seleccionó una colonia que fue sembrada en caldo MRS-rifampicina (80 µg/ml) e incubada por 24 horas a 37°C. Una alícuota de 100 µl de este cultivo fue transferida a una placa conteniendo MRS suplementado con rifampicina 200 µg/ml y se incubó por una noche a 37°C. Por último, una colonia recuperada en este medio se transfirió a MRS agar para obtener un cultivo puro de una mutante de LbP2 resistente a rifampicina. Esta cepa se conservó a -80°C en caldo MRS-rifampicina suplementado con 15% de glicerol como crioprotector. Para evaluar su estabilidad mutante, un inóculo de 10<sup>5</sup> UFC por ml de LbP2-RR cultivada en MRS suplementado con 100 µg de rifampicina por ml fue cultivado durante una noche en MRS y MRS agar/rifampicina y contadas las colonias. Así mismo se evaluó el crecimiento y sobrevivencia de la colonia mutante en concentraciones de sales biliares a concentración de 0, 0.3 y 1%.

Para evaluar la posible translocación de la cepa LbP2-RR desde el tracto digestivo al torrente sanguíneo, se realizaron hemocultivos en caldo MRS-rifampicina los días 0 y 4 del ensayo, a partir de sangre de todos los perros empleados en el ensayo de capacidad colonizadora de *L. murinus* LbP2-RR en condiciones de microaerofilia a 37°C.

## **Liofilización y estabilidad de *Lactobacillus murinus***

Con el fin de identificar posibles métodos de preservación de la cepa bacteriana seleccionada, se evaluó el comportamiento de *L. murinus* LbP2 a lo largo del proceso de liofilización para ser utilizado en la prueba clínica.

A partir de un *stock* en medio MRS/glicerol 12% conservada a -80°C, LbP2 se sembró en placa con Mann-Rogosa-Sharpe para su recuperación, cultivándose por 24 horas. Luego se sembró en matraces con caldo MRS en condiciones de microaerofilia por otras 24 horas a 37°C y se realizó un primer recuento para determinar su concentración con  $1,6 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias (UFC)/ml.

De acuerdo a los resultados de los recuentos bacterianos, los cultivos se centrifugaron con el fin de recuperar las bacterias y se resuspendieron en la tercera parte del volumen en leche descremada suplementada con distintas concentraciones de glicerol (5 y 10%) con el fin de evaluar las mejores condiciones de preservación.

También se compararon dos tipos de leche, Difco y Conaprole, como componentes del medio de liofilización.

El liofilizado se realizó en un equipo Labconco Freezone Stoppering Tray Dryer, perteneciente al Laboratorio Veterinario Miguel Rubino del MGAP, a una temperatura de -40°C y a un vacío de 0,133 mBar de presión pasando por las etapas de congelamiento, sublimación y desorción de todas las muestras procesadas de acuerdo al proceso.

Luego de la liofilización, los viales se conservaron a 4°C y a temperatura ambiente y se controló su estabilidad a las 2, 3 y 6 semanas y 3 y 6 semanas respectivamente. Además se realizaron controles de contaminación. Para ello se usaron viales con TSB junto con el resto de los viales a liofilizar los que se mantuvieron a 37°C durante 14 días.

## **Poblaciones caninas**

### *Ensayo de capacidad colonizadora de *L. murinus* LbP2-RR*

En este ensayo se usaron 7 caninos de raza Cocker spaniel, 4 hembras y 3 machos de 7 años de edad, propiedad del Departamento de Nutrición de la Facultad de Veterinaria.

El peso de los animales se controló una semana antes de comenzar el ensayo y en los días 1 y 23 del mismo. En la semana previa al comienzo de la prueba, los caninos fueron tratados con amoxicilina, 20 mg/kg durante 4 días para homogenizar la microbiota entérica antes de suministrar la cepa de *Lactobacillus murinus* LbP2-RR.

Los animales fueron separados en 2 grupos de 3 y 4 caninos (grupos control y tratado respectivamente). A todos los animales se les suministró alimento seco balanceado Purina Excellent (Purina, Mo, USA) a razón de 270 gramos por animal por día una sola vez y se controló el consumo diario de la ración y su rechazo además de las características de las deposiciones. El agua potable se le suministró *ad libitum*.

Desde el día 0 al día 4 del ensayo se le suministró a cada uno de los 4 ejemplares del grupo tratamiento una suspensión de 2 ml de LbP2-RR en solución tampón salina fosfatada (PBS, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3mM, NaCl 140mM) estéril conteniendo 5 x 10<sup>9</sup> UFC a partir de un cultivo del de 24 horas en caldo MRS. Al grupo testigo se le suministraron 2 ml de PBS estéril, en el mismo período de tiempo.

Se tomaron muestras de materia fecal de la ampolla rectal de cada uno de los individuos entre los días 0 y 7 del ensayo y en los días 14 y 21. De cada una de las muestras se tomó 1 g de materia fecal y se homogeneizó en 10 ml de PBS estéril realizándose posteriormente los cultivos para recuento bacteriano.

#### *Evaluación del efecto de L. murinus sobre la IgA total fecal*

En este ensayo se emplearon 7 caninos sanos entre 3 y 7 años de edad, 2 machos (1 de raza Cocker y 1 mestizo) y 5 hembras (3 de raza Cocker y 2 mestizas) los cuales presentaron un rango de edades entre 2 y 8 años. Los mismos fueron alimentados una vez al día con 270 gramos de una ración comercial (Royal Canin Argentina) comenzando el suministro 10 días antes del ensayo. Los perros fueron pesados y se les controló las deposiciones desde el inicio hasta el final del tratamiento (día 0 a 16). Los animales fueron medicados con amoxicilina, 20 mg/kg/día durante 4 días previo al inicio del tratamiento con el fin de homogeneizar la microbiota.

Los caninos fueron tratados en forma oral con una suspensión de 3 ml de *L. murinus* LbP2 conteniendo 5 x 10<sup>9</sup> UFC (Perelmuter *et al.*, 2008) o con 3 ml de PBS, en días alternos durante 2 semanas (8 dosis en los días 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14).

Para preparar la suspensión bacteriana, se cultivó *L. murinus* LbP2 en caldo MRS durante 48 horas, se realizaron 2 lavados y resuspendido en PBS a la concentración adecuada.

Las muestras de materia fecal fueron tomadas de la ampolla rectal de cada canino al día 0 de tratamiento y al día 16, dos días luego de la última dosis. Las mismas se suspendieron en PBS suplementada con ácido etilendiaminoteracético (EDTA) y fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0.5 mM para inhibir la actividad de las proteasas fecales en una proporción 1:4 de materia fecal en PBS (Sainzet *al.* 2002). Luego, las muestras fueron homogenizadas en un Vortex a velocidad máxima por 30 minutos a 4 °C y posteriormente centrifugadas durante 20 minutos a 10.000 g y a 4°C. El sobrenadante fue colectado y congelado a -80°C.

Se utilizó un grupo control de 6 animales en un rango de edades igual al grupo tratado que se les suministró 3 ml de PBS en días alternos durante 2 semanas también.

#### *Ensayo clínico para evaluar el efecto del potencial probiótico en la evolución de diarreas virales*

Para este ensayo clínico se emplearon caninos que concurren a consulta a la Policlínica del Hospital de la Facultad de Veterinaria, a partir de los 60 días de edad y que presentaban diarrea de etiología viral. Dentro de las diarreas de origen viral se incluyeron los animales afectados por Distemper en un total de 20. Para

ello se usaron pruebas de diagnóstico rápido por el método de ELISA (ISU ABXIS CO., LTD. Corea) para dicha enfermedad.

Se confeccionó una escala para evaluar la evolución de la enfermedad y permitir una comparación objetiva de la evolución y respuesta al tratamiento en los 5 días. Dicha escala se eBALoró en base a 5 ítems: sensorio, apetito, consistencia de las heces, frecuencia de defecación y vómito.

Se asignaron valores de 0 y 1 a cada ítem de acuerdo a si el Sensorio estaba deprimido (0) o normal (1); Apetito disminuido o ausente (0) o normal o recuperándose (1); Consistencia de las heces blandas a líquidas (0) o normales habituales (1); Frecuencia de las deposiciones diarias 3 o más de 3 (0) o menos de 3 (1); si hay vómitos (0) o ausencia de los mismos (1). El máximo para cada animal fue de 5 y el mínimo fue 0.

Por otra parte, la asignación del tratamiento se realizó en forma aleatoria. Tanto el probiótico como el placebo se suministraron en forma liofilizada reconstituyéndose con solución fisiológica y aplicándose por vía oral durante 5 días. Todos los casos fueron tratados de forma ambulatoria.

Los criterios de exclusión empleados fueron los siguientes: animales con debilidad grave, mal estado nutricional o con estados de conciencia afectado (coma o estupor). También se descartaron aquellos animales que en las 72 horas previas pudieran haber sido tratados con antibióticos, corticoides, probióticos o con otros medicamentos que el propietario no pudiera aportar datos al momento de la anamnesis.

Cuando fue necesario se aplicó fluidoterapia con solución de Ringer con lactato entre 40 a 60 ml /kg/día más el volumen calculado por deshidratación y pérdidas por vómitos y/o diarrea en todos los casos y metoclopramida 1 mg I/V por día como antiemético en los casos que presentaron vómitos.

Como soporte nutricional se empleó a/d <sup>TM</sup> Canine/Feline (Hill's) para aquellos perros que mantenían apetito.

### **Parámetros hemáticos y séricos**

En todos los casos, los análisis de parámetros hemáticos o séricos se realizaron en el BALoratorio de Análisis Clínicos del Hospital Veterinario, Facultad de Veterinaria (UdelaR). Las muestras fueron tomadas de las venas cefálicas en todos los casos, en volúmenes de 2.5 ml con EDTA como anticoagulante para hemogramas y tubos secos para el resto de los estudios séricos.

Los análisis realizados en cada ensayo se mencionan a continuación.

#### *Ensayo de capacidad colonizadora de *L. murinus* LbP2-RR*

Se tomaron muestras de sangre para hemograma y medición de colesterol y proteínas totales los días 0, 7 y 14 del ensayo.

#### *Ensayo clínico para evaluar el efecto de un potencial probiótico en la evolución de diarreas asociadas a Distemper canino*

Se extrajo sangre a todos los caninos (sometidos a los dos tratamientos) en los días 0 y 6 para realizar hemograma y medir proteínas séricas totales y albúmina.

## **Determinación de IgA en materia fecal**

Para la determinación de IgA total fecal canina se usó un kit de ELISA de inmunoperoxidasa comercial de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Immunology Consultants BALoratory, Newberg, USA).

Las heces se procesaron de acuerdo a lo expuesto anteriormente con el fin de obtener el sobrenadante para el análisis. En primer lugar se realizaron diluciones 1:4000 de las muestras de sobrenadante fecal en el diluyente provisto por el fabricante. Paralelamente se realizaron siete diluciones con el patrón de IgA provisto por el fabricante de 0 a 1000 ng/ml.

Se colocaron 100 µl de las muestras y de las diluciones del patrón de IgA por duplicado en la placa de microtitulación sensibilizada con IgA y se incubó a temperatura ambiente durante media hora.

Luego de tres lavados se colocaron 100 µl de conjugado de peroxidasa de rábano en cada pocillo y la placa se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz. Por último se le agregó la solución cromogénica (sustrato, 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine (TMB) y peróxido de hidrógeno en buffer de ácido cítrico, pH 3.3) en cada pocillo y luego de diez minutos de incubación la reacción se detuvo mediante el agregado de una solución de ácido sulfúrico 0,3 M.

La absorbancia se determinó a una longitud de onda de 450 nm en un lector de placas Varioskan Flash Plate Reader (Thermo Scientific, Asheville, NC, USA).

Para determinar los valores de IgA fecal se construyó una curva logística de cuatro parámetros en base a los resultados de absorbancia de las diluciones del patrón, interpolándose los valores correspondientes a las muestras problema.

Los resultados fueron expresados como mg de IgA por gramo de materia fecal.

## **Análisis estadístico**

En el ensayo de estabilidad y capacidad colonizadora de la cepa LbP2-RR se usó el test de ANOVA para comparar los resultados hemáticos entre los grupos y fueron consideradas diferencias estadísticas significativas cuando  $P < 0.05$ .

Para el ensayo de evaluación de la IgA fecal total se usó el test no paramétrico de Wilcoxon con el fin de comparar las variaciones de las muestras pareadas.

En el ensayo clínico se utilizó el test de Wilcoxon para comparar los *scores* clínicos en los grupos y el test U de Mann-Whitney para comparar los *scores* entre el grupo que recibió PbP2 y aquel que recibió el placebo.

Para comparar los parámetros sanguíneos en el ensayo clínico en el grupo de animales afectados con Distemper tratados con el probiótico y el grupo placebo se usó el test de t de Student para muestras pareadas.

Las diferencias estadísticas fueron consideradas como significativas cuando el valor de P fue  $< 0.05$ .

Se usó el software estadístico PAST (Paleontological Statistics) disponible en <http://folk.uio.no/ohammer/past/>.

## Resultados

### *Ensayo de capacidad colonizadora de L. murinus LbP2-RR*

#### Estabilidad de la cepa mutante LbP2-RR

Antes del ensayo *in vivo* de persistencia en el tracto intestinal, se evaluó la estabilidad de la mutación por medio de cultivos y recuentos en MRS-rif y MRS sin modificar. No se observaron diferencias entre los valores de recuentos bacterianos obtenidos en ambos medios de cultivo (datos no mostrados).

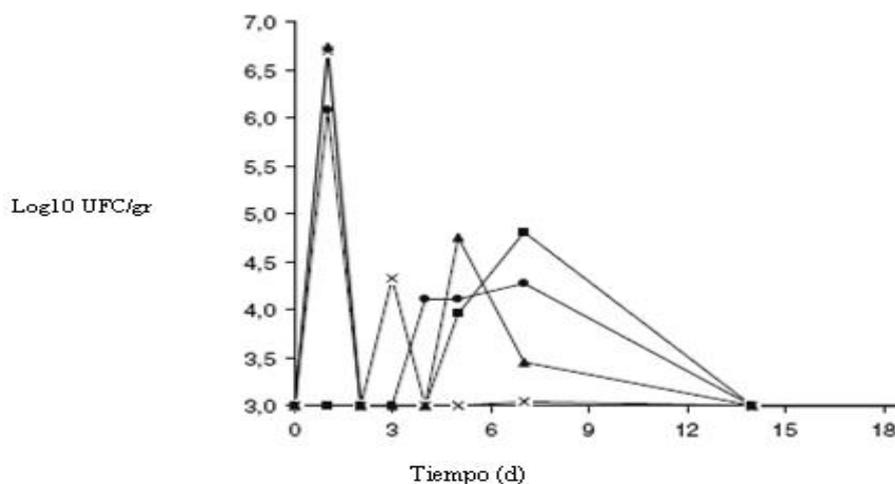
#### Persistencia de LbP2-RR en el tracto intestinal

La recuperación de la cepa LbP2-RR de las heces de los caninos tratados fue variable entre los diferentes días del muestreo.

La cepa fue detectada en todos los animales del grupo tratado al menos hasta el día 7 de comenzado el tratamiento y dos veces al menos en cada animal tratado a lo largo del ensayo. En el día 14, LbP2-RR ya no fue detectada en ninguno de los animales del grupo tratado con el probiótico (n= 4) (Fig.1).

Cuando se realizó el recuento bacteriano a partir de heces de los animales del grupo testigo, no hubo recuperación de la cepa LbP2-RR.

**Fig. 1.** Recuperación de la cepa *L. murinus* LbP2-RR (en log UFC/g) durante el ensayo en los 4 animales del grupo tratado. En el día 14, LbP2-RR no se recuperó en ninguno de los caninos tratados.



### Evolución del peso de los animales

Los pesos de los animales no variaron en forma significativa tanto en el grupo testigo (sin tratamiento) como en el grupo tratado con *L. murinus* LbP2-RR a lo largo del ensayo ( $p > 0,05$ ). En el primer grupo los pesos se mantuvieron entre kg 10,6 y 14,4 al día -7 y kg 10 a 12 al día 23. En los animales del grupo que recibió el tratamiento, los pesos de partida se hallaron entre kg 11,4 a 16,6 llegando al día 23 a un rango de kg 11,5 y 15,5 al final del ensayo.

### Consumo del alimento

El consumo de alimento se consideró aceptable a lo largo del ensayo salvo en el caso de un canino del lote testigo que lo rechazó durante los dos últimos días del período. Su variación de peso fue de kg 14,4 a 12 kg. En el lote tratado, uno de los caninos presentó deposiciones diarreicas en los días segundo y cuarto rechazando su alimento el último día del ensayo. Su peso varió de kg 16,3 a 15,5.

### Evaluación de la translocación bacteriana

Las muestras de sangre fueron tomadas de cada canino para evaluar la posibilidad de que las bacterias translocaran desde el tracto intestinal a la circulación general y fuera detectada en sangre periférica. En ninguno de los casos se detectó crecimiento bacteriano alguno luego del cultivo en caldo MRS/rifampicina.

### Parámetros hemáticos

En cuanto a los parámetros hemáticos de los caninos empleados en el ensayo (hemograma, colesterol y proteínas totales) no se encontraron diferencias significativas a lo largo del tratamiento entre el grupo tratado y el grupo control (Tabla I).

Al analizar los hemogramas, los valores de hemoglobina y hematocrito se ubicaron dentro de los parámetros de referencia para el BALoratorio (hematocrito de 37 a 55% y hemoglobina de 12 a 16.3 g/dl) en ambos grupos. Las medias de los valores de los distintos leucogramas fueron normales para los rangos de referencia; los valores estimados se encontraron entre 9000 a 17000 leucocitos por  $\text{mm}^3$ , neutrófilos 60 a 65% y linfocitos entre 12 a 30% (Tablas I y II).

**Tabla I.** Valores del hemograma, proteínas totales y colesterol en el grupo de caninos tratados con *L. murinus* LbP2-RR durante el ensayo de capacidad colonizadora. Los valores se expresan como medias y desvíos estándar. (n=4)

Parámetro	Día 0 LbP2 RR+	Día 4 <i>LbP2 RR+</i>	Día 7 LbP2 RR+	Día 14 LbP2 RR+
Proteínas totales (g/dl)	S/D	5.93±0.41	5.88±0.17	6.72±0.99
Colesterol (mg/dl)	S/D	179.58±17.75	191.49±43.65	220.40±40.69
Globulinas (g/dl)	S/D	1.91±0.55	2.05±0.06	2.74±1.02
Albumina (g/dl)	S/D	3.93±0.54	3.83±0.17	3.91±0.26
Leucocitos (mm <sup>3</sup> )	9015±1153	9854±1097	15733±9737	10904±2137
Neutrófilos (%)	59.83 ± 5.57	67.53 ± 12.01	62.69 ± 7.35	65.30 ± 5.74
Linfocitos (%)	22.93 ± 6.81	21.82 ± 8.77	24.63 ± 8.14	23.95 ± 6.40
Monocitos (%)	4.64 ± 4.04	1.00 ± 0.00	2.62 ± 0.58	2.38 ± 1.5
Eosinófilos (%)	10.05 ± 4.04	4.12 ± 3.70	8.05 ± 4.11	6.89 ± 2.63
Hematócrito (%)	42.86 ± 4.36	46.96 ± 2.16	36.69 ± 4.11	43.20 ± 2.50
Hemoglobina (g/dl)	12.01 ± 1.39	11.86 ± 0.68	13.38 ± 0.85	11.72 ± 1.20

S/D: sin datos

**Tabla II.** Valores sanguíneos en el grupo de caninos control tratados con PBS estéril durante el ensayo. Los valores se expresan como medias y desvíos estándares. (n=3)

Parámetro	Día 0 LbP2RR-	Día 4 LbP2RR-	Día 7 LbP2RR-	Día 14 LbP2RR-
Proteínas totales (g/dl)	S/D	5.61±0.75	5.66±0.52	6.79±1.39
Colesterol (mg/dl)	S/D	203.49±34.5	196.63±32.72	222.42±24.54
Globulinas (g/dl)	S/D	1.53±0.17	1.63±0.77	3.44±1.16
Albumina (g/dl)	S/D	5.13±0.89	3.89±0.25	3.30±0.24
Leucocitos (mm <sup>3</sup> )	11365±797	10728±10671	14167±808	13816±144
Neutrófilos (%)	51.18 ± 22.56	78.13 ± 10.97	69.66 ± 1.15	71.63 ± 0.09
Linfocitos (%)	20.66 ± 8.02	13.57 ± 8.66	19.33 ± 0.58	18.02 ± 6.35
Monocitos (%)	3.30 ± 2.08	1.00 ± 0.00	3.63 ± 0.58	3.00 ± 0.00
Eosinófilos (%)	8.36 ± 4.00	4.82 ± 1.73	7.27 ± 1.15	8.32 ± 0.58
Hematócrito (%)	40.98 ± 1.73	41.26 ± 2.89	40.90 ± 1.15	37.62 ± 2.31
Hemoglobina (g/dl)	12.11 ± 1.02	12.09 ± 0.46	26.27 ± 58.23	11.50 ± 0.00

S/D: sin datos

### Evaluación del efecto de *L. murinus* en IgA fecal total

En primer lugar, no se detectaron cambios en la condición corporal, peso de los animales, consistencia fecal y en su estado general de salud. Para esto último se les realizó un examen objetivo general a cada animal, no encontrándose alteraciones a la revisión.

La curva standard construida usando los valores de absorbancia correspondiente a cantidades conocidas de IgA fecal mostró un valor de ajuste de  $r^2$  de 0.9762.

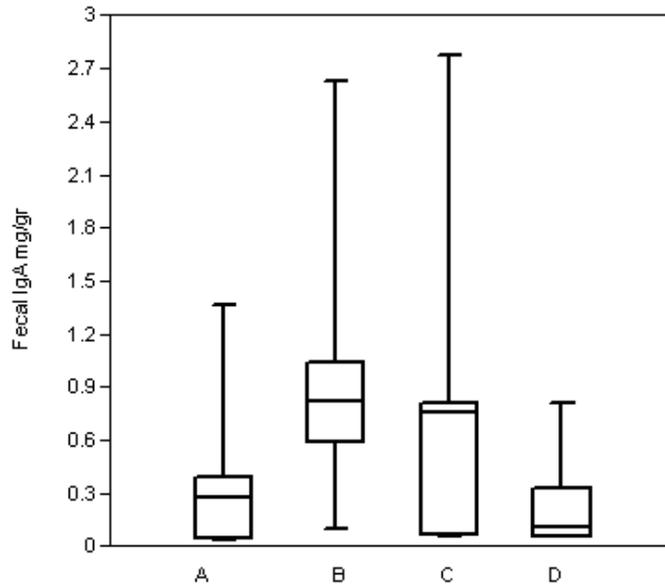
Los valores de IgA fecal inmediatamente antes del tratamiento se encontraron dentro de un rango de 0.037 y 1.36 mg/gr de materia fecal (media 0.424 mg/gr; mediana 0.269). El aumento de la IgA fecal se observó en los siete perros luego de la aplicación del tratamiento con el probiótico. El rango de IgA encontrado inmediatamente después de la administración de *L. murinus* LbP2 fue entre 0.581 a 2.62 mg/gr de material fecal (media 1.10 mg/gr; mediana 0.82) (Fig 2). El aumento post tratamiento de los valores de IgA fecal fue significativo comparado para aquellos obtenidos previo al comienzo del mismo utilizando el test no paramétrico de Wilcoxon ( $p = 0.01796$ ).

Los valores de IgA fecal hallados en los caninos tratados únicamente con PBS (testigo) se ubicaron en un rango entre 0.05 y 2.77 mg/ gr (media 0,82 mg/gr; mediana 0,62) al inicio. Al finalizar el ensayo los valores de IgA se encontraron entre 0.05 y 0,32 mg/gr (media 0,23 mg/gr; mediana 0.09) ( $p > 0.05$ ) (Tabla III) (Figura 2).

**Tabla III.** Valores de cada animal de IgA fecal en mg/gr de materia fecal de los caninos tratados con *L. murinus* LbP2 y grupo control con PBS.

Tratados con <i>L. murinus</i> LbP2		Grupo control	
Día 0	Final	Día 0	Final
0.366	0.581	0.06	0.101
0.127	0.584	0.75	0.32
0.038	0.096	0.49	0.08
0.385	0.821	2.77	0.05
0.269	1.04	0.05	0.055
0.037	1.01	0.81	0.81
1.36	2.621		
$p=0.01796$		$p>0.05$	

**Figura 2.** Box plot donde se comparan las concentraciones de IgA fecal por gramo de materia fecal. A y B grupo tratado. A previo al tratamiento; B posterior al tratamiento. C y D grupo control. C previo al tratamiento; D posterior al tratamiento.



*Ensayo clínico para evaluar el efecto de un potencial probiótico en la evolución de diarreas virales*

#### Estabilidad de la preparación bacteriana sometida a liofilización

En primer lugar se evaluó la viabilidad de *L. murinus* LbP2 sometida al proceso de liofilización, para ser empleada en el ensayo. Los preparados fueron controlados en los días 12, 19 y 33 luego de la liofilización por medio de recuento en placa.

En general se pudo observar que los valores de UFC de LbP2 recuperadas se mantuvieron a lo largo del tiempo durante un mes aproximadamente. (Tabla IV)

No se observaron diferencias entre los efectos crioprotectores de leche descremada DIFCO y leche descremada comercial (CONAPROLE). Sin embargo, sí se notaron diferencias entre los recuentos de los preparados conservados a 4 °C y a temperatura ambiente. Estos últimos resultaron unos dos órdenes menores que aquellos refrigerados al ser controlados a los 7, 14, 21 y 30 días del proceso de liofilizado. Estos resultados indicaron que la preservación por medio de la liofilización puede ser un medio apropiado para la conservación del probiótico. (Tabla IV)

**Tabla IV.** Viabilidad de *Lactobacillus murinus* LbP2 liofilizado, bajo diferentes condiciones de conservación.

Medio y temperatura	Recuperación de <i>Lactobacillus murinus</i> LbP2 (UFC/ml)			
	Previo al liofilizado	12 días	19 días	33 días
Leche Difco a 4 °C	1,6 x 10 <sup>7</sup>	5 x 10 <sup>7</sup>	8,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>8</sup>
Leche comercial a 4 °C*	1,6 x 10 <sup>7</sup>	1,4 x 10 <sup>8</sup>	9,7 x 10 <sup>7</sup>	1 x 10 <sup>8</sup>
Difco a TA <sup>+</sup>	1,6 x 10 <sup>7</sup>	ND	9 x 10 <sup>6</sup>	8,7 x 10 <sup>6</sup>
Leche comercial a TA	1,6 x 10 <sup>7</sup>	ND	6 x 10 <sup>6</sup>	4,9 x 10 <sup>6</sup>

\* Leche en polvo Conaprole

<sup>+</sup> TA: temperatura ambiente

ND: no se disponen de datos.

### Score clínico

En total se incluyeron en el ensayo 20 animales con diagnóstico de Distemper canino por test de ELISA, realizado en el momento de ingreso del animal a la consulta.

A 13 animales se le suministró el probiótico como tratamiento durante los 5 días definidos más arriba, de los cuales uno murió a las 72 horas de iniciado el ensayo. De los 12 animales tratados con LbP2 que finalizaron el ensayo, 7 animales mejoraron su score general final comparado con el inicial, uno lo desmejoró y 3 lo mantuvieron igual a lo largo del ensayo. Este resultado fue significativo de acuerdo al test no paramétrico de Wilcoxon, con un valor de  $p=0,027786$  (Tabla V).

**Tabla V.** Resultado del score clínico total por animal y por signo clínico en caninos tratados con *Lactobacillus murinus* LbP2. (n= 12)

	Sensorio		Apetito		Heces		Frecuencia de deposiciones		Vómitos		Score total*	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
1/09	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
2/09	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	5
3/09	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	5
4/09	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	5
5/09	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	2	4
6/09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7/09	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	2	3
8/09	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	3	3
9/09	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2
10/09	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	2	3
11/09	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
1/10	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2
Total	3	5	1	5	1	5	4	7	7	8	16	33
P=	0.025347		0.0455		0.0455		0.083265		0.65472		0.027786	

A: antes del tratamiento. D: después del tratamiento.

En cuanto al grupo placebo de 7 animales, 2 mejoraron discretamente el score al finalizar el ensayo, 2 lo desmejoraron y 3 lo mantuvieron en los mismos parámetros durante el período del estudio. Las diferencias no resultaron significativas estadísticamente (Tabla VI).

**Tabla VI.** Resultado del score clínico total por animal y por signo clínico en caninos tratados con placebo. (n= 7)

	Sensorio		Apetito		Heces		Frecuencia de deposiciones		Vómitos		Score total*	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
0982/10	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
1089/10	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	2	1
1291/10	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	3
1329/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8C	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
7C	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2
Total	1	1	0	1	0	1	1	2	4	2		
P=	1		0.31731		0.31731		0.31731		0.1573		0.70546	

A: antes del tratamiento. D: después del tratamiento.

Al comparar los valores del score final de los animales del grupo tratado y del que recibió el placebo se observaron diferencias significativas ( $p=0,0357$ ).

Entre los componentes individuales del score en el grupo de animales tratados con *L. murinus* LbP2, los cambios en los parámetros que influyeron significativamente fueron Sensorio ( $p=0,025347$ ), Apetito ( $p=0,0455$ ) y Consistencia de las heces ( $p=0,0455$ ) no se demostró efecto en los ítems Frecuencia de las deposiciones y Frecuencia de vómitos ( $p>0,05$ ) (Tabla V).

#### Parámetros hemáticos

Los valores de hemograma, proteínas totales y albúmina de los animales tratados con *L. murinus* LbP2 no mostraron cambios significativos al comparar aquellos registrados al comienzo y al final del tratamiento (día 6). Los valores de  $t$  para muestras pareadas fue de  $p=0,282$  para los valores de hemoglobina,  $p=0,6897$  para neutrofilos,  $p=0,5533$  para linfocitos,  $p=0,3447$  para monocitos y  $p=0,157$  para eosinófilos (Tablas VIIa y VII b).

En cuanto al grupo tratado con el placebo tampoco se encontraron valores hemáticos con cambios significativos luego de transcurridos los 5 días de tratamiento (Tabla VIIIa y VIIIb).

**Tabla VIIa.** Evaluación del efecto de *L. murinus* LbP2 en el ensayo clínico de caninos con Distemper. Parámetros hemáticos de los caninos tratados con el probiótico: hematocrito, hemoglobina y proteínas al inicio y día 5 del ensayo. (n=12)

Caso	Hematocrito %		Hemoglobina g/dl		Prot. Totales g/dl		Albúmina g/dl	
330/09	25	39	5.5	12	5.03	13.5	3.45	7.42
1551/09	44	30	12.5	9.2	6	5.24	2.15	2.43
22A	33	40	14	12.7	s/d	6.26	s/d	2.84
2012/09	38	30	11.6	12.2	6.04	5.03	2.37	2.21
7A	38	49	11	14	s/d	s/d	s/d	s/d
5A	44.5	38.2	13.6	11.8	8.31	6.29	6.52	5.38
10A	40.1	41.8	13.2	13.7	4.46	8	3.78	5.63
11A	33.5	42.5	10.6	13.7	7.06	s/d	4.76	3.69
14A	45.6	45.9	14.8	15.1	7.65	7.47	4.55	4.94
1A	39	48	12	14.9	13.5	7.47	7.42	6.83
336/10	48.9	51.3	16.1	15.16	s/d	s/d	s/d	s/d
3A	25	27	7.8	8.7	2.8	3.3	s/d	s/d
Valor de t	P= 0.345		P= 0.282		P= 0.8897		P= 0.485	

**Tabla VIIb.** Evaluación del efecto de *L. murinus* LbP2 en el ensayo clínico de caninos con Distemper. Parámetros hemáticos de los caninos tratados con el probiótico: leucograma al inicio y día 5 del ensayo. Valor de t para las muestras pareadas. (n= 12)

	Leucocitos		Neutrófilos		Linfocitos		Monocitos		Eosinófilos	
	mm <sup>3</sup>		%		%		%		%	
330/09	8800	6835	54	71	26	9	6	1	14	18
1551/09	4200	8400	83	65	13	30	4	1	0	4
22A	4600	12200	64	78	20	16	0	4	4	2
2012/09	4500	4000	81	57	17	37	1	3	1	3
7A	14344	9020	88	82	8	8	3	6	1	4
5A	17200	16300	72	88	25	8	2	3	1	1
10A	10700	15500	83	83	10	14	3	2	4	1
11A	10000	9790	66	76	11	19	23	5	0	0
14A	13920	8512	87	76	11	19	2	2	0	3
1A	7500	9300	88	71	5	9	5	1	2	18
336/10	8800	7200	78	77	15	16	3	4	4	3
3A	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d
Valor de t	P=0.8574		P= 0.6897		P= 0.5533		P= 0.3447		P= 0.157	

**Tabla VIIIa.** Evaluación del efecto de *L. murinus* LbP2 en el ensayo clínico de caninos con Distemper. Parámetros hemáticos de los caninos tratados con el placebo: hematocrito, hemoglobina y proteínas al inicio y día 5 del ensayo. Valor de t para las muestras pareadas. (n= 7)

	Hematocrito		Hemoglobina		Prot. Totales		Albúmina	
	%		g/dl		g/dl		g/dl	
0982/10	27	25	8.7	7.8	4.18	s/d	1.9	
1089/10	42.9	43.3	14.1	14.7	7.28	6	2.78	2.38
1329/10	32.9	40	10.6	12.6	4.28	5	3.21	3
1291/10	44.5	49	13.6	14.4	6.3	5.5	4.85	4
2C	48	51	15	15.6	s/d	s/d	s/d	s/d
7C	29.8	41.7	9	10.8	s/d	s/d	s/d	s/d
8C	51.8	45.8	17.4	15.5	7.43	8.55	4.52	4.26
Valor de t	P= 0,2731		P= 0,4484					

**Tabla VIIIb.** Evaluación del efecto de *L. murinus* LbP2 en el ensayo clínico de caninos con Distemper. Parámetros hemáticos de los caninos tratados con el placebo: leucograma al inicio y día 5 del ensayo. Valor de t para las muestras pareadas. (n= 7)

	Leucocitos		Neutrófilos		Linfocitos		Monocitos		Eosinófilos	
	mm <sup>3</sup>		%		%		%		%	
0982/10	46200	14800	94	78	4	16	2	5	0	1
1089/10	37500	33200	83	87	12	10	4	2	1	1
1329/10	13000	9500	74	81	12	9	2	5	12	5
1291/10	17200	11000	72	82	25	8	2	6	1	4
2C	18200	15600	82	77	9	16	5	4	4	3
7C	14200	19700	85	94	14	4	0	1	1	1
8C	7680	10900	70	71	19	21	2	7	9	1
Valor de t	P= 0,2667		P=0,6971		P= 0,6876		P= 0,1087		P= 0,3166	

## DISCUSIÓN

La eficacia clínica de los probióticos ha sido estudiada en una variedad de enfermedades y desórdenes metabólicos como por ejemplo la enfermedad de Crohn (Guslandi et al. 2000; Schultz et al. 2004; Fujimori et al. 2007), síndrome de intestino irritable (Sens et al. 2002; Niedzielin et al. 2001), metabolismo del colesterol (St Onge et al. 2002; Simons et al. 2006), terapia oncológica (Russo et al. 2007; Commane et al. 2005) y diverticulitis (White, 2006). Es de destacar que no obstante los resultados exitosos de su uso reportado en numerosos ensayos, en general los mismos no han sido desarrollados en condiciones similares por lo que sería aventurado asumir que estas enfermedades o estados metabólicos mejoran siempre con el uso de probióticos. En la mayoría de los trabajos el uso de estos microorganismos ha tenido como blanco el tracto digestivo (Fuller et al. 1997; Gorbach, 2000) pero también existen reportes acerca de su uso en alergias, obesidad e infecciones del tracto urogenital donde no siempre la microbiota intestinal se encuentra afectada (Ley et al. 2006; Saavedra, 2007; Reid 2001; Reid et al. 2005).

Existen diversos puntos a considerar en el uso de probióticos. En muchos productos comerciales, no se detallan correctamente las cepas bacterianas usadas, el número de bacterias viables consumidas o la forma a ser suministradas.

Hove et al. (1999) concluyen que luego de una revisión de la literatura sobre el tema, existe consenso científico sobre el efecto benéfico en el uso de algunas bacterias probióticas particularmente en dos situaciones: intolerancia a la lactosa y diarreas. Hay trabajos que demuestran que el uso de probióticos reduce la duración de la diarrea infantil por rotavirus en un día (Huang et al. 2002).

Otro problema que surge al diseñar una estrategia basada en los probióticos es el número y el estado de las bacterias a ser suministradas ya que estos dos puntos no están claros. No existe consenso en la literatura sobre el número mínimo de bacterias a suministrar e incluso se puede suponer que las dosis podrían ser diferentes dependiendo de su aplicación (prevención vs. tratamiento de las diarreas). Diferencias entre las propiedades de las cepas bacterianas (sensibilidad al pH, por ejemplo) también deberían ser tenidas en cuenta para su dosificación (Ishibashi & Shimamura, 1993; FAO/WHO, 2002).

Las condiciones restrictivas naturales del tracto digestivo determinadas por un pH gástrico bajo, sales biliares y enzimas digestivas requiere que un gran número de bacterias probióticas sean suministradas para asegurarse que un número adecuado sobreviva en su sitio de acción. Muchos estudios sobre probióticos han demostrado que los mismos deben ser suministrados diariamente ya que en general son eliminados totalmente cuando cesa su administración. Por ello, el análisis de la materia fecal es el método útil para determinar la viabilidad de los microorganismos usados. Esto determina una gran limitante ya que para su uso comercial, el fabricante podrá determinar cuántas bacterias contiene el producto cuando es consumido, pero no se puede asegurar cuántas son necesarias para producir el efecto benéfico buscado. Hasta el presente no se ha podido demostrar que las bacterias probióticas colonicen el intestino y persistan por tiempos considerables luego del cese del suministro. Por lo tanto, se requieren ensayos sobre eficacia clínica que permitan determinar qué cantidad de producto y por cuánto tiempo debe ser consumido para lograr los efectos benéficos (Farnworth, 2008).

## Capacidad colonizadora de *Lactobacillus murinus* LbP2

La cepa *Lactobacillus murinus* LbP2 de origen canino fue seleccionada tiempo atrás y sujeta a una evaluación in vitro de sus potenciales propiedades como probiótico (Perelmuter et al. 2008).

Luego de obtener resultados que alentaban la profundización de los estudios acerca de la capacidad probiótica de la cepa, se pasó a evaluar algunos aspectos de su comportamiento in vivo.

En el presente ensayo se evaluó la persistencia de LbP2 en el tubo digestivo canino así como la posible influencia sobre distintos parámetros sanguíneos. Para ello se usó por vía oral una cepa mutante espontánea resistente a rifampicina, LbP2-RR, generada a partir de la cepa salvaje lo que permitió su identificación al momento de ser recuperada de las heces de los caninos usados en el ensayo.

La detección y recuperación fecal de LbP2-RR al menos hasta dos días después de dosificados los caninos, demostró que la cepa sobrevive al pasaje gastrointestinal algo esencial para una bacteria probiótica administrada oralmente (Biagiet al. 2007). La cepa no fue detectada 10 días después de administrada la última dosis. Esto concuerda con otros estudios y podría indicar que el microorganismo no coloniza de forma permanente el tubo digestivo lo que de todas maneras no cuestiona su posible papel como probiótico (Suchodolskiet al. 2005; Biagi et al. 2007).

A pesar del tiempo en que la cepa fue recuperada en heces, no se pudo comprobar su presencia en sangre cuando se intentó aislarla en los medios apropiados. Esto podría estar indicando que la cepa no transloca, lo que es una característica deseable en un probiótico. Es un importante aspecto a tener en cuenta cuando son utilizados probióticos ya que existen reportes de bacteriemias de *Lactobacillus* spp. fundamentalmente en pacientes inmunodeprimidos o luego de haber recibido antibióticoterapias mayores a 2 semanas de duración (Salminen et al. 2006). Una propiedad asociada en ocasiones a los probióticos es su capacidad para impedir la translocación de microorganismos patógenos y así por mantener estable la microbiota (Salminen et al. 2006; Zareie et al. 2006).

Sin embargo en años recientes se ha constatado que bacterias lácticas y bifidobacterias han sido agentes de infecciones aunque en casos puntuales. Se han reportado aislamientos de *Lactobacillus* (Aguirre & Collins, 1993.), *Bifidobacterium* (Brook, 1996) y algunas especies de *Lactobacillus* en sitios de infección en el hombre aunque se consideran como oportunistas, sobre todo en casos de lesiones en piel, enfermedades crónicas, neoplasias y personas inmunodeprimidas. En estos casos la translocación ocurre por pasaje del microorganismo a través de la membrana mucosa intestinal, epitelio, túnica propia hacia los linfonódulos mesentéricos propagándose a la circulación general. En nuestro caso ninguna de estas dos propiedades indeseables se constató en el ensayo manteniéndose en el mismo estado los animales a lo largo del mismo.

En cuanto a los parámetros hemáticos y a pesar de la frecuencia y concentración del microorganismo dosificado, no se encontró ninguna alteración en hemogramas, colesterol y proteínas totales, lo que indica que no es un factor de alteración del mismo ya que se podría haber esperado un aumento en la serie blanca que es un parámetro que se altera ante la infección bacteriana.

Por otra parte, el suministro del microorganismo no afectó el peso de los animales ni las características de las deposiciones lo que demuestra que en general no alteró la digestión ni la absorción.

### **Evaluación del efecto de *L. murinus* en la IgA fecal total**

En nuestro ensayo la IgA se elevó de forma significativa en los caninos tratados con *Lactobacillus murinus* LbP2 no ocurriendo lo mismo en el grupo tratado con el placebo. Por lo que estaría significando un aumento en los mecanismos inmunes de la superficie intestinal ya que la IgA es el isotipo más abundante encontrado en individuos sanos y ha sido considerado el elemento primario de la respuesta inmune de las mucosas a los antígenos microbianos (Holmgren et al. 2005; Sabirov et al. 2008). La IgA protege al epitelio intestinal contra la colonización o invasión microbiana mediante la unión a antígenos de los patógenos o comensales. Rodean al microorganismo con una capa hidrofílica que es repelida por el glicocalix epitelial provocando exclusión inmune de la bacteria (Macpherson et al. 2007; Monteiro et al. 2003). A pesar de ello no todo microorganismo benéfico produce aumento de la IgA a nivel intestinal. En los seres humanos la deficiencia de IgA es la causa más común de inmunodeficiencia primaria. Dicho déficit, también se ha reportado en algunas razas de perros como el Ovejero Alemán (Tress et al. 2006; Littler et al. 2006)

De acuerdo a los valores de IgA fecal obtenidos por otros autores, se ha podido constatar que presentan grandes variaciones intra individuales y entre individuos. En un estudio desarrollado por Tress et al. se observaron coeficientes de variación entre 2.4% a 131.6% entre los distintos individuos para un grupo de 18 perros a los que se les tomaron 5 muestras de materia fecal a cada uno en un período de 2 semanas (Tress et al. 2006).

Otro factor a tener en cuenta al analizar los valores absolutos de IgA fecal es la diversidad de métodos de obtención de IgA fecal reportados por distintos autores (Flickinger et al. 2004; Tress et al. 2006; Zaine et al. 2011). En esto, también influye de forma importante el tiempo que transcurre entre que se obtiene la muestra y se le agrega el buffer inicial ya que para Litter et al. llegaron a registrar pérdidas entre 0% y 90% de IgA dependiendo que el buffer fuera agregado entre los 30 a 120 minutos de obtenida la muestra. En nuestro caso el tiempo transcurrido desde la obtención de la muestra y la aplicación del buffer fue de una hora aproximadamente en el grupo tratado y el control, por lo que este parámetro estaría afectando de forma igual a toda la población canina del ensayo, no explicando las diferencias intra grupo en aquellos animales tratados con el probiótico.

La edad de los animales también influye en los niveles de IgA fecal. Si bien existe diferencias entre los autores, se encontró que la categoría con valores más bajos es la de animales muy jóvenes (5 meses de edad), aumentando en la categoría más maduras (4,6 años) para decrecer en los animales seniles (10,6 años) (Zaine et al., 2011).

En nuestro caso la población del ensayo fue homogénea en cuanto a la edad ya que fueron animales maduros aunque encontramos variaciones individuales importantes. A pesar de ello las diferencias de niveles de IgA fecal pre y post tratamiento fue significativo en el grupo tratado y no así en los tratados con placebo.

En nuestros ensayos entonces se mantuvieron constantes aquellos factores que de distintas formas podían afectar los niveles de IgA que se estudiaban.

### **Efecto de *L. murinus* en caninos con diarrea asociada a Distemper**

Uno desafío no menor para poder evaluar la acción probiótica de una cepa determinada, es entre otras cosas la concentración de la dosis y la forma en que se suministra (en suspensión, liofilizada, en polvo, yogurt, en leche). Esta última va a determinar el número de microorganismos que se entreguen y si son viables o no aunque esto no determine de forma excluyente el efecto probiótico ya que microorganismos no viables igual pueden tener efecto deseable (Borchers et al. 2009). En el presente ensayo clínico, las muestras fueron liofilizadas, recuperándose de forma satisfactoria el microorganismo al momento de ser reconstituido. La liofilización demostró que es una forma útil de preparar el probiótico en dosis independientes y cuando el mismo deba ser suministrado por varias dosis diarias para poder mantener su efecto en el tiempo de acuerdo a la enfermedad que estemos tratando.

En cuanto al uso de *Lactobacillus murinus* LbP2 liofilizado, demostró mejorar significativamente la condición clínica de los animales durante los 7 días del control. Los parámetros hemáticos de los caninos tratados al igual que a los caninos que se les suministró el placebo no presentaron diferencias significativas a lo largo de los tratamientos. Este resultado estaría demostrando *Lactobacillus murinus* LbP2 por si, no afecta dichos parámetros en animales sanos tanto como en animales enfermos de Distemper ya que una alteración importante en los parámetros hemáticos, sobre todo el leucograma, pueda ser indicador de riesgo en el uso del mismo ya que la seguridad del uso clínico de estos microorganismos vivos es tema de discusión (Verna & Lucak 2010).

En cuanto a los parámetros clínicos, la mejora en el score de los animales que recibieron tratamiento se debió fundamentalmente por una mejoría del sensorio del animal estimulada por una disminución de la frecuencia de las deposiciones y un aumento del apetito en comparación con el grupo placebo. Si bien la consistencia de las heces, elemento afectado también en la diarrea, no tuvo cambios significativos mejoró las condiciones clínicas de los animales.

En reportes de tratamiento con probióticos de diarreas agudas y por rotavirus en niños, los mismos lograron reducir hasta en dos días en algunos casos la duración de la misma (Isolauri et al. 1994; Guandalini, 2011; Erdogan et al. 2012). La mejora en la consistencia de las heces podemos considerarla como una mejora parcial de la diarrea, cosa que no sucedió en los animales tratados con el placebo. En cuanto a la incidencia del vómito en el score no tuvo tampoco cambios significativos. Si bien no hay antecedentes de trabajos en caninos con enfermedad digestiva de origen viral tratado con probióticos que contemplen el efecto sobre los vómitos, en el hombre, en el que también son escasos los ensayos al respecto, aparentemente mejoraría dicha condición. En un trabajo clínico de Erdogan et al. los vómitos causados por rotavirus en niños, fueron controlados en 5 días con distintos tratamientos que contemplaban rehidratación y uso de uno o dos probióticos.

En nuestro ensayo, los animales fueron tratados con una terapia de fluidos en base a solución de Ringer. El volumen repuesto se calculó de acuerdo al porcentaje de deshidratación con que llegaba a la consulta, a los requerimientos diarios de

acuerdo al peso y al ajuste de las pérdidas por vómito o diarrea o por ambos. Se lo suministraron antibióticos por vía intramuscular que fue penicilina y estreptomina durante 48 horas y en caso de exceder los vómitos más de 2 episodios diarios se le suministraron metoclopramida. Estos tratamientos son los habituales para cualquier gastroenteritis y al estar estandarizado hace que no varíe el tratamiento en los animales del ensayo, si en cambio puede variar el aporte de cada uno de estos elementos de acuerdo al estado del paciente.

Así mismo el probiótico fue fácil de reconstituir y al suministrarlo fue bien tolerado por los animales ingiriéndolo totalmente y controlando luego que no lo regurgitara o vomitara.

*Lactobacillus murinus* LbP2 demostró un potencial valor como probiótico que permitiría su uso en clínica de caninos ya que ayudó a mejorar la condición clínica de los animales tratados en el presente ensayo. Esto coincidiría con otros resultados del uso de probióticos en ensayos clínicos en caninos aunque los mismos hasta el momento son escasos (Herstad et al. 2010).

## CONCLUSIONES

*Lactobacillus murinus* LbP2 se recuperó de las heces caninas en todos los animales hasta el séptimo día del tratamiento, sin afectar el apetito de los animales la condición corporal o los parámetros hemáticos

*Lactobacillus murinus* LbP2 a las dosis suministradas no pudo ser recuperado de los hemocultivos por lo que no se puede afirmar que no hubo translocación de la bacteria desde el intestino. Al menos se puede afirmar que no hubo bacteriemia.

En cuanto a sus propiedades inmunomoduladoras, luego de un tratamiento de días alternos a lo largo de dos semanas, fue capaz de inducir un incremento significativo de IgA fecal en los caninos a los que les fue suministrado.

Se puso a punto un método de preservación a largo plazo como la liofilización que permitió mantener al microorganismo estudiado en buenas condiciones determinadas por una buena sobrevida del mismo y una resuspensión que permite su administración de forma sencilla.

En el ensayo clínico que incluyó caninos con diarrea afectados por el virus del Distemper el tratamiento con *Lactobacillus murinus* LbP2 demostró mejorar las condiciones de los animales tratados aunque no logró influir en todos los parámetros evaluados en el score, que resultó de utilidad en el presente ensayo aunque el mismo debe ser revisado en el futuro ya que puede haber ítems que no aporten datos relevantes.

*Lactobacillus murinus* LbP2 demostró tener una interesante potencialidad probiótica en caninos, lo que deberá ser confirmado en ensayos con poblaciones de mayor tamaño y frente a otras situaciones clínicas suministrado como único microorganismo o en combinación con otros.

## REFERENCIAS

Aguirre M, Collins MD (1993) Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J Appl Bacteriol* 75: 95-107.

Alander M, Satokari R, Korpela R, Saxelin M, Vilpponen-Salmela T, Mattila-Sandholm T, von Wright A.(1999). Persistence of colonisation of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG after oral consumption. *Appl Environ Microbiol* 65: 351-354.

Antonopoulos DA, Huse SM, Morrison HG, Schmidt TM, Sogin ML, Young VB. (2009) Reproducible community dynamics of the gastrointestinal microbiota following antibiotic perturbation. *Infect Immun* 77: 2367-2375.

Ayyagari A, Agarwal J, Garg A (2003) Antibiotic associated diarrhoea: Infectious causes. *Indian J Med Microbiol* 21: 6-11.

Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. (1994) *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* 35: 483-489.

Baillon ML, Marshall-Jones ZV, Butterwick RF. (2004) Effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* strain DSM13241 in healthy adult dogs. *Am J Vet Res* 65: 338-343.

Biagi G, Cipollini I, Pompei A, Zaghini G, Matteuzzi D (2007) Effect of a *Lactobacillus animalis* strain on composition and metabolism of the intestinal microflora in adult dogs. *Vet Microbiol* 124:160-165.

Biourge V, Vallet C, Levesque A, Sergheraert R, Chevalier S, Robertson J. (1998) The Use of Probiotics in the Diet of Dogs. *J. Nutr* 128: 2730S-2732S.

Brook I. (1996) Isolation of non-sporing anaerobic rods from infection in children. *J Clin Microbiol* 45: 21-26.

Borchers AT, Selmi, Meyers FJ, Keen CL, Gershwin ME (2009) Probiotics and immunity. *J Gastroenterol* 44: 26-46.

Casey PG, Casey GD, Gardiner GE, Tangney M, Stanton C, Ross RP, Hill C, Fitzgerald GF. (2004) Isolation and characterization of anti-Salmonella lactic acid bacteria from the porcine gastrointestinal tract. *Lett Appl Microbiol* 39: 431-438.

Casey PG, Gardiner GE, Casey G, Bradshaw B, Lawlor PG, Lynch PB, Leonard FC, Stanton C, Ross RP, Fitzgerald GF, Hill C. (2007) A five-strain probiotic combination reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in pigs

challenged with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. Appl. Environ. Microbiol. 73: 1858-1863.

Commane D, Hughes R, Shortt C, Rowland I. (2005) The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. Mutat. Res. 591: 276–289.

Delcenserie V, Martel D, Lamoreux M, Amiotz J, Boutin Y, Roy D. (2008) Immunomodulatory Effects of Probiotics in the Intestinal Tract. Curr. Issues Mol. Biol. 10: 37-54.

Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA. (2008) The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. PLoS Biol; 6:e280; PMID: 19018661; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0060280>.

Erdogan O, Tanyeri B, Torun E, Gonullu E, Arslan H, Erenberk U, Oktem F. (2012) The Comparison of the Efficacy of Two Different Probiotics in Rotavirus Gastroenteritis in Children. Journal of Tropical Medicine Volume 2012, Article ID 787240, 5 pages. doi:10.1155/2012/787240

Evrard B, Coudeyras S, Dosgilbert A, Charbonnel N, Alamé J, Tridon A, Forestier C. (2011) Dose-dependent immunomodulation of human dendritic cells by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35. PLoS One. Apr 18;6(4):e18735. doi: 10.1371/journal.pone.0018735.

Falagas ME, Betsi GI, Athanasiou S. (2006) Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. J Antimicrob Chemother 58: 266–272.

Farnworth ER. (2008) The evidence to support health claims for probiotics. J Nutr. 138: 1250S-1245S.

FAO/WHO (2001) Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food; Córdoba, Argentina. Available at: <http://www.fao.org/es/esn/Probio/report.pdf>

FAO/WHO. (2002) Report of a Joint FAO/WHO Working Group. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario: FAO.

Flickinger EA, Grieshop CM, Merchen NR, Fahey Jr. GC. (2004) Immunoglobulin A Concentrations in Adult Dogs Vary According to Sample Type and Collection Time and Method. J Nutr 134: 2130S–2132S.

Fujimori S, Tatsuguchi A, Gudis K, Kishida T, Mitsui K, Ehara A, Kobayashi T, Sekita Y, Seo T, Sakamoto C. (2007) High dose probiotic and prebiotic cotherapy for remission induction of active Crohn's disease. J. Gastroenterol. Hepatol. 22: 1199-1204.

Fuller R. (1989) Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol. 66: 365-378.

Fuller R, Gibson GR. (1997) Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scand. J. Gastroenterol Suppl.* 222: 28-31.

Gaggia F, Mattarelli P, Biavati B. (2010) Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production.. *Int J Food Microbiol.* 31;141 Suppl 1:S15-28.

Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, Campieri M. (2000) Probiotics in infective diarrhoea and inflammatory bowel diseases. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15: 489-493.

Gionchetti P, Rizzello F, Lammers KM, Morselli C, Sollazzi L, Davies S, Tambasco R, CaBALrese C, Campieri M. (2006) Antibiotics and probiotics in treatment of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 12: 3306-3313.

Gorbach SL. (2000) Probiotics and gastrointestinal health. *Am. J. Gastroenterol.* 95: Suppl 1: S2-4.

Grönlund MM, Arvilommi H, Kero P, Lehtonen OP, Isolauri E. (2000) Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0-6 months. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 83: 186-192.

Guandalini F. (2011) Probiotics for Prevention and Treatment of Diarrhea. *J. Clin. Gastroenterol.* 45: S149-S153

Guardabassi L, Schwarz S, Lloyd DH. (2004) Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 54: 321-332.

Guslandi M, Mezzi G, Sorghi M, Testoni PA. (2000) *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* 45: 1462-1464.

Hamonn E, Horvatovic P, Izquierdo E, Bringel F, Marchioni E, Werner DA, Ennahar S. (2011) Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance. *BMC Microbiology*, 11:63 doi:10.1186/1471-2180-11-63

Heczko PB, Strus M, Kochan P. (2006). Critical evaluation of probiotic activity of lactic acid bacteria and their effects. *J Physiol Pharmacol* 57, suppl 9, 5.12.

Herstad HK, Nesheim BB, L'Abée-Lund T, Larsen S, Skancke E. (2010) Effects of a probiotic intervention in acute canine gastroenteritis-a controlled clinical trial. *J. Small Anim. Pract.* 51: 34-38.

Holmgren J, Czerkinsky C. (2005) Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med.* 11: S45-S53.

Hove H, Nørgaard H, Mortensen PB. (1999) Lactic acid bacteria and the human gastrointestinal tract. *Eur. J. Clin. Nutr.* 53: 339-350.

Huang JS, Bousvaros A, Lee JW, Diaz A, Davidson EJ. (2002) Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children: a meta-analysis. *Dig. Dis. Sci.* 47: 2625-2634.

Ishibashi N, Shimamura S. (1993) Bifidobacteria: research and development in Japan. *Food Technol.* 47: 126–135.

Isolauri E, Kaila M, Mykkanen H, Ling WH, Salminen S. (1994) Oral Bacteriotherapy for Viral Gastroenteritis. *Digestive Diseases and Sciences.* 39: 2595-2600.

Janczyk P, Pieper R, Souffrant WB, Bimczok D, Rothkötter HJ, Smidt H. (2007) Parenteral long-acting amoxicillin reduces intestinal bacterial community diversity in piglets even 5 weeks after the administration. *ISME J* 1: 180-183.

Jeppsson B, Mangell P, Adawi D, Molin G. 2004. Bacterial translocation: impact of Probiotics. *Scandinavian Journal of Nutrition*; 48: 37- 41.

Kandler O. (1983) Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49: 209-224.

König H, Fröhlich J. (2009) Acid lactic bacteria en Biology of Microorganism on Grapes, in Must and in Wine. (Eds.) H. König; G. Uden; J. Fröhlich. 3-30.522pp. Springer.

Littler RM, Batt RM, Lloyd DH. (2006) Total and relative deficiency of gut mucosal IgA in German shepherd dogs demonstrated by faecal analysis. *Vet. Rec.* 158: 334-341.

Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. (2006) Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444: 1022–1023.

Looft T, Allen HK. (2012) Collateral effects of antibiotics on mammalian gut microbiomes. *Gut Microbes* 3: 463-467.

Looft T, Johnson TA, Allen HK, Bayles DO, Alt DP, Stedtfeld RD, et al. (2012) In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA*; 109: 1691-1696.

Macpherson AJ, McCoy KD, Johansen FE, Brandtzaeg P. 2007 The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol* 1: 11–22.

Manichanh C, Reeder J, Gibert P, Varela E, Llopis M, Antolin M, Guigo R, Knight R, Guarner F. (2010) Reshaping the gut microbiome with bacterial transplantation and antibiotic intake. *Genome Res.* 20: 1411-1419.

Manninen TJ, Rinkinen ML, Beasley SS, Saris PE. (2006) Alteration of the canine small-intestinal lactic acid bacterium microbiota by feeding of potential probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6539-6543.

Marks SL, Rankin SC, Byrne BA, Weese JS. (2011) Enteropathogenic Bacteria in Dogs and Cats: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Control. *J. Vet. Intern. Med.* 25: 1195–1208.

Marsella R. (2009) Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG for the prevention of atopic dermatitis in dogs. *Am J Vet Res.* 70: 735-740.

Martín R, Olivares M, Pérez M, Xaus J, Torre C, Fernández L, Rodríguez JM. (2010) Identification and evaluation of the probiotic potential of lactobacilli isolated from canine milk. *Vet. J.* 185: 193-198.

Meijer BJ, Dieleman LA. (2011) Probiotics in the Treatment of Human Inflammatory Bowel Diseases. Update 2011. *J. Clin. Gastroenterol.* Volume 45, Supp. 3, November/December.

Milner RJ, Picard J, Tustin R. (1997) Chronic episodic diarrhoea associated with apparent intestinal colonisation by the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida famata* in a German shepherd dog. *J S Afr Vet Assoc.* Dec; 68:147-149.

Monteiro RC, van de Winkel JGJ. 2003 IgA Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 21: 177–204.

Narayan SS, Jalgaonkar S, Shahani S, Kulkarni VN. (2010) Probiotics: current trends in the treatment of diarrhoea. *Hong Kong Med J* 16: 213-8

Nardi RMD, Santoro MM, Oliveira JS, Pimenta AMC, Ferraz VP, I.c. Benchetrit LC, Nicoli JR. 2005. Purification and molecular characterization of antibacterial compounds produced by *Lactobacillus murinus* strain L1. *J. Appl. Microbiol.* 99: 649–656.

Niedzielin K, Kordecki H, Birkenfeld B. (2001) A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299V in patients with irritable bowel syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13:1143–1147.

Nissle, A. (1959) [Explanations of the significance of colonic dysbacteria & the mechanism of action of *E. coli* therapy (mutaflor)]. *Medizinische* 4: 1017-1022.

Olah A, Belagyi T, Poto L, Romics L Jr, Bengmark S. (2007) Synbiotic control of inflammation and infection in severe acute pancreatitis: a prospective, randomized, double blind study. *Hepato-gastroenterology* 54: 590–594.

Olah A, Belagyi T, Issekutz A, Gamal ME, Bengmark S. (2002) Randomized clinical trial of specific lactobacillus and fibre supplement to early enteral nutrition in patients with acute pancreatitis. *Br J Surg.* 89: 1103–1117.

Pélissier MA, Vasquez N, Balamurugan R, Pereira E, Dossou-Yovo F, Suau A, Pochart P, Magne F. (2010) Metronidazole effects on microbiota and mucus layer thickness in the rat gut. *FEMS Microbiol Ecol* 73: 601-610.

Perelmuter K, Fraga M, Zunino P (2008) In vitro activity of potential probiotic *Lactobacillus murinus* isolated from the dog. *J Appl Microbiol* 104: 1718–1725.

Perelmuter K, Fraga M, Delucchi L, Zunino P. (2011) Safety assessment and enteric colonization ability of a native canine *Lactobacillus murinus* strain. *World J Microbiol Biotechnol* 27: 1725-1730.

Petrof EO. (2009) Probiotics and Gastrointestinal Disease: Clinical Evidence and Basic Science. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.* 8: 260–269.

Podolsky SH. (2012) The art of medicine: Metchnikoff and the microbiome. *The Lancet* 380: 1810-1811.

Rayes N, Seehofer D, Hansen S, Boucsein K, MüllerAR, Serke S, Bengmark S, Neuhaus P. Early enteral supply of *Lactobacillus* and fibre vs selective bowel decontamination (SBD) a controlled trial in liver transplant recipients. *Transplantation* 2002. 74: 123-127.

Reid G. (2001) Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *Am J Clin Nutr* 73: 437–443.

Reid G, Hammond J-A. ( 2005) Probiotics some evidence of their effectiveness. *Can. Fam. Physician* 51: 1487–1493.

Reid G. (2012) Probiotic and Prebiotic Applications for Vaginal Health. *Journal of AOAC International* Vol. 95, N o. 1, 31-34. DOI: 10.5740/jaoacint.SGE\_Reid

Rinkinen M, Jalava K, Westermarck E, Salminen S, Ouwehand AC. (2003) Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization? *Vet. Microbiol.* 92: 111-119.

Rinkinen M. (2004) Methods for assessing the adhesion of probiotic and canine gut- derived lactic acid producing bacteria to the canine intestinal mucosa in vitro and measuring mucosal secretory IgA. Academic Dissertation. Faculty of Veterinary Medicine, for public criticism in Auditorium Maximum, Hämeentie 57, 00580 Helsinki on the 23rd January 2004 at 12 noon. 97 p.

Robinson CJ, Young VB. (2010) Antibiotic administration alters the community structure of the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes*; 1:279- 84; PMID: 20953272; <http://dx.doi.org/10.4161/gmic.1.4.12614>.

Russo F, Orlando A, Linsalata M, Cavallini A, Messa C. (2007) Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on the cell growth and polyamine metabolism in HGC-27 human gastric cancer cells. *Nutr. Cancer* 59: 106–114.

Saavedra JM. (2007) Use of probiotics in pediatrics: rationale, mechanisms of action, and practical aspects. *Nutr. Clin. Pract.* 22: 351-365.

Sabirov A, Metzger DW. 2008 Mouse models for the study of mucosal vaccination against otitis media. *Vaccine* 26: 1501-1524.

Sainz T, Perez J, Fresan MC, Flores V, Jimenez L, Hernandez U, Herrera I, Eslava C (2002) Histological alterations and immune response induced by pet toxin during colonization with Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) in a mouse model infection. *J. Microbiol.* 40: 91-97.

Salminen MK, Rautelin H, Tynkkynen S, Poussa T, Saxelin M, Valtonen V, Jarvinen A. (2006) *Lactobacillus* Bacteremia, Species Identification, and Antimicrobial Susceptibility of 85 Blood Isolates. *Clinical Infectious Diseases* 42:e35–44 42:e35–44.

Sen S, Mullan MM, Parker TJ, Woolner JT, Tarry SA, Hunter JO. (2006) Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on colonic fermentation and symptoms of irritable bowel syndrome. *Dig. Dis. Sci.* 47: 2615–2620.

Simons LA, Amansec SG, Conway P. (2006) Effect of *Lactobacillus fermentum* on serum lipids in subjects with elevated serum cholesterol. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 16: 531–535.

Soifer LO, Peralta D, Dima G, Besasso H. (2010) Eficacia comparativa de un probiótico vs un antibiótico en la respuesta clínica de pacientes con sobrecrecimiento bacteriano del intestino y distensión abdominal crónica funcional: un estudio piloto. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 40: 323-327.

Strus M, Brzychczy-Wloch M, Kucharska A, Gosiewski T, Heczko PB. (2005) Inhibitory activity of vaginal *Lactobacillus* bacteria on yeasts causing vulvovaginal candidiasis. *Med Dosw Mikrobiol.* 57: 7–17.

Suchodolski JS, Ruaux CG, Steiner JM, Fetz K, Williams DA (2005) Assessment of the qualitative variation in bacterial microflora among compartments of the intestinal tract of dogs by use of a molecular fingerprinting technique. *Am. J. Vet. Res.* 66: 1556–1562.

Schultz M, Timmer A, Herfarth HH, Sartor RB, Vanderhoof JA, Rath HC. (2004) *Lactobacillus GG* in inducing and maintaining remission of Crohn's disease. *BMC Gastroenterol.* 4: 5–8.

St-Onge M-P, Farnworth ER, Savard T, Chabot D, Mafu A, Jones PJH. (2002) Kefir consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipidemic men. *BMC Complim Alt Med J.* <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/2/1/>.

Strus M, Kucharska A, Kukla G, Brzywczy-Wloch M, Maresz K, Heczko PB. (2005) The in vitro activity of vaginal *Lactobacillus* with probiotic properties against *Candida*. *Infect Dis Obstet Gynecol* June. 13: 69-75.

Tress U, Suchodolski JS, Williams DA, Steiner JM. (2006) Development of fecal sample collection strategy for extraction and quantification of fecal IgA in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 10: 1756-1759.

Vandenbergh PA. (1993) Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 221-238.

Verna EC, Lucak S. (2010) Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? *Ther Adv Gastroenterol* 3: 307-319.

Viljanen M, Kuitunen M, Haahtela T, Juntunen-Backman K, Korpela R, Savilahti E. (2005) Probiotic effects on faecal inflammatory markers and on faecal IgA in food allergic atopic eczema/dermatitis syndrome infants. *Pediatr. Allergy. Immunol.* 16: 65-71.

Weese JS, Anderson ME. (2002) Preliminary evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG, a potential probiotic in dogs. *Can. Vet. J.* 43: 771-774.

Weese JS. (2003) Evaluation of deficiencies in BALeeling of commercial probiotics. *Can. Vet. J.* 44: 982-983.

Weese JS, Martin H. (2011) Assessment of commercial probiotic bacterial contents and BALel accuracy. *Can. Vet. J.* 52: 43-46.

White JA. (2006) Probiotics and their use in diverticulitis. *J. Clin. Gastroenterol.* 40 (7, Suppl 3) S160-S162.

Yazdankhah S, Midtvedt T, Narvhus J, Berstad A, Lassen J, Halvorsen R. (2009) The use of probiotics for critically ill patients in hospitals. *Microb. Ecol. Health Dis.* 21: 114-121.

Zaine L, Ferreira C, Gomes M de OS, Monti M, Tortola L, Vasconcellos RS, Carciofi AC. (2011) Faecal IgA concentration is influenced by age in dogs. *Br. J. Nutr.* 106, S183-S186.

Zareie MK, Johnson-Henry K, Jury J, Yang PC, Ngan BY, McKay DM, Soderholm JD, Perdue MH, Sherman PM. (2006) Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress. *Gut.* 55: 1553-15156.

