



TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

**DIARREA NEONATAL DE TERNEROS EN SISTEMAS  
DE LECHERÍA INTENSIVOS : ESTRATEGIA BASADA  
EN LA UTILIZACIÓN DE PROBIÓTICOS NATIVOS  
PARA DISMINUIR SU INCIDENCIA Y SEVERIDAD**

Sofía Fernández Ciganda  
sfernandez@iibce.edu.uy

Programa de Doctorado de PEDECIBA Biología.  
Facultad de Ciencias. Universidad de la República.

Montevideo-Uruguay  
Diciembre de 2019



# DIARREA NEONATAL DE TERNEROS EN SISTEMAS DE LECHERÍA INTENSIVOS : ETRATEGIA BASADA EN LA UTILIZACIÓN DE PROBIÓTICOS NATIVOS PARA DISMINUIR SU INCIDENCIA Y SEVERIDAD

Sofía Fernández Ciganda

Tesis de Doctorado presentada al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas, área Biología, subárea Microbiología, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Doctor en Ciencias Biológicas.

Tutor:

Pablo Zunino

Co-tutor:

Martín Fraga

Montevideo-Uruguay  
Diciembre de 2019

# INTEGRANTES DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

---

Ph.D. Mariela Bollati

---

Ph.D. Cecilia Cajarville

---

Ph.D. Federico Battistoni

Montevideo-Uruguay  
Diciembre de 2019

# FINANCIACIÓN

Fondos FPTA (Proyecto 325) de INIA

Beca Nacional de Maestría (ANII)

Beca Nacional de Doctorado (ANII)

Beca de Finalización de Doctorado (CAP)

Beca para Pasantías Internacionales (PEDECIBA Biología)

Beca para Congresos Internacionales (PEDECIBA Biología)

Alícuota de Estudiantes (PEDECIBA Biología)

# AGRADECIMIENTOS

A Pablo y Martín por guiarme en la carrera y aceptar ser mis tutores. Por enseñarme todo lo que sé y ser mis referentes.

A mis compañeros del Dpto. de Microbiología (La Colonia).

A Rodney Colina y Matías Castells por la colaboración con la cuantificación de virus.

A Nicole Trombert por recibirme en su laboratorio en la Universidad Mayor de Chile.

A Anita, Monse y Feña por su buena onda y recibirme siempre en Chile de brazos abiertos.

A Santi Tovagliare y Anita Rabaza. Los ensayos de campo no hubieran sido tan divertidos sin ustedes.

A Marcelo Plá y trabajadores del tambo de INIA-La Estanzuela que me dieron una ayuda invaluable con los ensayos de campo, Brunito y Tomi especialmente.

A Gabi y Beleni por su apoyo, ayuda y amistad.

A Karina, Anita y Claudia por las risas, la disponibilidad, el apoyo y hacer más llevadero el trabajo día a día.

A Meli y Caroli por ser la mejor importación en años.

A mis amigos, que todavía me preguntan qué estudio.

A mi familia: **LEO, MAMÁ, PAPÁ Y FEDE .**

*“The role of the infinitely small in nature is infinitely large”*

Louis Pasteur

---

# RESUMEN

La diarrea neonatal plantea uno de los desafíos más importantes de la industria lechera alrededor del mundo. Los altos costos asociados a la morbilidad y mortalidad de los terneros y la aparición de resistencias por el uso indebido de antimicrobianos han llevado a la búsqueda de nuevas estrategias para prevenir y tratar esta patología. En este marco, este trabajo se basó en la búsqueda de probióticos nativos como una alternativa para abordar este problema, caracterizando en primer lugar su potencial *in vitro* y en segundo lugar su efecto *in vivo* en terneros de lechería. El presente trabajo de investigación consistió en primer lugar, en la selección de cepas mediante la evaluación de su potencial probiótico *in vitro* e *in vivo*. El screening *in vitro* se basó en el análisis de la resistencia a un ambiente similar al encontrado en el tracto gastrointestinal (TGI), efecto antimicrobiano, formación de biofilm y adhesión a mucus intestinal y células epiteliales. A partir de estos resultados se seleccionaron 4 cepas y se evaluó su capacidad de persistir en el TGI de terneros luego de la administración oral mediante la técnica de qPCR. Con los resultados de este ensayo se seleccionaron las cepas TP1.3B (*Lactobacillus reuteri*) y TP1.6 (*Lactobacillus johnsonii*) para evaluar su efecto probiótico *in vivo*. Se administraron oralmente a terneros de lechería y se realizó el seguimiento de los animales por un mes (*score* fecal diario, incidencia de diarreas, peso y hemogramas semanales). Además, se analizó la expresión de citoquinas en sangre, se cuantificó IgA fecal y en plasma, se analizó la microbiota intestinal por secuenciación masiva del gen ribosomal 16S y se cuantificaron algunos patógenos asociados a la DNT (rotavirus, coronavirus, *Salmonella enterica*, *C. parvum* y 3 factores de virulencia de *E. coli*). Hubo efecto significativo sobre el *score* fecal y la incidencia de diarreas, pero no se

observaron diferencias significativas en los pesos de los animales. Se determinó que la administración de probióticos tuvo efecto significativo sobre la composición de la microbiota intestinal. En ambos grupos tratados disminuyó la abundancia de *Escherichia/Shigella* y se observó un aumento significativo del género *Akkermansia* spp., ampliamente reconocido por sus efectos beneficiosos en el ambiente intestinal. No se encontraron diferencias significativas entre los patógenos cuantificados. Los resultados indicaron que ambas cepas se presentan como promisorias como potenciales probióticos para terneros de lechería bajo sistemas artificiales.

**Palabras clave:**

Probióticos, terneros, lechería, diarrea neonatal, microbiota, patógenos.

---

# ABSTRACT

Neonatal diarrhea is one of the most critical challenges of the dairy industry around the world. High costs associated with morbidity and mortality of calves and the emergence of resistant pathogens due to the abuse of antimicrobials have led to the search for new strategies to prevent and treat this pathology. In this context, this work was based on the search for native probiotics as an alternative to address this problem, first characterizing its potential *in vitro* and secondly, its effect *in vivo* in dairy calves. *In vitro* screening was based on the analysis of resistance to an environment similar to that found in the gastrointestinal tract (GIT), antimicrobial effect, biofilm formation and adhesion to intestinal mucus and epithelial cells. From these results, four strains were selected and their ability to persist in the GIT of calves after oral administration was evaluated with qPCR. Then, strains TP1.3B (*Lactobacillus reuteri*) and TP1.6 (*Lactobacillus johnsonii*) were selected to assess their probiotic effect *in vivo*. They were administered orally to dairy calves which were monitored for one month (daily fecal score, incidence of diarrhea, weight and weekly blood count). Cytokine mRNA expression in blood and fecal and plasma IgA were quantified. Also, intestinal microbiota was analyzed by massive sequencing of the 16S ribosomal gene and some pathogens associated with DNT (Rotavirus, coronavirus, *Salmonella enterica*, *C. parvum* and three virulence factors of *E. coli*) were quantified by qPCR. There was a significant effect on the fecal score and the incidence of diarrhea, but no significant differences were observed in animal weights. The administration of probiotics had significant effects on the microbiota. In both treated groups decreased the abundance of *Escherichia/Shigella* and there was a significant increase in the

genus *Akkermansia* spp., widely recognized for its beneficial effects on the intestinal environment. No significant differences were found between the quantified pathogens. The results of this study indicate that both strains are potential probiotic for calves under artificial breeding systems.

**Keywords:**

Probiotics, calves, dairy, neonatal diarrhea, microbiota, pathogens.

---

# LISTA DE ABREVIACIONES

**ACTB:**  $\beta$ -actina

**ASV:** Amplicon Sequence Variant

**BAL:** Bacterias del ácido láctico

***Ct:*** (en la técnica de qPCR) Ciclo en el cual se supera el umbral de fluorescencia

**DNT:** Diarrea neonatal de terneros

**ICF:** Índice de consistencia fecal

**GAPDH:** Gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa

**GDP:** Ganancia diaria de peso

**GRAS:** Generally regarded as safe

**IgA:** Inmunoglobulina A

**NMDS:** Non-metric Multidimensional Scaling

**PERMANOVA:** Permutational Analysis of Variance

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**qPCR:** PCR cuantitativo

**TGI:** Tracto gastrointestinal

# TABLA DE CONTENIDOS

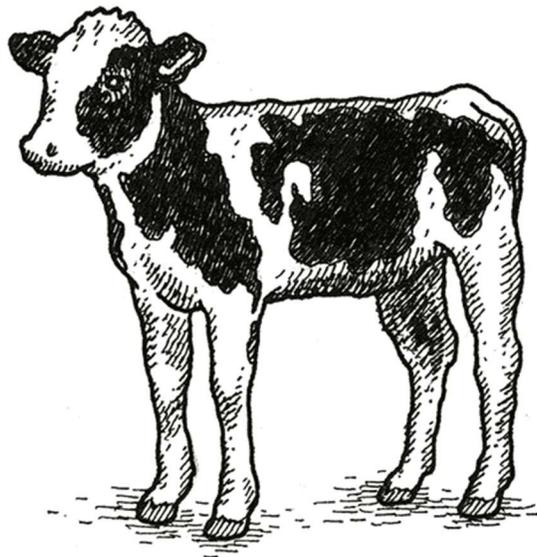
<b>Capítulo I.....</b>	<b>1</b>
1.1 Identificación del problema.....	1
1.2 Diarrea neonatal de terneros .....	2
1.3 Causas y agentes etiológicos de la DNT .....	3
1.4 Desarrollo de los terneros de lechería y manejo asociado .....	4
1.5 Género <i>Lactobacillus</i> y probióticos.....	6
1.6 Probióticos y DNT .....	10
1.7 Tesis.....	11
1.8 Hipótesis .....	12
1.9 Objetivo general y objetivos específicos.....	12
1.10 Estrategia general.....	12
<b>Capítulo II .....</b>	<b>14</b>
2.1 Resumen .....	15
2.2 Introducción.....	15
2.3 Objetivo .....	18
2.4 Estrategia general.....	18
2.5 Materiales y métodos.....	21
2.5.1 Aislamiento e identificación molecular de cepas nativas de <i>Lactobacillus</i> spp. ....	21
2.5.2 Tolerancia a pH bajo y presencia de sales biliares .....	22
2.5.3 Ensayo de actividad antimicrobiana .....	22
2.5.4 Evaluación de la formación de biofilm .....	23
2.5.5 Ensayo de adhesión a mucus intestinal bovino .....	24
2.5.6 Ensayo de adhesión a Caco-2 .....	25
2.5.7 Selección de cepas promisorias.....	26

2.5.8	Desarrollo de un medio de cultivo y liofilización .....	26
2.5.9	Diseño experimental del ensayo in vivo de persistencia.....	27
2.5.10	Animales y alojamiento .....	27
2.5.11	Cuantificación de lactobacilos y bacterias totales.....	29
2.5.12	Procesamiento de datos y análisis estadístico .....	31
2.6	Resultados .....	32
2.6.1	Aislamiento e identificación molecular .....	32
2.6.2	Resistencia a pH bajo y presencia de sales biliares.....	33
2.6.3	Efecto antimicrobiano.....	36
2.6.4	Formación de biofilm .....	36
2.6.5	Adhesión bacteriana a mucus intestinal.....	37
2.6.6	Adhesión a células Caco-2. ....	38
2.6.7	Criterio de selección de cepas probióticas para el ensayo de colonización in vivo .	39
2.6.8	Liofilización y medio de cultivo .....	39
2.6.9	Colonización del tracto gastrointestinal de terneros .....	40
2.7	Discusión.....	42
2.8	Conclusiones .....	48
<b>Capítulo III</b>	.....	<b>49</b>
3.1	Resumen .....	50
3.2	Introducción.....	50
3.3	Objetivo .....	53
3.4	Estrategia general.....	53
3.5	Materiales y métodos.....	54
3.5.1	Animales y alojamiento .....	54
3.5.2	Diseño experimental.....	55
3.5.3	Cuantificación de la expresión de citoquinas en sangre.....	57
3.5.4	Cuantificación de IgA total en plasma y heces .....	58
3.5.5	Análisis estadísticos .....	59
3.6	Resultados .....	59
3.6.1	Efecto sobre la incidencia de diarreas, score fecal, ICF y GDP.....	59
3.6.2	Efecto sobre parámetros inmune.....	64

3.7	Discusión.....	65
3.8	Conclusiones .....	71
<b>Capítulo IV .....</b>		<b>73</b>
4.1	Resumen .....	74
4.2	Introducción.....	74
4.3	Objetivo .....	80
4.4	Estrategia general.....	80
4.5	Materiales y métodos.....	81
4.5.1	Animales y diseño experimental .....	81
4.5.2	Extracción de ADN y ARN .....	82
4.5.3	Cuantificación de patógenos.....	82
4.5.4	Secuenciación masiva de 16S rRNA y procesamiento de datos.....	85
4.5.5	Visualización de datos y análisis estadísticos de datos de la secuenciación de 16S rRNA.....	86
4.5.6	Análisis estadísticos de otro tipo de datos .....	87
4.6	Resultados .....	87
4.6.1	Descripción general de la microbiota bacteriana .....	87
4.6.2	Diversidad alfa.....	89
4.6.3	Diversidad beta-PERMANOVA .....	90
4.6.4	Diversidad beta- Métodos de reducción dimensional.....	91
4.6.5	Cambios específicos en las comunidades.....	98
4.6.6	Perfil funcional .....	103
4.6.7	Patógenos.....	106
4.7	Discusión.....	107
4.8	Conclusiones .....	117
<b>Consideraciones Finales.....</b>		<b>119</b>
<b>Referencias Bibliográficas.....</b>		<b>122</b>
<b>Apéndice 1: .....</b>		<b>140</b>
<b>Apéndice 2: Scripts .....</b>		<b>146</b>

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN



## 1.1 IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

---

La lechería uruguaya ha crecido exponencialmente en las últimas décadas y representa la segunda actividad pecuaria luego de la cadena cárnica (DIEA/MGAP, 2017). La lechería se encuentra actualmente desafiada por el incremento de la demanda, la necesidad de agregar valor a la producción, la pérdida de tierras destinadas a la ganadería a expensas de la agricultura y la exigencia de un marco normativo internacional orientado a la producción saludable (Von Borell & Sørensen, 2004). Esto ha hecho que en los últimos años se hayan incrementado globalmente los sistemas ganaderos intensivos con el fin de mejorar los rendimientos en una menor área dedicada a la ganadería y en base a estrategias productivas sustentables (Alvarez *et al.*, 2008; Basset-Mens *et al.*, 2009). En Uruguay los procesos de intensificación han ido en aumento, pudiéndose observar una disminución progresiva de la superficie dedicada a la producción lechera (**FIGURA 1.1**). En la actualidad, en estos sistemas de producción se tiende a separar inmediatamente a los terneros de sus madres, los cuales son criados artificialmente desde su nacimiento y alimentados con leche del ordeño o sustitutos lácteos (Ventura *et al.*, 2013; Cantor *et al.*, 2019). En dichos sistemas, el estrés y la elevada concentración de animales pueden favorecer la difusión de enfermedades infectocontagiosas más rápidamente que los sistemas extensivos (Hänninen *et al.*, 2008; Proudfoot & Habing, 2015). La suma de estos factores trae consigo la dificultad de los terneros en adquirir una microbiota nativa saludable, lo que facilita la colonización intestinal de patógenos promoviendo enfermedades como la diarrea neonatal de terneros (**DNT**) (Signorini *et al.*, 2012).

Indicadores	2008/2009	2009/2010	2010/2011	2011/2012	2012/2013	2013/2014	2014/2015	2015/2016
Producción de leche comercial (millones de litros/año)	1.694	1.766	2.057	2.177	2.184	2.220	2.182	2.026
Superficie total de tambos (miles de ha)	800	857	850	817	806	798	771	763
Número de tambos totales (miles)	4,5	4,5	4,4	4,3	4,1	4	3,9	3,9
Total de vacunos lecheros (miles de cabezas)	710	764	793	755	803	778	783	767

**Figura 1.1.** Datos sobre la producción lechera en Uruguay entre los años 2008 y 2016 (DIEA/MGAP 2017).

## 1.2 DIARREA NEONATAL DE TERNEROS

La DNT es una importante enfermedad que afecta a terneros de producción, particularmente en sistemas intensivos, y es reconocida como uno de los mayores retos sanitarios de las industrias ganaderas y lecheras en el mundo (Lorenz *et al.*, 2011). Esta enfermedad puede afectar terneros que se encuentran entre las 12 h y los 35 días de vida (Blanchard, 2012). Las manifestaciones clínicas se caracterizan por presencia de heces acuosas y profusas, deshidratación progresiva, acidosis y en casos severos, muerte en pocos días (Meganck *et al.*, 2014). En EEUU se calcula que la DNT es la causa de al menos el 50% de las muertes de terneros de lechería (Meganck *et al.*, 2015). Por lo tanto, las pérdidas económicas debidas a la morbilidad y mortalidad de neonatos, los costos en tratamientos y las tasas de crecimiento lentas de los animales constituyen un problema común a nivel mundial para los productores ganaderos (Anderson *et al.*, 2003; Ok *et al.*, 2009). La falta de datos en Uruguay llevó a que recientemente investigadores de INIA-La Estanzuela realizaran un censo nacional asociado a una encuesta a productores lecheros de distintos departamentos y tamaño de producción. En este estudio, el porcentaje de mortalidad perinatal y durante el periodo de crianza estimado fue de aproximadamente el 15% a nivel nacional y el 95,2% de 209 establecimientos lecheros encuestados expresaron que la diarrea era uno de los principales signos clínicos asociados a la muerte durante el periodo de crianza (Schild, 2017). Esto implica importantes limitaciones en la reposición de las

hembras que son una prioridad para el incremento de los rodeos y el crecimiento del sector (FAOSTAT, 2007). Datos de la encuesta lechera de representatividad nacional realizada por el Instituto Nacional de la Leche (INALE, 2014) indicaron que en Uruguay del 30 al 55% de los productores lecheros no cuenta con suficientes vaquillonas de reemplazo. Esto es un indicador del impacto que tienen la mortalidad y la morbilidad de estos animales en el crecimiento del sector.

### 1.3 CAUSAS Y AGENTES ETIOLÓGICOS DE LA DNT

---

La DNT tiene una etiopatología compleja, debido a que varios agentes infecciosos, tanto individualmente como en combinación, pueden estar asociados a los brotes (Cho *et al.*, 2013). A su vez, problemas nutricionales y/o inmunológicos como fallas en la transferencia pasiva de la inmunidad, y factores medioambientales y de manejo, favorecen la transmisión de los agentes contagiosos e influyen en la severidad y el resultado de la enfermedad (Klein-Jöbstl *et al.*, 2014). Rotavirus, coronavirus, *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) y *Cryptosporidium parvum* suelen ser los cuatro agentes infecciosos más comúnmente asociados a la diarrea neonatal, aunque en los últimos años se han agregado a la lista de patógenos algunos *serovars* de *Salmonella enterica* y *E. coli* enterohemorrágica (Foster & Smith, 2009; Mohler *et al.*, 2009) (**FIGURA 1.2**). A su vez, los virus pueden actuar como factores predisponentes para infecciones bacterianas secundarias (Blanchard, 2012). Cabe destacar que estos agentes infecciosos pueden ser encontrados en heces de animales saludables y también sin problemas de diarrea, por lo que el desarrollo de la enfermedad dependerá de una relación desfavorable entre el estado del ternero y la presión por parte de los agentes infecciosos (Bartels *et al.*, 2010; Lorenz *et al.*, 2011).



**FIGURA 1.2.** Esquema representativo sobre los agentes más comúnmente asociados a diarreas en terneros de acuerdo con los días de vida. Datos obtenidos de: Foster *et al.* 2009 y Mohler *et al.* 2009.

## 1.4 DESARROLLO DE LOS TERNEROS DE LECHERÍA Y MANEJO ASOCIADO

En general, los nacimientos de los terneros en los tambos comerciales de tamaño mediano a grande se acumulan en dos momentos del año, marzo-abril y agosto-setiembre. Al momento del nacimiento, los terneros se encuentran desprovistos de inmunoglobulinas maternas debido a que la estructura de la placenta de los rumiantes no permite su transferencia *in utero*. Por lo tanto, la ingesta de calostro representa la única fuente de inmunoglobulinas para el neonato (Akins, 2016). La capacidad de absorber IgG del calostro empieza a decaer a partir de las 4hs de nacimiento y cesa completamente a las 24hs (Stott *et al.*, 1979a; b). Los terneros que no posean una adecuada concentración de inmunoglobulinas circulantes tienen mayores chances de padecer enfermedades infecciosas (Tyler *et al.*, 1998). Además, el calostro contiene otros componentes importantes como citoquinas, factores de crecimiento y un mayor valor nutricional que la leche (Godden, 2008). En nuestro país se determinó que la falla en la transferencia de inmunidad pasiva es uno de los determinantes en la aparición de diarreas en un establecimiento (Caffarena, 2017). Los factores que influyen en la calidad del calostro son el número de parto, raza de

la vaca y duración del período de sequía (período sin ordeño previo al parto) (Muller & Ellinger, 1981; Pritchett *et al.*, 1991; Tomkins & Jaster, 1991).

Durante las primeras semanas de vida los terneros son alimentados exclusivamente con leche o sustitutos lácteos. Hasta la tercera semana de vida los terneros se consideran no rumiantes o monogástricos ya que su rumen está subdesarrollado anatómicamente y fisiológicamente (Davis & Drackley, 1998; Baldwin *et al.*, 2010). En esta etapa, su dieta es predominantemente líquida y es dirigida directamente al abomaso a través del surco esofágico, evitando su ingreso al rumen (Davis & Drackley, 1998). El comienzo de la ingesta de alimentos sólidos alrededor de las 3 semanas de vida desencadena un proceso crítico de transición de un no rumiante funcional a un verdadero rumiante que se basa en el establecimiento y la actividad de la microbiota ruminal (Drackley, 2008).

Durante el transcurso de las primeras semanas de vida los terneros son susceptibles a la aparición de diarrea neonatal, ya sea de naturaleza infecciosa o digestiva. La terapia electrolítica es central en el tratamiento de la diarrea neonatal pero con frecuencia se administran antibióticos tanto para tratamiento como para prevención (Constable *et al.*, 2016). Su uso como promotores del crecimiento animal ya ha sido prohibido en la Unión Europea desde 2006 (Berge *et al.*, 2005) y en Uruguay desde el 2011 en el caso de bovinos y ovinos (Decreto N°98/011). El incremento de las preocupaciones sobre el riesgo en la selección de resistencia a antibióticos en el ambiente y en la persistencia de residuos químicos en productos de origen animal, ha llevado a la búsqueda de otras estrategias para mejorar la salud y la productividad del rebaño (Ferber, 2003). En este sentido, los probióticos surgen como una alternativa promisoriosa y día a día aumentan las investigaciones sobre el desarrollo de este tipo de productos. En general, los resultados obtenidos apoyan la visión que los probióticos pueden tener un efecto benéfico sobre el

balance de la microbiota del tracto gastrointestinal (TGI) y que ejercen un beneficio importante sobre la nutrición y salud animal (Chaucheyras-Durand & Durand, 2010). Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedero (Hill *et al.*, 2014). El uso de probióticos, específicamente de bacterias del ácido láctico (BAL) es una práctica que tiene ya varias décadas y en los últimos años se han realizado abundantes estudios sobre los efectos de la administración de cepas seleccionadas de *Lactobacillus* spp. y otras BAL tanto en humanos como en otros animales (Musa *et al.*, 2009; Kneifel & Salminen, 2010).

## 1.5 GÉNERO *LACTOBACILLUS* Y PROBIÓTICOS

---

*Lactobacillus* es un género bacteriano filogenéticamente muy diverso que comprende unas 125 especies (Dellaglio & Felis, 2005) y se los considera componentes importantes de la microbiota de mamíferos (Walter, 2008; Reid *et al.*, 2011). Son muy diversos a nivel genético con una amplia variación del contenido G+C (Schleifer and Ludwig 1995) aún entre grupos filogenéticamente relacionados, y en general se ha observado que el contenido G+C iría desde 32% a 54% (Felis & Dellaglio, 2007). Se cree que los mayores cambios evolutivos de este grupo asociados a la adaptación al intestino de mamíferos ha sido la capacidad de utilizar un mayor rango de carbohidratos, incluidos productos secundarios de la fermentación de almidón y celulosa (Ventura *et al.*, 2009). La segunda adaptación relacionada con el metabolismo tiene que ver con la pérdida de vías de síntesis *de novo* de aminoácidos y la ganancia de peptidasas y transportadores (Cai *et al.*, 2009).

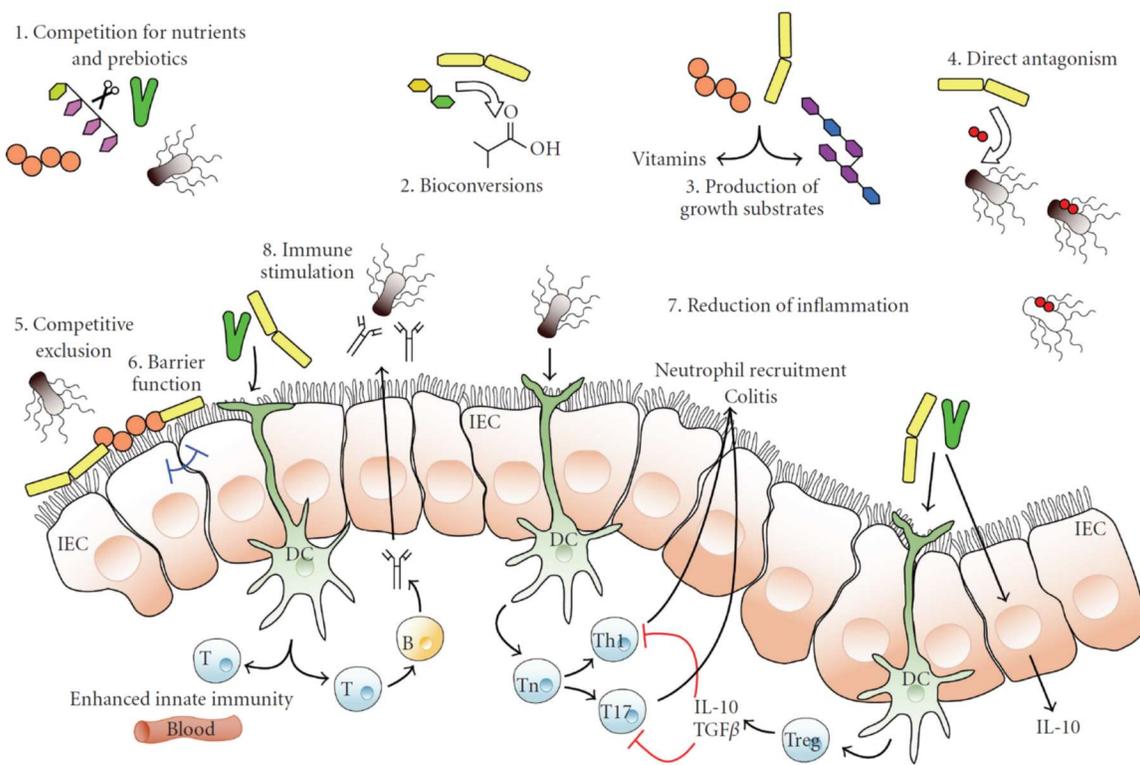
Este género ha sido muy estudiado a lo largo de la historia debido a su potencial biotecnológico y en las últimas décadas en asociación al beneficio de su consumo (Walter, 2008; Rai *et al.*, 2013). El hecho de que los lactobacilos

han sido consumidos desde hace siglos ha llevado al establecimiento del status de GRAS, “generally regarded as safe” (Bernardeau *et al.*, 2006). Junto con su historial de promoción de la salud, los lactobacilos se convirtieron en blancos para la explotación comercial como ingredientes probióticos en alimentos funcionales, particularmente en las últimas décadas (Vaughan *et al.*, 2002). La investigación de los mecanismos de acción de los probióticos en general, y los lactobacilos en particular, ha ingresado en una nueva etapa con el aumento del conocimiento sobre la complejidad y la importancia biológica de la microbiota intestinal (Bik, 2009; Sekirov *et al.*, 2010). Esto fue ayudado en gran medida por el desarrollo de métodos de mayor resolución para el estudio de la composición y función de comunidades bacterianas complejas (Zoetendal *et al.*, 2008; O’Toole & Claesson, 2010).

La microbiota intestinal desempeña un papel esencial en la salud. Participa en el metabolismo de los polisacáridos de la dieta (Cantarel *et al.*, 2012), metaboliza ciertos nutrientes (Fava *et al.*, 2006), produce vitaminas (Hill, 1997), regula la respuesta inmune a antígenos propios y no propios (Round & Mazmanian, 2009; Atarashi *et al.*, 2011) y protege frente a la invasión de patógenos (Ubeda *et al.*, 2017). Los efectos beneficiosos de los probióticos podrían deberse, en parte, a una acción indirecta mediada por los efectos sobre la microbiota (O’Toole & Cooney, 2008). Por lo tanto, la administración de probióticos podría afectar la composición y función de la microbiota debido a la competencia por sustratos de la dieta, la producción de compuestos que alteran el ambiente físico como el pH o por antagonismo directo a través de la producción de compuestos antimicrobianos como las bacteriocinas (O’Toole & Cooney, 2008) (**FIGURA 1.3**).

Los lactobacilos tienen un rango de interacciones conocidas o propuestas con el sistema inmune innato y adaptativo (Lebeer *et al.*, 2008), consistente con la idea de su rol como parte de la microbiota intestinal de los mamíferos y la co-

evolución con el sistema inmune del TGI (Goulet, 2015). Se han reportado efectos anti-inflamatorios que mejoran la función de barrera al remodelar las uniones estrechas (Miyachi *et al.*, 2009), y también se ha informado que los lactobacilos interactúan con o regulan la actividad de las células epiteliales (O'Hara *et al.*, 2006), macrófagos (Miettinen *et al.*, 1998), células dendríticas (Christensen *et al.*, 2002) y las células T reguladoras (von der Weid *et al.*, 2002).



**FIGURA 1.3.** Esquema que ilustra mecanismos potenciales o conocidos por los cuales las bacterias probióticas podrían impactar en la microbiota. Estos mecanismos incluyen (1) la competencia por los nutrientes, (2) la bioconversión de, por ejemplo, azúcares en productos de fermentación con propiedades inhibitorias, (3) la producción de sustratos de crecimiento, por ejemplo, EPS o vitaminas, para otras bacterias, (4) antagonismo directo por bacteriocinas, (5) exclusión competitiva por los sitios de unión, (6) función de barrera mejorada, (7) reducción de la inflamación, y (8) estimulación de la respuesta inmune innata. IEC: células epiteliales intestinales, DC: células dendríticas, T: linfocitos-T (O'Toole & Cooney, 2008).

La búsqueda de cepas probióticas está orientada en general a componentes de la microbiota habitual del huésped persiguiendo por un lado la inocuidad y por el otro la permanencia y adaptabilidad de las cepas administradas (Ripamonti *et al.*, 2011). Si el objetivo es la administración oral se busca que las cepas resistan la acción de sales biliares y medios ácidos para sobrevivir al tránsito gastrointestinal (Morelli, 2000; Bezkorovainy, 2001; Vinderola *et al.*, 2017) y que tengan la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal, tanto a las células del epitelio como al mucus que las recubre para aumentar la probabilidad de persistencia en el TGI (Ouwehand *et al.*, 1999; Servin & Coconnier, 2003). También se busca que inhiban el crecimiento y la adhesión de patógenos por desplazamiento y/o liberación de sustancias difusibles como bacteriocinas (Dunne *et al.*, 2001). Muchas bacterias se pueden encontrar en el ambiente formando *biofilms* adheridos a una superficie y contenidos en una matriz extracelular de producción propia. Se considera que los *biofilms* también cumplen un papel en la relación íntima existente entre las superficies bióticas y la microbiota asociada (Ocaña & Nader-Macías, 2002; Kolter & Greenberg, 2006). Las características probióticas de una cepa determinada no se pueden inferir a partir de su identificación ya que son específicas para una cepa dada (Dunne *et al.*, 1999; Chapman *et al.*, 2012). Por lo tanto, cuando se procura seleccionar probióticos, la caracterización se realiza considerando los aspectos individuales de cada cepa. (Morelli, 2000; FAO/WHO, 2002; Maldonado *et al.*, 2012). Al buscar cepas candidatas, también es deseable evaluar el potencial biotecnológico de las cepas. Los probióticos deben poder manejarse a escala industrial y deben permanecer viables durante el almacenamiento y uso (Meng *et al.*, 2008). El proceso de liofilización es uno de los más utilizados y se basa en la remoción del agua presente en una determinada matriz. Este proceso genera daños en la célula si ésta no se encuentra eficazmente protegida (Carvalho *et al.*, 2004).

## 1.6 PROBIÓTICOS Y DNT

---

Está demostrado que la administración de probióticos nativos puede inducir una disminución de la incidencia y severidad de la DNT (Signorini *et al.*, 2012). En varios estudios se determinó que su administración tuvo un efecto positivo sobre la incidencia de diarreas y el *score* fecal en terneros (von Buenau *et al.*, 2005; Jatkauskas & Vrotniakienė, 2014; Zhang *et al.*, 2015). Timmerman *et al.* (2005) observaron un efecto positivo en la incidencia y duración de diarreas y se demostró que los terneros que recibieron probióticos requirieron menos tratamientos contra enfermedades infecciosas que el grupo control. A su vez, se ha visto que la administración de probióticos disminuye de forma significativa el *score* fecal comparado con un tratamiento con antibióticos, indicando un mejor efecto profiláctico en la prevención de diarreas (Kim *et al.*, 2011). Además, en un estudio realizado por Sarker *et al.* (2010) se demostró que un grupo tratado con probióticos tuvo una mayor eficiencia en el aprovechamiento del alimento y una mayor ganancia de peso diario que el grupo control y el grupo tratado con antibióticos. Donovan *et al.* (2002) concluyeron en su estudio que es posible reemplazar los antibióticos por probióticos para la prevención de diarreas en animales jóvenes.

Cepas del género *Lactobacillus* así como otras BAL constituyen una parte importante de la microbiota intestinal normal de la mayoría de los animales (Gaggia *et al.*, 2010) y son ampliamente reconocidos por sus efectos benéficos, incluyendo el mantenimiento del balance apropiado de la microbiota, la inhibición de la colonización de patógenos y la mejora de la inmunidad del huésped (Isolauri *et al.*, 2001). Su uso como probióticos sigue la tendencia mundial que promueve prácticas alimenticias naturales, preventivas y libres de residuos (Frizzo *et al.*, 2010a). La experiencia en este campo indica que las mejores cepas bacterianas son aquellas cuyo huésped y nicho ecológico original

es el mismo en el cual van a ser usados, promoviendo así la localización, colonización, persistencia y seguridad (Ripamonti *et al.*, 2011).

## 1.7 TESIS

---

La diarrea neonatal es uno de los desafíos más importantes de la industria lechera alrededor del mundo. Los altos costos asociados a la morbilidad y mortalidad de los terneros y la aparición de resistencias por el uso indebido de antimicrobianos han llevado a la búsqueda de nuevas estrategias para prevenir y tratar esta patología. En este marco, este trabajo se basó en la búsqueda de probióticos nativos como una nueva alternativa para abordar este problema, caracterizando en primer lugar su potencial *in vitro* y en segundo lugar su efecto *in vivo* en terneros de lechería.

Este trabajo se divide en 4 capítulos. Este primer capítulo refiere a la introducción general al tema y la presentación de hipótesis y objetivos del trabajo. El segundo capítulo se basa en el aislamiento, identificación y caracterización *in vitro* de cepas de *Lactobacillus* spp. aisladas de terneros sanos criados al pie de la madre, y como parte de la caracterización se evaluó la persistencia de cuatro cepas seleccionadas en el tracto gastrointestinal de terneros. El tercer y cuarto capítulo están enmarcados en un ensayo *in vivo* realizado en dos instancias de parición que se realizó para determinar el efecto de la administración oral de dos cepas seleccionadas. En el capítulo 3 se analiza el efecto sobre la diarrea, ganancia de peso y parámetros del sistema inmune, y en el capítulo 4 se analiza el efecto sobre la microbiota fecal y presencia de algunos patógenos asociados a la DNT.

## 1.8 HIPÓTESIS

---

El uso de probióticos nativos aislados y caracterizados a partir de materia fecal de terneros sanos disminuye la incidencia de DNT en terneros en sistemas de cría intensivos y semi-intensivos.

## 1.9 OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

---

El objetivo general de este estudio fue evaluar el efecto de potenciales probióticos en la incidencia de diarreas de terneros criados bajo sistemas artificiales y dilucidar posibles mecanismos de acción.

Los objetivos específicos fueron:

- 1) Aislar e identificar cepas nativas de *Lactobacillus* spp. a partir de materia fecal de terneros sanos, caracterizar su potencial probiótico *in vitro* y determinar la persistencia de cepas seleccionadas en el tracto gastrointestinal de terneros.
- 2) Evaluar el efecto de la administración de probióticos en la DNT, parámetros de salud y sistema inmune de terneros de lechería.
- 3) Determinar el efecto de la administración de probióticos sobre la microbiota fecal y patógenos asociados a la DNT.

## 1.10 ESTRATEGIA GENERAL

---

La estrategia de este trabajo se basó, en primer lugar, en el aislamiento y la identificación de cepas *Lactobacillus* spp. a partir de heces de terneros criados al pie de la madre, con el fin de construir una colección de cepas para ser caracterizadas *in vitro* en su potencial probiótico. Ninguno de los terneros estaba cursando un cuadro diarreico en ese momento ni habían sido tratados

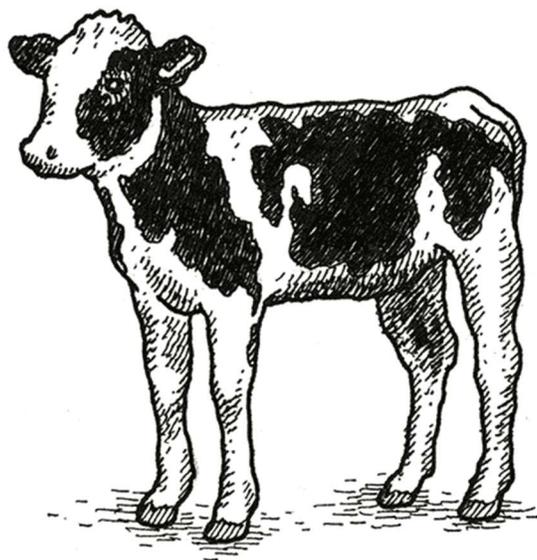
con antibióticos. Para el aislamiento y la identificación se emplearon procedimientos de microbiología y biología molecular. La afiliación filogenética se realizó a partir de la secuenciación del gen ribosomal 16S.

En una segunda etapa se caracterizó el potencial probiótico *in vitro* de las cepas a partir de la evaluación de la resistencia a pH ácido, presencia de sales biliares, formación de *biofilm*, efecto antimicrobiano, adhesión a mucus y células Caco-2. También se evaluó la capacidad de supervivencia en condiciones de preservación a largo plazo (liofilización) para valorar la posibilidad de formular un producto probiótico. De acuerdo con los resultados obtenidos se seleccionaron cuatro cepas para evaluar la persistencia en el TGI en terneros mediante la técnica de PCR cuantitativo (qPCR). En esta etapa se utilizó como aproximación la cuantificación de las especies probióticas administradas antes, durante y después del período de administración oral. Para la siguiente instancia se seleccionaron dos cepas para evaluar su efecto sobre la incidencia y severidad de DNT y dilucidar posibles mecanismos de acción en el hospedero. Se realizó un ensayo *in vivo* en dos instancias, una en primavera y otra en otoño siguiendo el cronograma de pariciones del tambo experimental de INIA-La Estanzuela. En cada instancia se evaluó el efecto de la administración sobre el *score* fecal diario, incidencia de diarreas, ganancia de peso diaria y hemogramas semanales. Además, se evaluó el efecto en determinados parámetros del sistema inmune como la expresión de citoquinas en sangre (qPCR) y la cantidad de IgA total en suero y materia fecal (ELISA). Por último, se evaluaron cambios en la microbiota intestinal mediante la secuenciación masiva de la región hipervariable V4 de gen ribosomal 16S y análisis bioinformáticos y la cuantificación de patógenos asociados a la DNT (qPCR).

---

# CAPÍTULO II

## AISLAMIENTO, SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *LACTOBACILLUS* SPP. NATIVOS DE TERNEROS



## 2.1 RESUMEN

---

El uso de microorganismos nativos con capacidad probiótica es una herramienta alternativa para el tratamiento y la prevención de varias enfermedades que afectan a los animales, como la diarrea neonatal de terneros (DNT). La caracterización de cepas dentro de una colección se puede basar en diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo*, que podrían predecir su potencial probiótico. El objetivo de este capítulo fue aislar y caracterizar cepas nativas de *Lactobacillus* spp. provenientes heces de terneros sanos. Los aislamientos se evaluaron en función de su capacidad para sobrevivir a condiciones de pH bajo y presencia de sales biliares, formación de *biofilms*, efecto antimicrobiano y adhesión a mucus intestinal y células Caco-2. En base a los resultados obtenidos *in vitro*, se seleccionaron cuatro cepas (*Lactobacillus johnsonii* TP1.1, *Lactobacillus reuteri* TP1.3B, *Lactobacillus johnsonii* TP1.6 y *Lactobacillus amylovorus* TP8.7) para evaluar su capacidad para colonizar y persistir en el TGI de terneros. La evaluación de la persistencia se basó en un ensayo de administración oral de estas cepas y cuantificación en heces de las especies bacterianas administradas utilizando PCR cuantitativa (qPCR). El estudio se realizó con 15 terneros (1 mes de edad) que se dividieron en cinco grupos de tres animales, cuatro de los cuales se trataron con cuatro cepas diferentes y uno fue el grupo control. Las cepas TP1.3B y TP1.6 lograron persistir en los animales tratados hasta diez días después del final del período de administración, lo que indicó que podrían ser candidatos prometedores para el diseño de probióticos para terneros.

## 2.2 INTRODUCCIÓN

---

La búsqueda de probióticos se centra en microorganismos no patogénicos que sean parte de la microbiota nativa de hospederos sanos (Frese *et al.*, 2011; Ripamonti *et al.*, 2011). Luego existe un proceso de selección de cepas

candidatas basado en pruebas *in vitro* que permiten inferir sobre su potencial probiótico. Es deseable que las cepas resistan la acción de ácidos y sales biliares para poder sobrevivir el pasaje a través del tracto gastrointestinal y llegar viables al sitio de acción (Bezkorovainy, 2001; Morelli, 2007; Maldonado *et al.*, 2012). Los microorganismos entéricos han desarrollado mecanismos de tolerancia al estrés del ambiente gastrointestinal, que incluye grandes variaciones de pH y el efecto antimicrobiano de las sales biliares (Azcarate-Peril *et al.*, 2004; Bruno-Bárcena *et al.*, 2004).

Cuando las bacterias son expuestas a un ambiente ácido, las bombas de hidrogeniones de las ATPasas mantienen las homeostasis intracelular (Wang *et al.*, 2013). Algunos mecanismos involucrados en la resistencia al estrés ácido en BAL son las arginina deaminasas (Fulde *et al.*, 2014) y las aminoácido descarboxilasas (Azcarate-Peril *et al.*, 2004; Papadimitriou *et al.*, 2016), entre otros. En el TGI, luego de enfrentarse a condiciones ácidas, en el siguiente paso del proceso digestivo existe un aumento del pH y un enfrentamiento a concentraciones variables de sales biliares. La presencia de sales biliares en los primeros tramos del intestino es otro de los desafíos que se encuentran los microorganismos durante el pasaje por el tracto gastrointestinal. La principal función de las sales biliares es facilitar la solubilización y la absorción de las grasas de la dieta (Hofmann, 1994). En el ser humano se sabe que en condiciones fisiológicas normales el intestino presenta un gradiente de concentración de entre el 2% y 0,05% y es uno de los factores que afecta la composición de la comunidad microbiana presente en el tracto gastrointestinal (Islam *et al.*, 2011). Las sales biliares son altamente tóxicas y por lo tanto, las bacterias que colonizan el intestino, incluidos los lactobacilos, han desarrollado mecanismos de defensa específicos para resistir la acción nociva causada por estos compuestos (Ruiz *et al.*, 2013). La fuerte naturaleza lipofílica del anillo esteroide hace que la membrana celular sea el blanco principal de estas

moléculas, alterando el empaquetamiento de los lípidos y rompiendo la fuerza protón-motriz, lo que causa la muerte celular (Kurdi *et al.*, 2006). En general, la resistencia a las sales biliares es un fenómeno multifactorial. Los mecanismos de resistencia más frecuentes incluyen bombas de eflujo, hidrólisis de sales biliares, cambios en la composición de la membrana y la pared celular y mecanismos de respuesta a estrés (Ruiz *et al.*, 2013). Si bien se considera que los procesos de resistencia bacteriana al estrés gastrointestinal son conservados, existen diferencias entre distintas cepas (Chapman *et al.*, 2012; Douillard *et al.*, 2013; Arnold *et al.*, 2018).

En las fases iniciales de colonización del TGI, los microorganismos deben soportar el flujo de material en la luz del intestino y evitar ser removidos completamente. Se distribuyen formando microhábitats, colonizando distintos nichos metabólicos y muchos se encuentran formando microcolonias y estructuras similares a los *biofilms* (Macfarlane & Dillon, 2007). Se considera que los *biofilms* cumplen un papel en la relación íntima existente entre las superficies bióticas y la microbiota asociada (Ocaña & Nader-Macías, 2002; Kolter & Greenberg, 2006). Además de la formación de *biofilms*, las cepas en general son evaluadas en su capacidad de adherirse al mucus y células epiteliales como forma de inferir en la capacidad de colonización del TGI (Ouwehand *et al.*, 2001). La habilidad de un probiótico de colonizar es una característica importante y deseable porque se considera necesaria para poder ejercer efectos beneficiosos al hospedero (Gaggia *et al.*, 2010; Esvaran & Conway, 2012; Papadimitriou *et al.*, 2015; Varankovich *et al.*, 2015).

Otra característica deseable es la capacidad de inhibir el crecimiento y la adhesión de patógenos, ya sea por desplazamiento (Collado *et al.*, 2007) o liberación de sustancias difusibles con efecto antimicrobiano (Dunne *et al.*, 2001). Además de la producción de metabolitos antimicrobianos conocidos, como los ácidos orgánicos, ácidos grasos, peróxido de hidrógeno y diacetilo

(Ouweland, 1998), las bacterias probióticas también pueden producir agentes inhibidores especializados como las bacteriocinas (Dobson *et al.*, 2012). Los microorganismos blanco comúnmente incluyen bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos y recientemente se ha observado actividad antiviral (Al Kassaa *et al.*, 2014).

Los análisis de persistencia no son comúnmente incluidos dentro de los pasos de *screening* de las cepas debido a su complejidad y a la necesidad de utilizar modelos animales. El análisis de la persistencia de una determinada cepa, sea probiótica, patógena o comensal requiere que se pueda diferenciar de la microbiota residente del individuo. Muchos trabajos han realizado aislamientos de colonias con morfología similar a la esperada y luego técnicas de tipificación (Östblom *et al.*, 2011), otros han utilizado variantes resistentes a algún antimicrobiano de forma de simplificar el paso de cultivo y recientemente se ha empezado a utilizar la metagenómica (Raveh-Sadka *et al.*, 2016; Smillie *et al.*, 2018).

## 2.3 OBJETIVO

---

Aislar e identificar cepas nativas de *Lactobacillus* spp. a partir de materia fecal de terneros sanos, caracterizar su potencial probiótico *in vitro* y determinar la persistencia de cepas seleccionadas en el tracto gastrointestinal de terneros.

## 2.4 ESTRATEGIA GENERAL

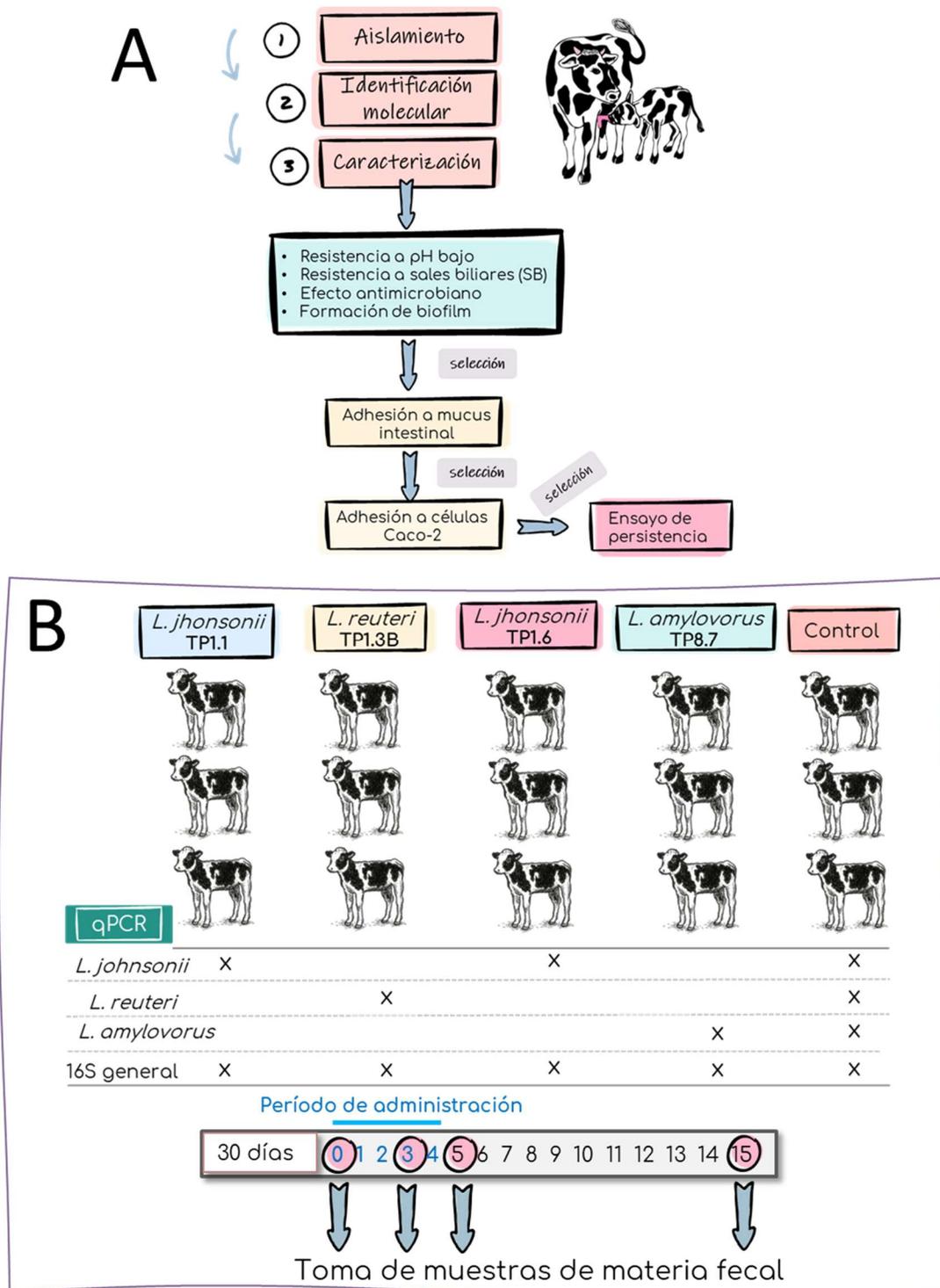
---

En primera instancia se realizó el aislamiento de *Lactobacillus* spp. en medios Rogosa y MRS agar de terneros sanos lactantes al pie de la madre y que no habían recibido tratamiento con antibióticos. Luego se realizó la identificación mediante la secuenciación del gen ribosomal 16S de las cepas, con las cuales se realizaron árboles filogenéticos para determinar sus identidades. A partir de este punto se seleccionaron las cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* por

ser consideradas “GRAS”. A todas las cepas se les realizaron análisis de resistencia a pH=2 por 2 h, resistencia a 0,3% de sales biliares bovinas por 4 h, formación de *biofilm* y efecto antimicrobiano frente a *E. coli* y *Salmonella* Typhimurium. Luego se seleccionaron las 35 cepas con resultados más prometedores y se analizó su capacidad de adhesión a mucus intestinal extraído de terneros. Como último paso de caracterización *in vitro* se realizaron ensayos de adhesión a línea celular Caco-2. Se seleccionaron 4 cepas promisorias y se evaluó, de forma indirecta, la capacidad de persistir en el TGI de terneros mediante la cuantificación relativa de la especie administrada por qPCR.

Los resultados presentados en este capítulo han dado lugar a la siguiente publicación:

**Fernández, S.**, Fraga, M., Silveyra, E., Trombert, A., Rabaza, A., Pla, M., and Zunino, P. 2018. Probiotic properties of native *Lactobacillus* spp. strains for dairy calves. *Beneficial Microbes*: 1–12.



**FIGURA 2.1.** Esquema de la estrategia experimental del Capítulo 2. En (A) se muestra la estrategia de la caracterización *in vitro*. En (B) se muestra el ensayo de persistencia con terneros y se indica cuáles especies de lactobacilos se cuantificaron en los determinados grupos

## 2.5 MATERIALES Y MÉTODOS

---

### *2.5.1 Aislamiento e identificación molecular de cepas nativas de *Lactobacillus* spp.*

Las cepas fueron aisladas de 10 terneros lactantes de entre 1 y 6 meses de edad que se encontraban en 3 establecimientos distintos de nuestro país (Colonia, Lavalleja y San José). Los terneros eran sanos, criados al pie de la madre, no se encontraban bajo tratamiento y no habían recibido antimicrobianos. Las heces recolectadas de la ampolla rectal de los animales fueron refrigeradas para ser procesadas en el laboratorio en un tiempo menor a 3 h. A una fracción de las heces se adicionó buffer fosfato salino (PBS) en una relación 1:10 que luego se homogenizó utilizando un Stomacher™ 400 (Seward, London, UK) por 2 min. Diluciones seriadas al décimo de la suspensión de heces se cultivaron en los medios MRS y Rogosa (Merck, USA) y se incubaron por 48 h en microaerofilia a 37 °C. Colonias individuales fueron repicadas e incubadas a 37 °C en anaerobiosis utilizando AnaeroGen™ y AnaeroJar™ (Oxoid, Basingstoke, UK) por 48 h. Las cepas Gram positivas, con reacciones de catalasa y oxidasa negativas fueron almacenadas en MRS con 20% de glicerol a -80 °C para su posterior caracterización. Rutinariamente las cepas fueron cultivadas en agar o caldo MRS y cultivadas en microaerofilia a 37 °C.

La identificación molecular se realizó mediante la amplificación parcial y secuenciación del gen ribosomal 16S utilizando los *primers* universales 27F y 1492R (Lane, 1991). El ADN genómico total de cada cepa fue extraído con el kit GenElute™ (Sigma-Aldrich, USA). Las reacciones de PCR fueron realizadas de acuerdo a procedimientos previamente descriptos (Fraga *et al.*, 2014). Los amplicones se secuenciaron con la metodología de Sanger en la empresa MacroGen Inc. Se construyó un árbol filogenético con las secuencias

obtenidas y secuencias de la base de datos RDP (Cole *et al.*, 2014) con el programa MEGAX (Kumar *et al.*, 2018). Con este programa se determinó que el mejor método para la clasificación fue Máxima Verosimilitud con los parámetros Kimura-2 (K2+G+I) y se realizó el *bootstrap* con 500 réplicas. Como “outgroup” se utilizaron secuencias de *Lactococcus lactis* NCDO y *Streptococcus salivarius* ATCC 19258.

### *2.5.2 Tolerancia a pH bajo y presencia de sales biliares*

La tolerancia a pH bajo y sales biliares fue evaluada según Maragkoudakis *et al.* (2006) con algunas modificaciones. Brevemente, cultivos frescos de lactobacilos (18 h) se centrifugaron (10.000 xg por 10 min), se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron para obtener una concentración aproximada de  $5 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) en las siguientes soluciones: caldo MRS ajustado a pH=2, caldo MRS ajustado a pH=7 conteniendo 0,3% de sales biliares (Sigma-Aldrich, USA), y caldo MRS como control (pH=5,7). Las suspensiones fueron incubadas a 37 °C por 2 h para evaluar la tolerancia a medio ácido y por 4 h para evaluar la tolerancia a sales biliares. Se tomaron muestras al principio y al final de la incubación para determinar el recuento de bacterias viables en placa. Cada cepa se evaluó en triplicados. Para determinar la resistencia los recuentos se convirtieron a  $\log_{10}$  y luego se restó el recuento inicial menos el final.

### *2.5.3 Ensayo de actividad antimicrobiana*

La actividad antimicrobiana fue evaluada contra dos patógenos bacterianos asociados a la DNT, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S.* Typhimurium) y *Escherichia coli* (*E. coli*). Las cepas de *E. coli* denominadas 52.1 y 61.1 habían sido aisladas previamente de casos severos de DNT en Uruguay y fueron caracterizadas según la presencia de factores de virulencia,

en el trabajo de Umpiérrez *et al.* (2016). La cepa de *S. Typhimurium* forma parte del cepario del Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. La detección de actividad antimicrobiana se realizó a través del método descrito por Jacobsen *et al.* (1999). Brevemente, cultivos frescos de los lactobacilos se centrifugaron (10.000  $\times g$  por 10 min), se lavaron dos veces con PBS y luego se resuspendieron en PBS para obtener una concentración de ca.  $5 \times 10^7$  UFC/ml. Un volumen de 2  $\mu$ l de cada suspensión bacteriana se colocó sobre placas que contenían 15 ml de agar MRS y se incubaron a 37 °C en microaerofilia por 24 h para que se desarrollaran colonias en *spots*. Luego, 100  $\mu$ l de un cultivo fresco de las cepas indicadoras (*E. coli* o *S. Typhimurium*) fue mezclado con 8 ml de agar BHI *soft* (0,8% agar) y esta mezcla se volcó sobre la placa de MRS con las colonias de lactobacilos. Las placas fueron incubadas a 37 °C en microaerofilia por 48 h y luego se midieron las zonas de inhibición del crecimiento. Cada cepa fue evaluada en triplicado y en cada placa se usó como control positivo *Lactobacillus murinus* LbP2 (Perelmuter *et al.*, 2008).

#### *2.5.4 Evaluación de la formación de biofilm*

El método utilizado se basó en el trabajo de Lebeer *et al.* (2007) con algunas modificaciones. Brevemente, cultivos frescos (20 h) de las cepas fueron centrifugados, lavados dos veces con PBS y resuspendidos en medio mTSB (15 g/l de TSB y 20 g/l de Proteosa Peptona) a una concentración de ca.  $5 \times 10^7$  UFC/ml. Se sembraron 200  $\mu$ l de las suspensiones en placas de poliestireno de 96 pocillos y se incubó de forma estática, en microaerofilia a 37 °C por 48 h. Para cuantificar la formación del biofilm, los pocillos fueron lavados dos veces con PBS y las bacterias adheridas fueron teñidas por 30 min con 200  $\mu$ l de cristal violeta 1% (m/v) en una solución de isopropanol-metanol-PBS (1:1:18 [v/v]). El exceso de colorante fue removido al lavar dos veces con PBS y se

dejó secar la placa al aire (30 min). El colorante adherido al biofilm fue solubilizado con 200  $\mu$ l de etanol 95%. Se midió la densidad óptica (DO) de cada pocillo a 570 nm en el espectofotómetro de placas Varioskan™ Flash Plate Reader (Thermo Fisher Scientific, USA). Cada cepa fue evaluada en dos experimentos independientes por triplicado. Siempre se incluyó medio mTSB estéril (sin inocular) como control negativo y como blanco. Las cepas fueron clasificadas en su capacidad de formar *biofilm* siguiendo el método de Stepanović *et al.* (2000). Este se basa en el establecimiento de rangos de valores de DO de forma de clasificar a las cepas en: no formadoras de biofilm (-), formación baja (+), formación moderada (++), y alta formación de biofilm (+++).

### *2.5.5 Ensayo de adhesión a mucus intestinal bovino*

Las cepas seleccionadas fueron evaluadas en su capacidad de adherirse al mucus intestinal de terneros. En primer lugar se extrajo mucus intestinal de 3 terneros sanos a partir de materia fecal fresca utilizando un método de doble precipitación etanólica (Ouwehand *et al.*, 1999) (**Apéndice 1**). Una vez obtenido, el mucus se liofilizó y conservó a  $-20$  °C hasta su utilización. El método de evaluación de la adhesión se basó en el procedimiento descrito por Izquierdo *et al.* (2008) con modificaciones. Brevemente, se sembraron 200  $\mu$ l de mucus (1 mg/ml en agua) en placas de poliestireno (Microclon®, Greiner Bio-One), y se incubó a 4 °C hasta el día siguiente. Cultivos frescos de las cepas se centrifugaron, se lavaron dos veces con PBS e incubaron con 100  $\mu$ M de 5(6)-carboxyfluoresceína diacetato (5(6)-CFDA) (Molecular Probes, USA) a 37 °C por 1 h. CFDA sirve como sustrato para esterasas intracelulares liberando el producto fluorescente 2,7-diclorofluoresceína, evidenciando la presencia de células vivas (Bianchi *et al.*, 2004). Luego, la suspensión bacteriana marcada fue centrifugada y lavada para remover el exceso de

fluoróforo. A continuación, se sembró la suspensión bacteriana marcada en las placas de poliestireno que contenían mucus por 1 h a 37 °C y en oscuridad (*ca.*  $5 \times 10^7$  UFC/ml). Finalizada la incubación, los pocillos se lavaron con PBS dos veces para remover las bacterias no adheridas. Las bacterias adheridas al mucus se lisaron con 200  $\mu$ l de una solución de NaOH (0,1M) y SDS (1% m/v) y se incubó en oscuridad a 60 °C por 1 h. El contenido de cada pocillo fue luego transferido a placas de poliestireno blancas (FluoTrac®, Greiner Bio-one) y se midió la fluorescencia con  $\lambda_{ex}$ = 480 nm y  $\lambda_{em}$ = 520 nm en el lector FLUOstar Optima (BMG Labtech, Germany) (metodología detallada en **Apéndice 1**). La adhesión se expresó como porcentaje de fluorescencia recuperado luego de la unión a mucus relativa a la fluorescencia del inóculo inicial. Los ensayos se realizaron en triplicados y en cada placa se incluyeron blancos y la cepa LbP2 como control positivo de adhesión (Perelmuter *et al.*, 2008).

### *2.5.6 Ensayo de adhesión a Caco-2*

La capacidad de adhesión a enterocitos fue evaluada utilizando la línea celular Caco-2 (epitelio colorrectal humano) con el método propuesto por Jensen *et al.* (2012) con algunas modificaciones. La línea celular Caco-2 fue cultivada rutinariamente en medio DMEM/High Glucose™ (Thermo Fisher Scientific, USA) con 10% de suero fetal bovino (Gibco/Life Technologies, USA) e incubadas a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Para los ensayos de adhesión,  $5 \times 10^5$  células Caco-2 fueron agregadas a placas de 96 pocillos de cultivo celular (TrueLine, USA) e incubadas hasta alcanzar un valor de confluencia de 95-100% (generalmente 1 o 2 días). Cultivos frescos de las cepas fueron centrifugados, lavados dos veces y resuspendidos en medio DMEM para obtener una concentración de  $5 \times 10^6$  UFC/ml. Un volumen de 100  $\mu$ l de las suspensiones fue agregado a los pocillos y la placa fue incubada por 3 h a 37

°C en atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Para eliminar las bacterias no adheridas los pocillos fueron lavados dos veces con PBS. Luego, las células Caco-2 fueron lisadas con 100 µl de una solución de 0,1% de Tritón X-100, y la suspensión de bacterias remanentes fue sembrada en agar MRS para realizar recuentos en placa. El porcentaje de adhesión fue expresado en relación con el inóculo inicial. Los ensayos fueron realizados en triplicados y en tres experimentos independientes. En cada placa se agregaron controles negativos y el control positivo de adhesión fue *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) (metodología detallada en **Apéndice 1**).

### *2.5.7 Selección de cepas promisorias*

Luego de la caracterización *in vitro*, se evaluaron los resultados obtenidos para cada cepa y se seleccionaron las 4 más promisorias. Los criterios de selección se describen en la sección de Resultados. Las cepas seleccionadas fueron evaluadas de acuerdo con la predicción acerca de su habilidad para colonizar el TGI de los terneros.

### *2.5.8 Desarrollo de un medio de cultivo y liofilización*

Se desarrolló un medio de cultivo libre de componentes animales para el crecimiento de las cepas, de acuerdo con los criterios internacionales dirigidos a evitar los riesgos de transmisión de enfermedades priónicas. La estrategia fue la sustitución de los componentes de origen animal del medio MRS con componentes de origen vegetal, manteniendo en principio las mismas concentraciones de sales y oligoelementos. Las cepas seleccionadas fueron liofilizadas antes de ser utilizadas en ensayos *in vivo*. Cultivos líquidos de cada cepa fueron inoculados en una proporción de 2% (v/v) en el caldo sin componentes de origen animal y este se incubó a 37 °C por 18 h en condiciones de microaerofilia. Luego, al comienzo de la fase estacionaria de crecimiento,

las células fueron centrifugadas (10.000 xg por 15 min) a 4 °C y lavadas dos veces con PBS. Por último, las cepas fueron resuspendidas en una solución de 20% (m/v) de leche descremada (previamente esterilizada por 7,5 minutos en autoclave). El volumen de la solución de leche descremada fue 5 veces menor al volumen inicial de forma de concentrar los cultivos. Esta suspensión fue dividida en fracciones de 5 ml y cada fracción se congeló por 2 h en freezer de -80 °C y luego se liofilizó bajo vacío (menos de 1 Pa) por 24 h. Los liofilizados fueron guardados a 4 °C hasta su uso.

### *2.5.9 Diseño experimental del ensayo in vivo de persistencia*

Quince animales de 30 días fueron divididos al azar en 5 grupos de 3 individuos. A 4 grupos se les administró oralmente las 4 cepas seleccionadas (una cepa por grupo) y el quinto grupo fue el control que recibió el vehículo estéril. Para la administración, las cepas liofilizadas (*ca.*  $5 \times 10^9$  UFC) (Simon, 2005) fueron reconstituidas en agua destilada y administradas oralmente una vez al día por 5 días consecutivos (**día 0 a 4**). Se recolectó materia fecal momentos antes de administrar la primera dosis (**día 0**) y en los días **3, 5 y 15**. Las muestras fueron congeladas a -20 °C inmediatamente hasta su procesamiento. Para minimizar la incidencia de diarreas durante el período experimental, la administración de las cepas comenzó cuando los animales tenían entre 30 y 35 días de vida.

### *2.5.10 Animales y alojamiento*

El experimento se realizó en el tambo experimental de INIA-La Estanzuela (Ruta 50, km 11, Colonia), en un área especialmente seleccionada para el ensayo. Los 15 terneros machos Holando se criaron desde su nacimiento hasta el fin del ensayo y recibieron dos dosis (4 l en total) de calostro artificial (Saskatoon Colostrum Company, Saskatoon, Canadá) dentro de las primeras

12 h de nacimiento y se desinfectó el ombligo con una solución de yodo al 7%. En los siguientes días se comprobó que la transferencia pasiva de inmunidad había sido suficiente a partir de la medida de concentración de proteínas totales en suero por refractometría (Morrill *et al.*, 2013; Deelen *et al.*, 2014; Thornhill *et al.*, 2015) con PAL-3 Digital Pocket Refractometer (Atago, Japan). Los animales recién nacidos fueron alojados bajo techo (**FIGURA 2.2A**) y se alimentaron con 2 l de leche sin pasteurizar proveniente del tanque de enfriamiento del tambo en biberón dos veces al día hasta los cinco días de vida. Luego se colocaron a campo en estaca con baldes (**FIGURA 2.2B**) donde se siguieron los mismos horarios de alimentación y se agregó agua y dos dosis de ración diarias (Erro Nutriterna, 18% de proteína). Se administraron agua (2 l cada vez) y ración (300 g cada vez) dos veces al día, 2 h después del consumo de leche. Las cepas probióticas se administraron de forma oral reconstituidas en 10 ml de agua, 1 h después de la leche de la mañana. La temperatura de la leche administrada a cada ternero se controló estrictamente y se mantuvo entre 37 y 39 °C. Cada semana los terneros eran movidos a lugares libres de materia fecal, manteniendo una distancia mínima entre ellos de 3 metros. El manejo de los animales se realizó con la presencia constante de médicos veterinarios y con la aprobación de los comités de ética correspondientes (CEUA, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable y CHEA, Facultad de Veterinaria).



**FIGURA 2.2.** A) Unidad de alojamiento de animales recién nacidos hasta los 5 días de vida. B) Terneros a campo alimentados en estaca con balde

### *2.5.11 Cuantificación de lactobacilos y bacterias totales.*

Se utilizó la técnica de PCR cuantitativa (qPCR) para cuantificar, en las heces de los terneros, las especies de *Lactobacillus* administradas (*L. amylovorus*, *L. johnsonii* y *L. reuteri*) y bacterias totales antes (día 0), durante (día 3 y 5) y después (día 15) del período de administración oral. *L. amylovorus* se cuantificó en el grupo que se administró la cepa *L. amylovorus* TP8.7, *L. johnsonii* se cuantificó en los grupos que se administraron las cepas *L. johnsonii* TP1.1 y TP1.6, y *L. reuteri* se cuantificó en el grupo que se le administró la cepa *L. reuteri* TP1.3B. En el grupo de control las tres especies fueron cuantificadas y en todos los grupos se cuantificó el gen que codifica para el ARNr 16S. La extracción del ADN bacteriano total de las muestras de heces se realizó usando ZR Fecal DNA MiniPrep® (ZYMO Research, USA) siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante. El paso de agitación se realizó con FastPrep-24® a

6 m/s durante 40 s. Los *primers* utilizados para la cuantificación de *L. johnsonii* fueron los descritos por Furet *et al.* (2004) mientras que los *primers* utilizados para la cuantificación de *L. reuteri* y *L. amylovorus* fueron diseñados en este trabajo (**TABLA 2.1**). Los *primers* dirigidos a *L. amylovorus* se diseñaron en base a la secuencia específica de una proteína hipotética publicada por Konstantinov *et al.* (2005). Para diseñar los *primers* dirigidos a detectar *L. reuteri* se seleccionaron regiones conservadas del gen de la inulosucrasa, una fructosiltransferasa importante en la síntesis de exopolisacáridos, formación de biofilm y colonización intestinal (Walter *et al.*, 2008; Wegmann *et al.*, 2015). Secuencias publicadas de ambas proteínas fueron analizadas en el programa MEGAX para determinar si existían regiones variables y conservadas en la secuencia nucleotídica. Con el programa *primer3* se diseñaron los *primers* especificando que el rango de tamaño del amplicón debía estar entre 130 y 300 pb. Por otro lado, se determinó el número total de copias del gen ribosomal 16S con los *primers* descritos por Denman y McSweeney (2006).

Todas las reacciones de qPCR se realizaron con el equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BioRad, USA). El volumen final de cada reacción fue de 20 µl y contenían 1X SYBR Green Power PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA.), 0,3 µM de cada primer y 1 µl de una dilución 1/10 de cada muestra de ADN. Las condiciones de qPCR fueron: 95 °C durante 10 min, 35 ciclos de amplificación y análisis de curva de *melting* desde 60 °C a 95 °C. Los ciclos de amplificación fueron los mismos en todas las reacciones, pero con diferentes temperaturas de *annealing* para los distintos pares de *primers*. Los ciclos consistieron en un primer paso de desnaturalización durante 20 s a 95 °C, *annealing* durante 30 s (temperaturas en la **TABLA 2.1**) y extensión a 60 °C durante 30 s. Para el análisis cuantitativo, el *Ct* de cada muestra se comparó con el *Ct* de curvas estándar construidas con diluciones de ADN genómico de las cepas. Teniendo en cuenta el tamaño de los genomas

de estas especies, se calculó el número de copias de cromosomas bacterianos en las curvas estándar. Los tamaños de los genomas utilizados para los cálculos fueron de 2,0 Mb para *L. reuteri* (Dommels *et al.*, 2009), 2,07 Mb para *L. amylovorus* (Kant *et al.*, 2011) y 1,99 Mb para *L. johnsonii* (Pridmore *et al.*, 2004). Para la determinación de copias totales del gen 16S, la curva estándar se construyó con diluciones seriadas de ADN genómico de *E. coli* XLBlue. Los *primers* diseñados en este trabajo no mostraron reactividad cruzada cuando se analizaron con otras especies filogenéticamente similares. Los coeficientes de eficiencia de las reacciones variaron entre el 90,1 y el 99,5%. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% y se secuenciaron para confirmar la especificidad de la amplificación.

**TABLA 2.1.** *Primers* utilizados para qPCR

<i>Primer</i>	Secuencia	Especie <i>target</i>	Temp. de <i>annealing</i>	Tam. del amplicón	Referencia
Lj1 La2	CACTAGACGCATGTCTAGAG AGTCTCTCAACTCGGCTATG	<i>L. johnsonii</i>	60 °C	127 pb	Furet <i>et al.</i> 2004
protH-F protH-R	TCAAGCGGGTGATTTAACTAAGT CCTTCAGGTATAGCATTTCAC	<i>L. amylovorus</i>	51 °C	180 pb	Este trabajo
subt2-F subt2-R	CCTTTCTTTCAGATCCACAGG TGGTTGTAGAGAAGGGGACG	<i>L. reuteri</i>	58 °C	245 pb	Este trabajo
1114-F 1275-R	CGGCAACGAGCGCAACCC CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC	Dominio Bacterias	60 °C	130 pb	Denman <i>et al.</i> 2006

### 2.5.12 Procesamiento de datos y análisis estadístico

Para el análisis de la cuantificación de los lactobacilos por qPCR, los datos fueron relativizados y normalizados. Los valores absolutos de la cuantificación de las especies de lactobacilos fueron relativizados con los valores de la cuantificación de 16S total y su vez estos valores fueron normalizados con el día 0. O sea, para cada animal se calculó la abundancia relativa de la especie

de *Lactobacillus* correspondiente a la cepa administrada, se normalizó con los resultados del día 0 (previo a la administración) y se transformó a  $\log_{10}$  (**ECUACIÓN 1**). Por ejemplo, un valor de 0 significó que no hubo cambios en la abundancia relativa de la especie administrada en un animal y en un determinado día, comparado con el día 0 del mismo animal. De esta forma, la variabilidad causada por la manipulación, el procesamiento de las muestras y la variación individual se redujo. La prueba *t* de Student se aplicó para establecer diferencias significativas entre el grupo control y tratamientos.

**ECUACIÓN 1:**

$$Fold\_change = \log_{10} \frac{\text{Especie de Lactobacillus (Día X)}}{16S\ total\ (Día\ X)} \bigg/ \frac{\text{Especie de Lactobacillus (Día 0)}}{16S\ total\ (Día\ 0)}$$

## 2.6 RESULTADOS

---

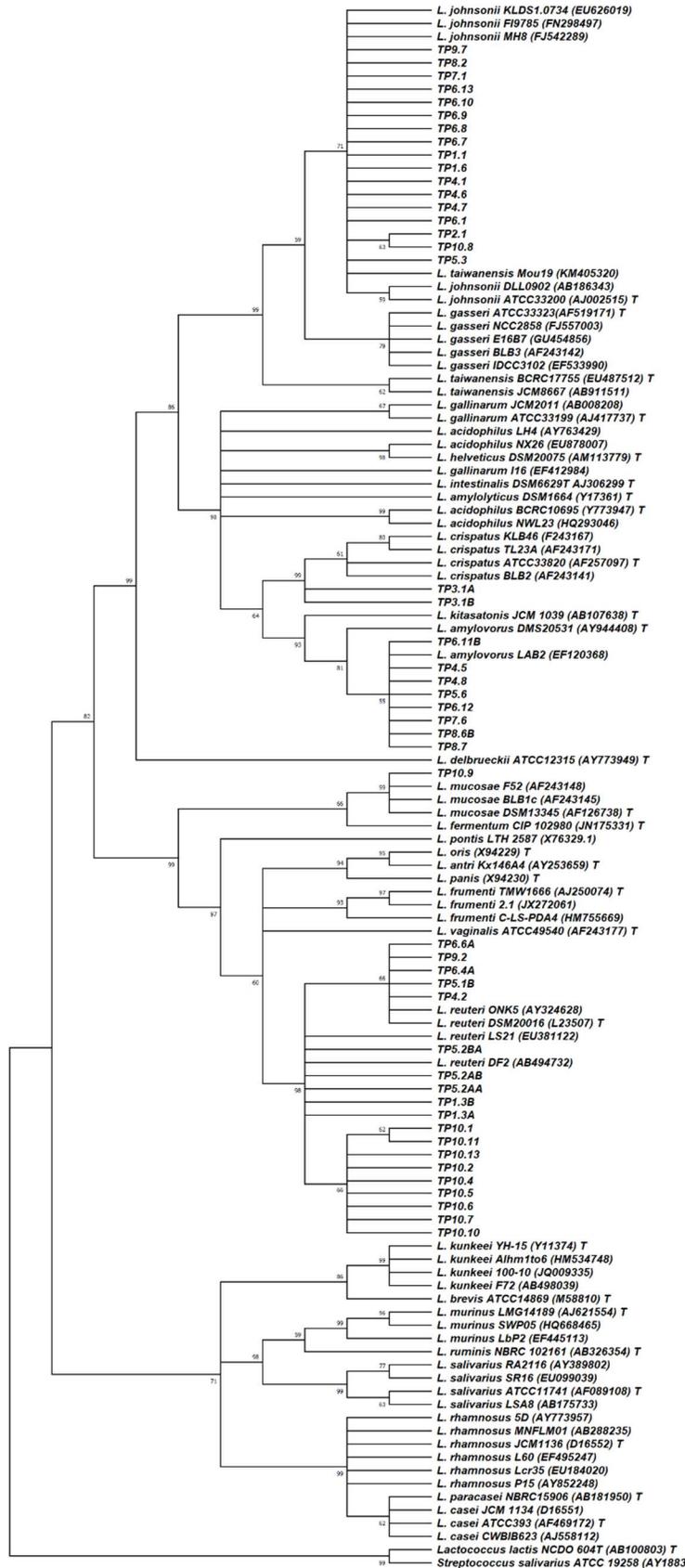
### *2.6.1 Aislamiento e identificación molecular*

Sesenta y seis aislamientos (66) fueron seleccionados en base a su crecimiento en medio MRS y reacción de catalasa y oxidasa. De estos, 47 se identificaron por medio de la secuenciación del gen ribosomal 16S como pertenecientes al género *Lactobacillus* spp. y 19 como *Streptococcus* spp. Sólo las cepas de *Lactobacillus* spp. fueron seleccionadas para seguir estudiando sus propiedades probióticas. La afiliación de especies se realizó con la herramienta bioinformática BLASTn (Altschul *et al.*, 1990) en la plataforma NCBI y alineamiento en la plataforma RDP (Wang *et al.*, 2007). Las especies identificadas fueron *Lactobacillus amylovorus* (8 cepas), *Lactobacillus crispatus* (2 cepas), *Lactobacillus johnsonii* (17 cepas), *Lactobacillus mucosae* (1 cepa) y *Lactobacillus reuteri* (19 cepas). Información de las cepas y su número de acceso en la base de datos del NCBI se presentan en la **TABLA 2.2**. A su vez se construyó un árbol de relaciones filogenéticas con las secuencias de

las cepas y secuencias obtenidas de la base de datos pública RDP (**FIGURA 2.3**).

### *2.6.2 Resistencia a pH bajo y presencia de sales biliares.*

Para poder colonizar el TGI, las cepas deben ser capaces de llegar viables al sitio de acción y resistir el proceso de digestión. Para evaluar la capacidad de las cepas de resistir estas condiciones, se evaluó el efecto del pH bajo y la presencia de sales biliares en la viabilidad bacteriana. El recuento de UFC antes y después del tratamiento fue convertido a unidades  $\log_{10}$  y se calculó la diferencia entre ambos resultados. La mayor parte de las cepas fueron capaces de resistir ambas condiciones y las únicas cepas que no lograron resistir ninguna de las dos condiciones fueron *L. crispatus* 3.1A y 3.1B (**TABLA 2.2**).



**FIGURA 2.3.** Árbol filogenético construido con las secuencias del gen ribosomal 16S y realizado con el método de máxima verosimilitud basado en el modelo Kimura de 2 parámetros. Se muestra el árbol consenso de un *bootstrap* de 500 repeticiones. Las ramas cuyos valores de *bootstrap* fueron menores al 55% se colapsaron.

**TABLA 2.2.** Resultados de Resistencia a pH bajo, presencia de sales biliares, efecto antimicrobiano y formación de biofilm.

Identidad	Cepa	Resistencia a pH=2 por 2 h <sup>(1)</sup>	Resistencia a 0,3% sales biliares por 4 h <sup>(1)</sup>	<i>E. coli</i> 52.3 <sup>(2)</sup>	<i>E. coli</i> 61.1 <sup>(2)</sup>	<i>S. Typhimurium</i> <sup>(2)</sup>	Formación de biofilm <sup>(3)</sup>	Número de acceso <sup>(4)</sup>
<i>L. amylovorus</i>	TP4.5	2,5 ± 0,2	N	1,2 ± 0,2	1,5 ± 0,4	2,5 ± 0,4	(++)	MF193429
	TP4.8	2,3 ± 0,1	N	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,2	2,4 ± 0,3	(++)	MF193430
	TP5.6	1,8 ± 0,2	N	1,1 ± 0,1	1,8 ± 0,2	1,1 ± 0,1	(++)	MF193431
	TP6.11B	0,5 ± 0,2	2,4 ± 0,2	1,6 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,8 ± 0,2	(++)	MF193432
	TP6.12	0,53 ± 0,04	0,8 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	2,5 ± 0,6	(+++)	MF193433
	TP7.6	0,63 ± 0,06	0,5 ± 0,2	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,2	2,1 ± 0,2	(-)	MF193434
	TP8.6B	1,23 ± 0,09	1,5 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,1	(+)	MF193435
	TP8.7	0,75 ± 0,09	0,5 ± 0,2	1,7 ± 0,1	1,4 ± 0,1	2,4 ± 0,6	(++)	MF193436
<i>L. crispatus</i>	TP3.1A	N	N	1,6 ± 0,1	1,8 ± 0,2	2,4 ± 0,5	(+)	MF193437
	TP3.1B	N	N	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,6	2,2 ± 0,3	(-)	MF193438
<i>L. johnsonii</i>	TP1.1	0,5 ± 0,1	2,4 ± 0,1	1,7 ± 0,2	1,7 ± 0,1	2,7 ± 0,4	(+++)	MF193439
	TP1.6	0,4 ± 0,2	2,0 ± 0,2	1,5 ± 0,1	1,2 ± 0,3	2,1 ± 0,4	(+++)	MF193440
	TP2.1	1,47 ± 0,05	0,5 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,9 ± 0,1	2,6 ± 0,3	(+++)	MF193441
	TP4.1	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1	(++)	MF193442
	TP4.6	2,89 ± 0,08	1,36 ± 0,07	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	(+++)	MF193443
	TP4.7	0,19 ± 0,04	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1	(++)	MF193444
	TP5.3	0,31 ± 0,09	0,8 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,1	(++)	MF193445
	TP6.1	2,6 ± 0,2	1,11 ± 0,05	1,5 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,1 ± 0,1	(+)	MF193446
	TP6.7	1,5 ± 0,2	0,78 ± 0,09	1,5 ± 0,2	0,7 ± 0,1	1,1 ± 0,1	(+)	MF193447
	TP6.8	0,6 ± 0,2	0,12 ± 0,08	0,9 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,1	(++)	MF193448
	TP6.9	1,6 ± 0,2	0,6 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,6 ± 0,1	(-)	MF193449
	TP6.10	1,6 ± 0,2	0,40 ± 0,07	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,2	1,1 ± 0,2	(+++)	MF193450
	TP6.13	0,08 ± 0,06	1,04 ± 0,05	1,1 ± 0,1	1,5 ± 0,1	2,1 ± 0,1	(+++)	MF193451
	TP7.1	1,01 ± 0,08	0,5 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1,5 ± 0,1	2,0 ± 0,2	(+++)	MF193452
	TP8.2	0,11 ± 0,05	0,5 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,7 ± 0,1	(++)	MF193453
	TP9.7	0,58 ± 0,09	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,3	1,3 ± 0,2	1,5 ± 0,1	(++)	MF193454
TP10.8	0,88 ± 0,06	0,6 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,2	(-)	MF193455	
<i>L. mucosae</i>	TP10.9	0,56 ± 0,01	2,7 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,5 ± 0,1	(-)	MF193456
<i>L. reuteri</i>	TP1.3A	1,46 ± 0,06	1,50 ± 0,06	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,3	1,8 ± 0,1	(++)	MF193457
	TP1.3B	2,68 ± 0,03	1,90 ± 0,06	2,3 ± 0,2	3,0 ± 0,1	1,6 ± 0,3	(++)	MF193458
	TP4.2	0,87 ± 0,01	1,96 ± 0,05	2,5 ± 0,1	1,9 ± 0,1	2,5 ± 0,4	(-)	MF193459
	TP5.1B	1,33 ± 0,05	0,49 ± 0,07	2,8 ± 0,1	1,7 ± 0,2	2,2 ± 0,7	(-)	MF193460
	TP5.2AA	0,77 ± 0,04	0,37 ± 0,08	2,1 ± 0,1	1,7 ± 0,3	1,8 ± 0,2	(-)	MF193461

TP5.2AB	1,36 ± 0,06	0,5 ± 0,1	1,9 ± 0,2	1,4 ± 0,1	2,8 ± 0,5	(-)	MF193462
TP5.2BA	1,90 ± 0,01	1,43 ± 0,08	1,2 ± 0,2	1,7 ± 0,1	1,6 ± 0,1	(-)	MF193463
TP6.4A	0,72 ± 0,02	0,18 ± 0,09	2,3 ± 0,1	2,2 ± 0,2	2,3 ± 0,2	(-)	MF193464
TP6.6A	0,72 ± 0,02	0,52 ± 0,08	1,6 ± 0,5	1,5 ± 0,5	2,3 ± 0,4	(-)	MF193465
TP9.2	0,49 ± 0,04	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,1	(+++)	MF193466
TP10.1	0,36 ± 0,06	1,37 ± 0,09	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,6 ± 0,3	(++)	MF193467
TP10.2	0,74 ± 0,05	0,97 ± 0,07	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,8 ± 0,1	(+)	MF193468
TP10.4	0,82 ± 0,05	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,4 ± 0,2	(-)	MF193469
TP10.5	0,7 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,1	2,9 ± 0,2	(-)	MF193470
TP10.6	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,2 ± 0,1	2,0 ± 0,1	(-)	MF193471
TP10.7	0,9 ± 0,2	0,93 ± 0,06	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,6 ± 0,2	(-)	MF193472
TP10.10	0,8 ± 0,1	1,17 ± 0,04	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1	2,6 ± 0,3	(-)	MF193473
TP10.11	0,66 ± 0,07	1,48 ± 0,06	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,4	(+)	MF193474
TP10.13	1,0 ± 0,1	0,75 ± 0,04	1,0 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,5 ± 0,1	(+)	MF193475

Los resultados se presentan como media ± SD.

<sup>(1)</sup> Resultados de resistencia son presentados como  $[\log_{10}$  inicial UFC –  $\log_{10}$  final UFC]; N: no se detectaron UFC.

<sup>(2)</sup> Diámetro de inhibición en cm.

<sup>(3)</sup> Clasificación de formación de biofilm: no formadora (-), formación baja (+), formación media (++) y formación alta (+++).

<sup>(4)</sup> Número de acceso de la secuencia del gen ribosomal 16S ingresada en la base de datos de NCBI.

### 2.6.3 Efecto antimicrobiano

Todas las cepas de *Lactobacillus* spp. evaluadas inhibieron el crecimiento de los tres patógenos. Las cepas mostraron patrones variados de inhibición, pero en general el patógeno más inhibido fue *S. Typhimurium* (en promedio 1,8 ± 0,6 cm). Las cepas de *E. coli* mostraron valores similares de inhibición y un promedio similar (1,5 ± 0,4 cm para 52.3 y 1,4 ± 0,4 cm para 61.1) (TABLA 2.2).

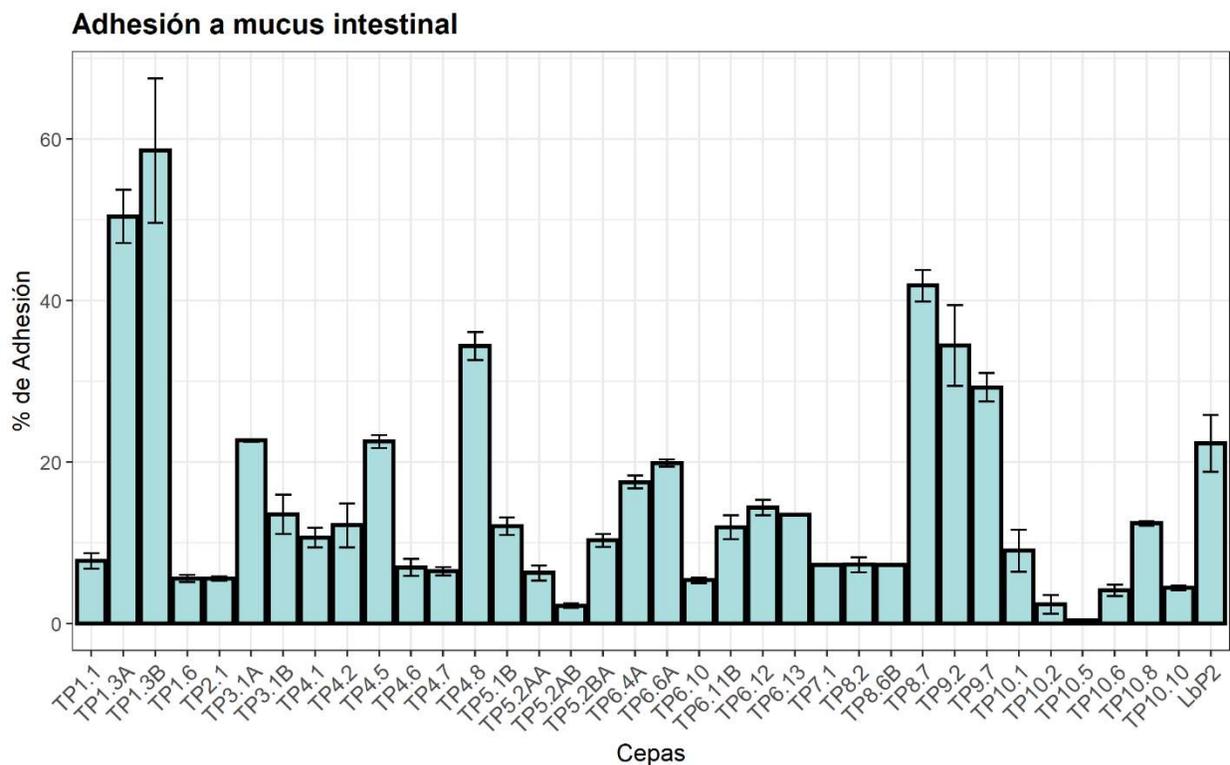
### 2.6.4 Formación de biofilm

La mayor parte de las cepas no lograron formar biofilm en medio MRS (datos no presentados), por lo cual se empleó el medio mTSB descrito en la sección

Materiales y Métodos de este capítulo. En este medio se observó que el 64% de las cepas formaron biofilm, de las cuales el 15%, 30% y el 19% formaron biofilm de forma baja, moderada y alta, respectivamente (TABLA 2.2).

### 2.6.5 Adhesión bacteriana a mucus intestinal.

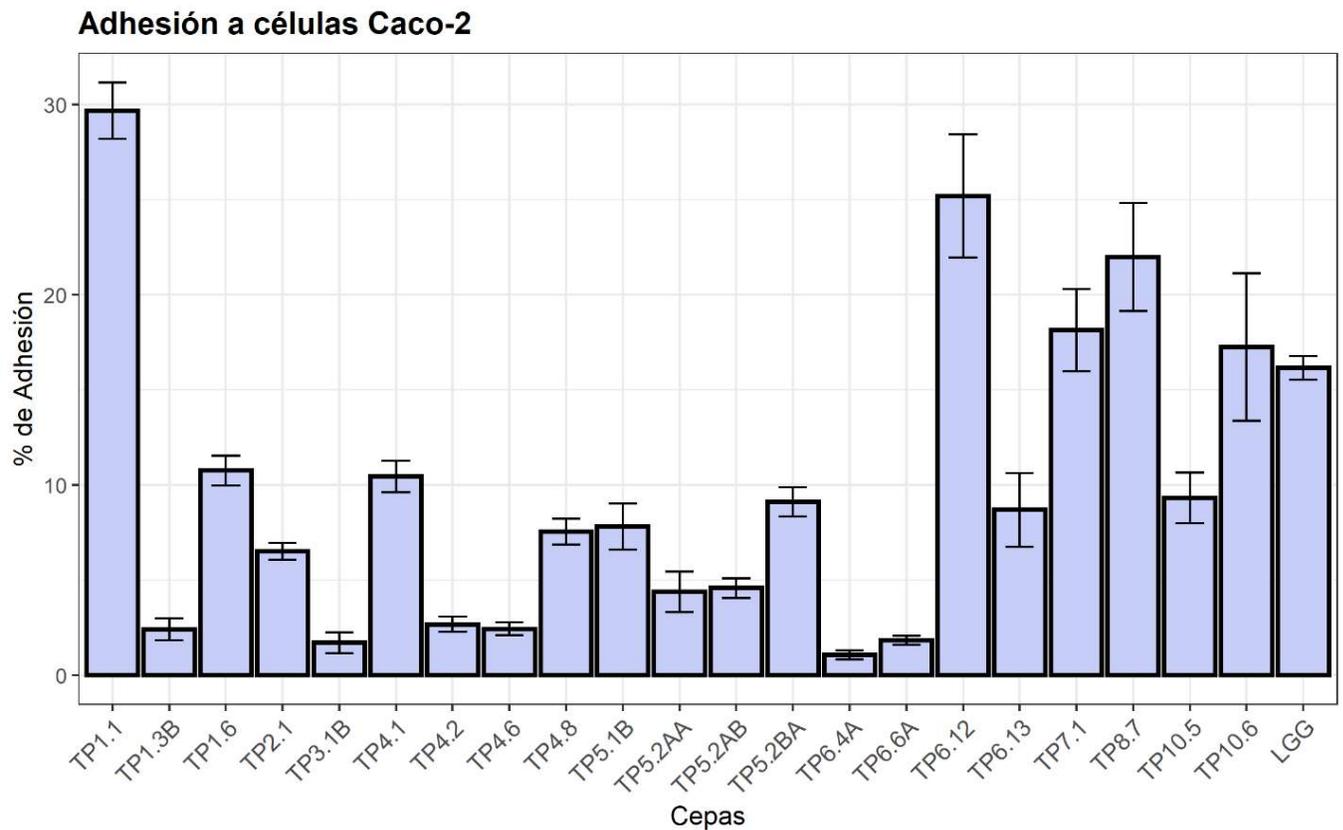
Las 35 cepas más prometedoras, de acuerdo con los resultados anteriores, fueron seleccionadas para evaluar la adhesión a mucus intestinal de terneros. Las cepas presentaron capacidad de adhesión muy variable entre sí, desde un 1.2% a 58.6%. Las cepas que mostraron mejor capacidad de adhesión fueron TP1.3A, TP1.3B, TP3.1A, TP4.5, TP6.6A, TP8.7, TP9.2, TP9.7 y TP10.8 (FIGURA 2.4).



**FIGURA 2.4.** Capacidad de adhesión de cepas de *Lactobacillus* spp. a mucus intestinal inmovilizado. El porcentaje de adhesión se calculó en relación con inóculo inicial. Cada barra con sus errores representa la media  $\pm$  desvío estándar. La cepa *L. murinus* LbP2 fue utilizada como control positivo de adhesión.

### 2.6.6 Adhesión a células Caco-2.

Tomando en cuenta los resultados de la caracterización *in vitro* previa se seleccionaron 21 cepas para analizar su capacidad de adhesión a la línea celular epitelial intestinal Caco-2. Al igual que se observó en la adhesión a mucus, la adhesión a Caco-2 fue muy variable. La cepa que presentó la menor capacidad de adhesión fue TP4.6 con un valor de 2,4% y la cepa más adherente fue TP1.1 con un valor de 29,7% (FIGURA 2.5).



**FIGURA 2.5.** Capacidad de adhesión de cepas de *Lactobacillus* spp. a células Caco-2. El porcentaje de adhesión se calculó en relación con inóculo inicial. Cada barra con sus errores representa la media  $\pm$  desvío estándar. La cepa *L. rhamnosus* GG fue utilizada como control positivo de adhesión.

### *2.6.7 Criterio de selección de cepas probióticas para el ensayo de colonización in vivo*

Los resultados del proceso de caracterización *in vitro* llevaron a la selección de 4 cepas candidatas para evaluar su capacidad de colonización en el TGI de terneros Holando. No hubo una sola cepa que presentara todas las características deseadas. No se tomó un solo criterio para la selección, pero se ponderó la adhesión a mucus y células Caco-2, por lo tanto, se seleccionaron las dos cepas que presentaron mayor valor de adhesión a estas matrices. Estas fueron las cepas *L. johnsonii* TP1.1 y *L. reuteri* TP1.3B que presentaron los valores más altos de adhesión a células Caco-2 y mucus, respectivamente. Por otro lado, se seleccionó *L. johnsonii* TP1.6 ya que presentó una alta formación de biofilm, alta resistencia a pH bajo y adhesión media a células Caco-2. *L. amylovorus* TP8.7 fue seleccionada porque no solo presentó alta resistencia a pH bajo y presencia de sales biliares, sino que también presentó altos valores de adhesión a mucus y células Caco-2.

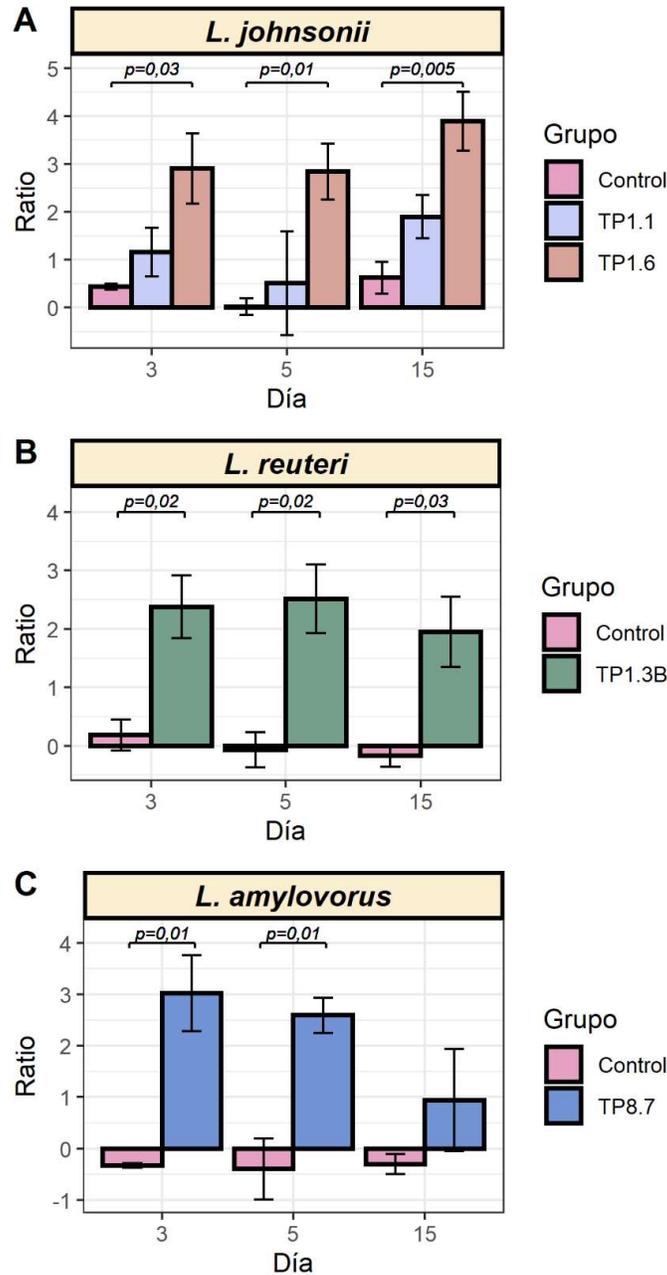
### *2.6.8 Liofilización y medio de cultivo*

Se desarrolló un medio de cultivo sin componentes de origen animal adecuado para el crecimiento de las cepas seleccionadas. El medio desarrollado contenía la concentración de sales especificadas en el medio MRS:  $K_2HPO_4$  (2 g/l),  $C_6H_{11}NO_7$  (2 g/l),  $C_2H_3NaO_2$  (5 g/l),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,2 g/l),  $MnSO_4 \cdot H_2O$  (0,04 g/l), Tween 80 (1 g/l). En este nuevo medio se mantuvo la concentración de glucosa en 20 g/l, se sustituyó la peptona animal por peptona vegetal (25 g/l) y se aumentó la concentración del extracto de levadura a 25 g/l. El pH se ajustó en 5,7. Los recuentos realizados en placa a diferentes tiempos demostraron que este medio permitía el crecimiento adecuado de las cepas y era igual que el medio MRS. También se probaron los medios Tomato Juice y MRS Vegitone pero las cepas crecían muy lentamente en estos medios y por lo

tanto se descartó su uso. A su vez las cepas lograron sobrevivir las condiciones descritas de liofilización. Se determinó que 24 h de congelamiento a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  previo a la liofilización fue demasiado nocivo para la supervivencia de las cepas y que 2 h de congelamiento maximizaban la viabilidad.

### *2.6.9 Colonización del tracto gastrointestinal de terneros*

Se cuantificaron las especies *L. amylovorus*, *L. johnsonii* y *L. reuteri* en heces de terneros utilizando qPCR con *primers* específicos para cada especie en los días 0, 3, 5 y 15 (**FIGURA 2.6**). Se cuantificó *L. johnsonii* en terneros tratados con las cepas TP1.1 y TP1.6, *L. reuteri* se cuantificó en terneros tratados con la cepa TP1.3B, y *L. amylovorus* se cuantificó en terneros tratados con la cepa TP8.7. En el grupo control, las tres especies fueron cuantificadas. A su vez, en todos los grupos se cuantificaron las copias totales del gen ribosomal 16S y este valor se utilizó para determinar la abundancia relativa de la especies mencionadas. El número de copias totales de ADNr 16S fue en promedio  $3,2 \times 10^{10}$  copias/mg de heces. Los valores de *L. amylovorus*, *L. johnsonii* y *L. reuteri* fueron en promedio  $2,6 \times 10^6$  copias/mg,  $2,0 \times 10^7$  copias/mg y  $1,2 \times 10^8$  bacterias/mg, respectivamente. La administración de la cepa *L. reuteri* TP1.3B provocó un aumento en la abundancia relativa de *L. reuteri* en comparación con el grupo control en todos los días estudiados. A su vez, los terneros tratados con la cepa *L. johnsonii* TP1.6 mostraron un aumento significativo en la abundancia relativa de *L. johnsonii* en todos los tiempos estudiados en comparación con el control. Por otro lado, los terneros tratados con *L. amylovorus* TP8.7 mostraron un aumento significativo en la abundancia relativa de *L. amylovorus* solo los días 3 y 5 (período de administración oral). No se observaron cambios significativos en la abundancia relativa de *L. johnsonii* en los animales tratados con *L. johnsonii* TP1.1.



**FIGURA 2.6** Cuantificación de especies probióticas por qPCR. El *fold-change* de las abundancias relativas de cada especie fue normalizando con el día 0. Se cuantificó *L. johnsonii* en terneros tratados con las cepas TP1.1 y TP1.6 (A), *L. reuteri* se cuantificó en terneros tratados con la cepa TP1.3B (B), y *L. amylovorus* se cuantificó en terneros tratados con la cepa TP8.7 (C). Las 3 especies fueron cuantificadas en el grupo control. Los datos se presentan como la media de los tres animales de cada grupo con su correspondiente desvío estándar. Se muestran las diferencias estadísticamente significativas entre grupos tratados vs. control (prueba *t* de Student).

## 2.7 DISCUSIÓN

---

La caracterización *in vitro* ha sido ampliamente utilizada para evaluar el potencial probiótico de cepas bacterianas candidatas. Se asume que es importante refinar esta etapa de selección de las cepas con el fin de seleccionar aquellas que eventualmente puedan ser evaluadas en modelos *in vivo*, por lo general muy complejos, costosos y altamente demandantes de recursos humanos (Papadimitriou *et al.*, 2015). Tradicionalmente, los enfoques utilizados en estos estudios incluyen la tolerancia al pH ácido y sales biliares, efecto antimicrobiano, formación de *biofilm* y la adhesión al mucus intestinal y a enterocitos (Morelli, 2000).

El primer paso del presente estudio consistió en la generación de una colección de cepas de *Lactobacillus* spp. aisladas de heces de terneros lactantes sanos, ya que varios estudios apuntan al uso de bacterias nativas como probióticos para garantizar la seguridad y una buena capacidad de colonización (Morelli, 2000). La mayoría de las cepas aisladas se identificaron como *L. reuteri*, *L. johnsonii* y *L. amylovorus*, especies que se han aislado de terneros y lechones en trabajos anteriores y han mostrado propiedades probióticas (Lähteinen *et al.*, 2010; Maldonado *et al.*, 2012; Sandes *et al.*, 2017).

Una característica importante de las bacterias probióticas es su capacidad para resistir las condiciones ácidas del estómago y la presencia de sales biliares en el intestino delgado (Morelli, 2007). En este estudio se observó que el grado de tolerancia fue muy variable y dependiente de cada cepa pero no de la especie, como ya se ha determinado en estudios previos (Vinderola & Reinheimer, 2003; Ripamonti *et al.*, 2011; Maldonado *et al.*, 2012). Varios estudios previos muestran que la mayoría de las cepas de *Lactobacillus* spp. sobreviven a pH=3 y la viabilidad comienza a disminuir a valores de pH más bajos (De Angelis *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010; Monteagudo-Mera *et al.*, 2012; Bujnakova *et al.*, 2014). Por lo tanto, se estableció para este estudio un valor de pH=2 para

evaluar la resistencia a estas condiciones. Nuestros resultados mostraron que casi todas las cepas resistieron esta condición. Por otro lado, la viabilidad bacteriana en medios que contienen sales biliares es indicativa de la capacidad de la cepa para resistir su efecto antimicrobiano durante el paso a través del intestino delgado. La concentración crítica para las cepas tolerantes es 0,3% (Erkkilä & Petäjä, 2000) y se ha observado que a concentraciones más bajas las bacterias no son lisadas (Fernández *et al.*, 2003). En nuestro trabajo todas las cepas pertenecientes a las especies *L. johnsonii* y *L. reuteri* lograron sobrevivir la acción de sales biliares, lo que se podría asociar con estudios previos en los cuales se encontraron bombas de eflujo e hidrolasas asociadas a la resistencia a las sales biliares en cepas pertenecientes a estas especies (Elkins *et al.*, 2001; Whitehead *et al.*, 2008; Bustos *et al.*, 2011, 2015; Allain *et al.*, 2018). A su vez, se ha visto que en varias cepas de lactobacilos las vías que se activan en presencia de sales biliares, se asocian con la respuesta a estrés ácido y oxidativo, lo cual relaciona los desafíos con que los microorganismos se enfrentan al comenzar su pasaje por el tracto gastrointestinal (Bron *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2008; Whitehead *et al.*, 2008).

La capacidad de producir diferentes compuestos con efecto antimicrobiano es importante para la exclusión competitiva efectiva de patógenos en el intestino (Dunne *et al.*, 2001). La naturaleza de las sustancias inhibitorias puede variar, desde ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Vandenbergh, 1993; Rodriguez-Palacios *et al.*, 2009). Todas las cepas inhibieron el crecimiento de todos los patógenos probados, siendo *S. Typhimurium* el patógeno más susceptible a los efectos de las cepas de lactobacilos evaluadas. El método utilizado en este trabajo no tuvo como objetivo identificar la naturaleza de la sustancia inhibidora, pero sería interesante probar la existencia de bacteriocinas, dado su potencial para modular la microbiota e inhibir patógenos en el intestino (Diez-Gonzalez, 2007).

La interacción de lactobacilos con el epitelio intestinal muestra características similares a las encontradas en los *biofilms*, ya que también se unen a una superficie y se incluyen en una matriz de su propia producción (Walter, 2008). La formación de estas estructuras multicelulares es importante en la asociación bacterias-mucosa intestinal y contribuye con la colonización bacteriana (Kolter & Greenberg, 2006; Lebeer *et al.*, 2011). Vélez *et al.* (2010) reportaron una proteína en *L. rhamnosus* GG que regulaba la formación de *biofilm* y la adhesión al mucus intestinal, lo que demostró que ambos procesos podrían estar relacionados. La capacidad de adherirse a superficies abióticas no se prueba rutinariamente en cepas probióticas, pero algunos autores han agregado este ensayo para la caracterización *in vitro* y han detectado una correlación positiva entre la adherencia a superficies bióticas y la formación de *biofilm* en superficies abióticas (Martín *et al.*, 2008; Pompilio *et al.*, 2008, 2010). Además, estructuras similares a los *biofilms* en el epitelio podrían estar relacionadas con la protección frente a la adhesión de patógenos (Kleessen & Blaut, 2005). Este estudio determinó que el 64% de las cepas pudieron formar *biofilm*, lo que se consideró muy prometedor para la selección de cepas candidatas.

Las 35 cepas más prometedoras se seleccionaron para evaluar la adherencia al mucus intestinal y luego se seleccionaron 21 cepas para evaluar la adhesión a células Caco-2. La capacidad de adherirse a las células epiteliales y/o mucus intestinal se considera una característica favorable en los potenciales probióticos, ya que puede promover un mayor tiempo de persistencia, exclusión de patógenos e interacción con el sistema inmune del hospedero (Marco *et al.*, 2006; Lebeer *et al.*, 2008; Collado *et al.*, 2009). La capa de mucus que cubre el epitelio entérico es el primer blanco relevante para la adhesión y colonización que enfrentan los microorganismos ingeridos (Juge, 2012). Se han identificado proteínas de superficie que se unen a la mucosa intestinal, aunque los mecanismos de adhesión no se han dilucidado completamente (Vélez *et al.*,

2007; Sánchez *et al.*, 2008). La adhesión bacteriana se estudia comúnmente *in vitro* con líneas celulares, mucus o moléculas de matriz extracelular inmovilizadas (Jensen *et al.*, 2012). En este estudio las cepas mostraron gran variabilidad en la capacidad de adhesión y a su vez las características de adhesión fueron cepa-dependiente, como se ha establecido en otros estudios (Kirjavainen *et al.*, 1998; Ouwehand *et al.*, 1999; MacKenzie *et al.*, 2010). Los ensayos de adhesión a células intestinales se presentan como un buen modelo para estudiar la capacidad de los probióticos para adherirse a la superficie intestinal. En este trabajo se evaluó la capacidad de las cepas para adherirse a las células intestinales Caco-2 y las mismas exhibieron porcentajes de adhesión altamente variables. Algunos autores han establecido que las cepas de *L. reuteri* exhiben una buena adhesión a las células, pero en este trabajo no se observó ese patrón (Wang *et al.*, 2010; Jensen *et al.*, 2012). La falta de estandarización de los protocolos experimentales impide una comparación entre diferentes estudios (Papadimitriou *et al.*, 2015; Vinderola *et al.*, 2017). Por ejemplo, algunos autores han presentado un valor de adhesión para *L. rhamnosus* GG de 2,5% (Jensen *et al.*, 2012) y otros de 35% (Argyri *et al.*, 2013).

La resistencia a la liofilización se considera una importante característica biotecnológica, ya que podría permitir la producción a gran escala con fines comerciales (Vinderola *et al.*, 2017). Se considera que las BAL son microorganismos fastidiosos para su crecimiento y son típicamente cultivadas en medios complejos como el MRS (De Man *et al.*, 1960), que contienen varios ingredientes de origen animal como extracto de carne y digeridos pancreático de cerdo, que son la fuente de nitrógeno principal. De acuerdo con reglamentaciones internacionales, está prohibida la utilización de proteínas de origen animal para la alimentación de animales de producción y todos los ingredientes utilizados para su preparación deben estar debidamente

identificados (Regulación 767/2009 de la Unión Europea). Esto se debe al riesgo que representan las enfermedades priónicas en los sistemas de producción animal. Si bien no está estipulado en la legislación ni en la bibliografía el tipo de cuidados para el cultivo de probióticos para animales, consideramos relevante que las cepas a ser administradas a terneros en los ensayos realizados fueran cultivadas en medios sin componentes de origen animal. Se han descrito en la bibliografía medios en los cuales se sustituyen las fuentes de proteína animal por fuentes vegetales como digerido de soja (Heenan *et al.*, 2002; Pathak & Martirosyan, 2012; Atilola *et al.*, 2015). La descripción y elección de un medio de cultivo no sólo depende de su composición, sino también de las cepas que se quieren cultivar, por lo tanto se requiere de una puesta a punto (Heenan *et al.*, 2002). En este trabajo la sustitución de los componentes de origen animal fue exitosa y a su vez las cepas seleccionadas soportaron el proceso de liofilización, manteniendo recuentos de viabilidad similares luego de la suspensión y cultivo de las bacterias liofilizadas.

Los resultados del ensayo *in vivo* de persistencia indicaron que la administración oral de las cepas TP1.3B y TP1.6 indujo un aumento en la abundancia relativa de *L. reuteri* y *L. johnsonii*, respectivamente, en las heces de los animales. Esto podría atribuirse a la capacidad de colonización de ambas cepas potencialmente probióticas. Además, este cambio se mantuvo hasta al menos 10 días después de la última administración, lo que demostraría la capacidad de persistir en el TGI. La administración de la cepa TP8.7 causó un aumento en la abundancia relativa de *L. amylovorus* pero este cambio no se mantuvo luego de finalizado el período de administración. En cuanto a los animales tratados con la cepa TP1.1, los cambios en la abundancia de *L. johnsonii* en heces no fueron estadísticamente significativos. Estos resultados muestran que el proceso de selección *in vitro* fue un buen indicador de la capacidad potencial para colonizar el TGI. Diferentes cepas pertenecientes a

las especies *L. reuteri*, *L. johnsonii* y *L. amylovorus* han demostrado una buena capacidad de colonización en humanos y cerdos (De Angelis *et al.*, 2007; Denou *et al.*, 2008; Konstantinov *et al.*, 2008), pero hasta el momento no se han realizado estudios en terneros. Tradicionalmente, se ha evaluado la persistencia utilizando variantes resistentes a antibióticos, por ejemplo seleccionando mutaciones espontáneas en las cepas de interés (Ehrmann *et al.*, 2002; Frizzo *et al.*, 2010b; Perelmuter *et al.*, 2011; Bunešová *et al.*, 2012; Soto *et al.*, 2014). Pero dadas las preocupaciones de seguridad del uso de cepas resistentes en ensayos *in vivo* a campo, en este estudio se evitó el uso de cepas resistentes a antimicrobianos. En cambio, se usaron métodos moleculares para evaluar habilidad colonizadora de las cepas de lactobacilos, que se basó en la observación de la dinámica temporal de las especies administradas. En el trabajo de Zhang *et al.* (2016) también se utilizó la cuantificación de la especie para inferir sobre la persistencia de la cepas pero se utilizó un modelo animal distinto al hospedero blanco y las especies no se encontraban presentes en días previos a la administración. Si bien reconocemos las limitaciones en la interpretación de los resultados al cuantificar las especies y no las cepas, entendemos que como aproximación esta metodología resultó útil para los objetivos de este capítulo. La normalización con el día 0 pretendió tener en cuenta que esas especies forman parte de la microbiota normal de los animales y estaban presentes antes de la administración de los probióticos.

Hasta este punto del trabajo se evaluó el potencial probiótico de las cepas a partir de la caracterización *in vitro* y un paso de *screening* que consistió en la evaluación de la persistencia *in situ* de cepas seleccionadas. Este paso reveló que, aunque las 4 cepas seleccionadas por la caracterización *in vitro* presentaron características promisorias, sólo dos (TP1.3B y TP1.6) lograron persistir. Por lo tanto, estas dos cepas fueron seleccionadas para el siguiente

paso en la evaluación de probióticos, que consistió en la evaluación del efecto de su administración en la diarrea neonatal de terneros.

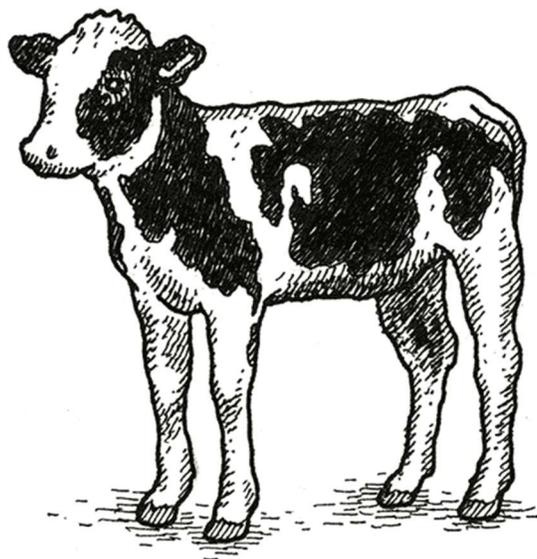
## 2.8 CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio mostraron que el *screening in vitro* es una herramienta útil para determinar la actividad potencialmente probiótica de la una colección de cepas. De todos modos, es importante realizar estudios de colonización y persistencia para determinar si las cepas podrían llegar a tener un impacto en el ambiente gastrointestinal. Dos cepas promisorias mostraron capacidad de generar cambios estables en el tiempo, asociados a una posible capacidad de colonización y persistencia. Las cepas TP1.3B y TP1.6 fueron seleccionadas para seguir el estudio en los siguientes capítulos y determinar su efecto en la salud de terneros neonatos.

---

# CAPÍTULO III

EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE  
CEPAS SELECCIONADAS EN LA  
DIARREA NEONATAL DE TERNEROS.



## 3.1 RESUMEN

---

La administración de probióticos se presenta como una herramienta alternativa para el tratamiento y la prevención de diversas patologías, específicamente en animales de producción. En este capítulo se analizó el efecto de la administración de cepas seleccionadas en la diarrea neonatal de terneros, *score* fecal e índice de consistencia fecal (ICF). También, con el objetivo de dilucidar posibles mecanismos de acción, se analizaron algunos parámetros del sistema inmune, incluyendo cuantificación de IgA en heces y plasma y la expresión de citoquinas pro y antiinflamatorias en sangre. Para ello se realizó un ensayo *in vivo* en dos instancias en las cuales en cada una se contó con 15 terneros divididos en 3 grupos. Dos grupos fueron tratados con las cepas *L. reuteri* TP1.3B y *L. johnsonii* TP1.6 por separado y el tercer grupo recibió el vehículo estéril (Control). El *score* fecal de los terneros tratados fue menor en ambos grupos tratados. El ICF fue menor para los dos tratamientos en la primera semana y en la segunda el grupo TP1.3B presentó valores significativamente menores que el control. En la primera semana la incidencia de diarreas también fue significativamente menor en ambos grupos tratados, mientras que en la segunda semana no hubo diferencias. En las semanas 3 y 4 ninguno de los grupos presentó diarreas. No hubo diferencias en la ganancia de peso, parámetros sanguíneos, cuantificación de IgA y expresión de citoquinas, por lo tanto, los parámetros inmunes estudiados no permitieron dilucidar mecanismos subyacentes de los probióticos asociados a la respuesta inmune. Igualmente, los resultados son alentadores y se debería seguir investigando su posible rol como probióticos comerciales.

## 3.2 INTRODUCCIÓN

---

Uno de los grandes desafíos que presenta la industria ganadera actualmente son las altas tasas de mortalidad de terneros lactantes que afectan a los rebaños

de reemplazo (USDA, 2010). Las infecciones entéricas componen una de las principales causas de muerte en los terneros neonatos (Uetake, 2013) y con el surgimiento de nuevas regulaciones que limitan el uso profiláctico de antimicrobianos (Smith, 2015), la necesidad de enfoques alternativos para minimizar la incidencia de diarrea es urgente (Malmuthuge & Guan, 2017). En este marco los probióticos se presentan como alternativa promisoria para la prevención y el tratamiento de la DNT.

Los estudios sobre la administración de probióticos han ido en aumento y general los resultados indican que podría existir un efecto beneficioso en el hospedero, tanto en humanos como otros animales (Musa *et al.*, 2009; Kneifel & Salminen, 2010). En terneros se han obtenido resultados prometedores con respecto a la disminución de la incidencia y severidad de la DNT (Signorini *et al.*, 2012). En un estudio se vio que la administración de cepas de *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp. a terneros recién nacidos durante la primera semana de vida incrementó el aumento de peso y el índice de conversión de alimento, y disminuyó las incidencias de diarrea. Estos efectos fueron más pronunciados en terneros lactantes con respecto a destetados (Abe *et al.*, 1995), sugiriendo que los probióticos podrían ser más efectivos cuando la microbiota intestinal se está estableciendo y menos cuando ya se ha estabilizado (Malmuthuge *et al.*, 2015b). En varios estudios se observó que la administración de probióticos tuvo un efecto positivo en la incidencia de la DNT y en el *score* fecal (Timmerman *et al.*, 2005; von Buenau *et al.*, 2005; Jatkauskas & Vrotniakienė, 2014; Zhang *et al.*, 2015), y también que podría tener un mejor efecto profiláctico sobre la DNT que la administración de antibióticos (Donovan *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2011). También se ha visto un efecto positivo en la incidencia de enfermedades infecciosas en general (Timmerman *et al.*, 2005) y mayor eficiencia en el aprovechamiento del

alimento y ganancia de peso diaria que el grupo control y el grupo tratado con antibióticos (Sarker *et al.*, 2010).

La modulación del sistema inmune del hospedero es uno de los mecanismos propuestos asociado al efecto beneficioso de los probióticos (Papadimitriou *et al.*, 2015). Se ha propuesto el término “inmunobióticos” para describir a aquellas bacterias que promueven la salud a través de la interacción con mecanismos inmunes de las mucosas (Clancy, 2003). La protección contra patógenos se ha asociado con la estimulación de la secreción de anticuerpos, así como con las respuestas inmune mediadas por células (Cross, 2002; Tsai *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2014; Wyszzyńska *et al.*, 2015). Se ha visto que muchas cepas con características probióticas tienen la habilidad de estimular una gran variedad de citoquinas a nivel local y sistémico, como IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ . Éstas se asocian con la maduración de células T y B, disparando las respuestas adaptativas y la memoria inmunológica (Van Overtvelt *et al.*, 2010; Wells, 2011; Esvaran & Conway, 2012; Su *et al.*, 2014). Esto se corresponde con la observación de que muchas cepas probióticas han demostrado tener un efecto tipo adyuvante (Van Overtvelt *et al.*, 2010; Wells, 2011; Tarahomjoo, 2012; Tsai *et al.*, 2012; Owen *et al.*, 2013). Son capaces de estimular receptores de la respuesta inmune innata como los receptores tipo Toll (TLR) y al ser fagocitadas por células dendríticas locales presentadoras de antígenos, se estimula la respuesta humoral en los tejidos linfoides asociados a las mucosas estimulando a su vez la producción de inmunoglobulinas de clase IgA (Villena *et al.*, 2011; Esvaran & Conway, 2012; Sandes *et al.*, 2017). Las IgA representan la primera línea de defensa inmune antígeno-específica en la luz intestinal (Macpherson *et al.*, 2012; Brandtzaeg, 2013). La mayoría de las poblaciones de IgA presentes en las secreciones intestinales están codificados en la línea germinal, son de baja afinidad y con reactividad cruzada contra antígenos microbianos redundantes. Sin embargo al ser desafiado, el sistema de células B

de la mucosa puede generar IgA específicos de alta afinidad (Berg & Savage, 1975). Las IgA permiten que los microorganismos beneficiosos prosperen dentro de la luz intestinal y a la vez que impiden su acceso al medio interno. Cuando los patógenos amenazan con romper la barrera epitelial, las IgA pueden cooperar con otros elementos del sistema inmune para eliminarlos. El sistema inmune de la mucosa intestinal enfrenta el desafío de eliminar potenciales patógenos al tiempo mantener una relación mutuamente beneficiosa con la microbiota comensal (Kaetzel, 2014).

### 3.3 OBJETIVO

---

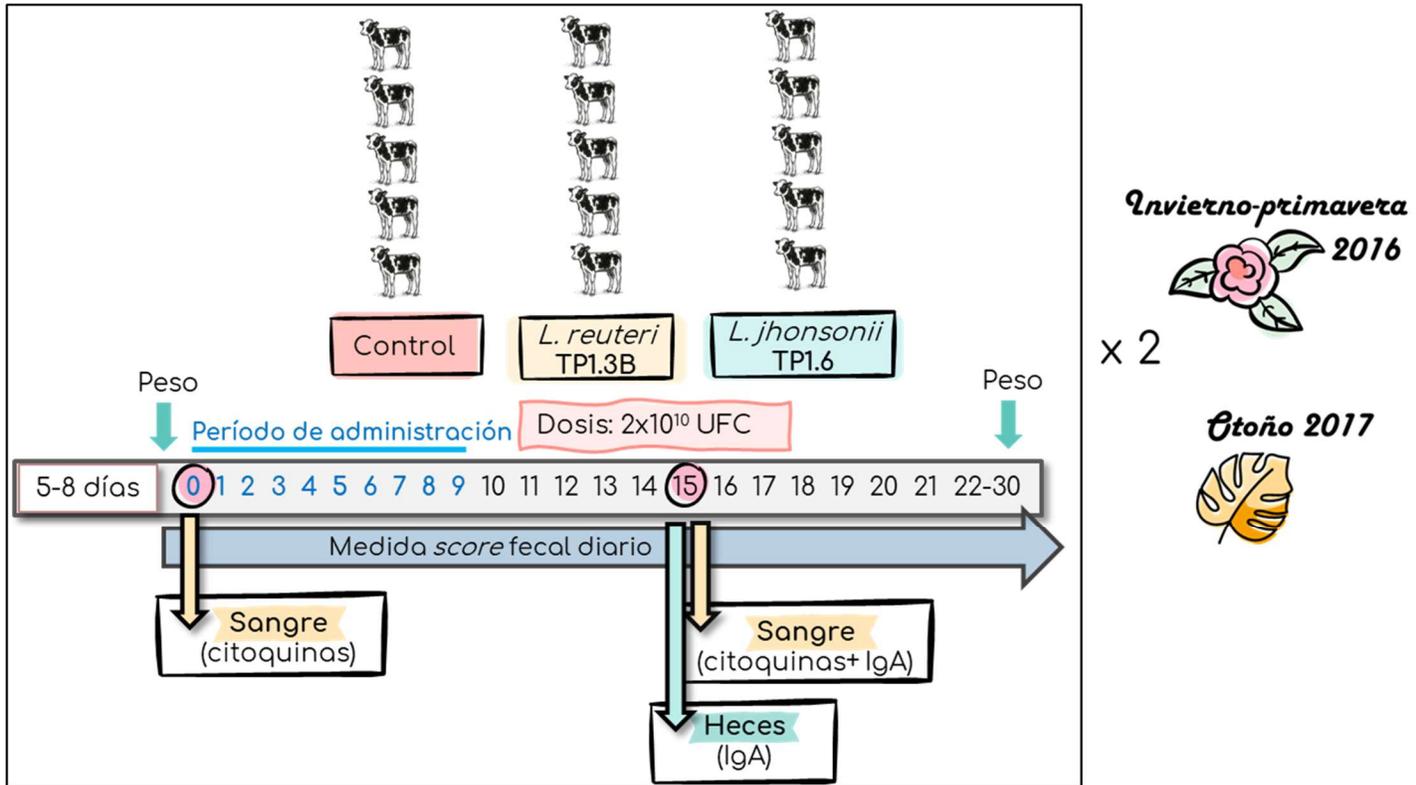
Evaluar el efecto de la administración de probióticos en la DNT y parámetros de salud y sistema inmune de terneros de lechería.

### 3.4 ESTRATEGIA GENERAL

---

Para el desarrollo de este capítulo se seleccionaron las cepas *L. reuteri* TP1.3B y *L. johnsonii* TP1.6. Se realizó un ensayo *in vivo* en dos instancias de acuerdo con los dos períodos anuales de parición del Tambo Experimental de INIA-La Estanzuela. En cada instancia se utilizaron 15 terneros Holando machos divididos en tres grupos de cinco animales. Los grupos correspondieron al tratamiento control, tratamiento con la cepa TP1.3B y tratamiento con la cepa TP1.6. Los terneros comenzaron el período de administración oral al cumplir de 5 a 8 días de vida. A los animales tratados con las cepas se les administró una dosis diaria de  $2 \times 10^{10}$  UFC por 10 días consecutivos (día 0 a día 9) y se realizó el seguimiento de todos los animales hasta completar 4 semanas de ensayo. Se determinó el *score* fecal diariamente y se realizaron hemogramas semanales. Para la cuantificación de la expresión de citoquinas en sangre se tomaron muestras el día de la primera dosis (día 0) y en el día 15 y se realizó

RT-qPCR de algunas citoquinas pro y antiinflamatorias. Se cuantificó IgA total en heces y plasma en el día 15 mediante la técnica de ELISA.



**FIGURA 3.1** Esquema de la estrategia experimental del Capítulo III. Este ensayo se realizó en dos períodos de parición del año (primavera-2016 y otoño-2017).

### 3.5 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.5.1 Animales y alojamiento

El manejo de animales se llevó a cabo bajo la supervisión de veterinarios y con la aprobación del Comité de Ética de la Universidad de la República (CHEA, Facultad de Veterinaria). Se llevó a cabo un ensayo de administración de potenciales probióticos a terneros en el tambo experimental del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (Colonia, Uruguay). Considerando las épocas de parición el ensayo se llevó a cabo en dos instancias, una en invierno-

primavera (**primavera-2016**) y otra en otoño (**otoño-2017**). El diseño experimental y el manejo de los animales fueron los mismos en ambas instancias. En cada una, 15 terneros machos Holando nacidos en ese establecimiento recibieron dos dosis (4 l en total) de calostro artificial (Saskatoon Colostrum Company, Saskatoon, Canadá) dentro de las primeras 12 h de nacimiento y se desinfectó el ombligo con una solución de yodo al 7%. En los días siguientes, la transferencia pasiva de inmunidad se evaluó midiendo la concentración de proteína total en suero como se describió anteriormente (Morrill et al., 2013) con un refractómetro digital de bolsillo PAL-3 (Atago, Tokio, Japón). Hasta los cinco días de vida, los terneros se alimentaron con biberón dos veces al día con 2 l de leche entera fresca sin pasteurizar proveniente del tanque de enfriamiento del tambo. Posteriormente, los animales se mantuvieron a estaca individualmente en el campo con espacio limitado para moverse y al menos 3 metros de separación entre ellos. Se proporcionó leche en baldes individuales manteniendo los mismos horarios de alimentación con la adición de agua y ración (Erro Nutriternera, 18% de proteína). Se administraron agua (2 l cada vez) y ración (300 g cada vez) dos veces al día, 2 h después del consumo de leche. La temperatura de la leche administrada a cada ternero se controló estrictamente y se mantuvo entre 37 y 39 °C. Cada semana los terneros se movían a diferentes lugares libres de heces y su distribución en el campo fue al azar (fotos en el capítulo II).

### *3.5.2 Diseño experimental.*

En cada instancia *in vivo*, se dividieron 15 terneros Holando en 3 grupos de 5 animales. Un grupo fue el control y los otros dos grupos recibieron las cepas liofilizadas *L. reuteri* TP1.3B y *L. johnsonii* TP1.6, respectivamente. El grupo control recibió el vehículo estéril. Los terneros comenzaron el tratamiento con probióticos entre los 5 a 8 días de vida, que consistió en la administración de

una dosis oral diaria durante 10 días consecutivos de *ca.*  $2 \times 10^{10}$  UFC (día 0 a día 9) con la alimentación de la mañana (**TABLA 3.1**). Los terneros se mantuvieron en observación hasta completar 4 semanas en total y el *score* fecal y la presencia de diarrea se determinaron diariamente asignando las heces a una escala diseñada por Frizzo et al. (2010):

1. Heces normales, heces firmes, ligeramente deformadas al caer al piso.
2. Heces blandas, heces sin forma apiladas y que al caer al suelo se dispersan algo.
3. Heces líquidas, heces que al caer al suelo se dispersan en láminas de aproximadamente 6 mm de espesor.
4. Heces acuosas, heces de consistencia líquida .

El índice de consistencia fecal (ICF) se calculó con la expresión:

$$\text{ICF} = [(dE1 \times 1) + (dE2 \times 2) + (dE3 \times 3) + (dE4 \times 4)] / (Td \times 4)$$

siendo dE1, dE2, dE3 y dE4 el número de días con *score* fecal de 1, 2, 3 y 4 respectivamente y Td el número de días de un periodo dado (por ejemplo 7 si se quiere calcular semanalmente).

De esta manera, se obtuvo un valor de *score* fecal a diario para cada ternero y el ICF se calculó para cada ternero de forma semanal con la fórmula presentada.

Se consideró que un animal tenía diarrea cuando presentaba un *score* fecal de 3 o 4. Cuando fue necesario, se administró a los terneros solución salina hidratante (Torre Vieja) dos horas después de la alimentación con leche. No se administraron tratamientos con antibióticos. Los animales se pesaron al comienzo (5-8 días de vida) y al final del ensayo (35-40 días de vida) y se realizaron recuentos sanguíneos semanales de todos los animales (eritrocitos,

hematocrito, hemoglobina, plaquetas, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos). La ganancia de peso diaria se calculó restando el peso final menos el inicial y dividiéndolo por el número de días totales. A lo largo del período experimental, se tomaron muestras de material fecal o sangre para realizar diferentes análisis que se detallan a continuación.

**TABLA 3.1.** Dosis de probióticos administrados a los grupos tratados en ambas insancias. Unidades en UFC totales.

	Primavera -2016	Otoño-2017
TP1.3B	2,0X10 <sup>10</sup>	1,1X10 <sup>10</sup>
TP1.6	1,9X10 <sup>10</sup>	2,5X10 <sup>10</sup>

### 3.5.3 Cuantificación de la expresión de citoquinas en sangre

En los días 0 y 15 se tomaron muestras de sangre de la vena yugular y se recogieron en tubos al vacío con EDTA: tripotassium (Deltalab). Dentro de la siguiente media hora, se mezclaron 300 µl de sangre con 1,3 ml de RNALater y se mantuvo a -20 °C hasta su posterior procesamiento. Se usó el kit comercial RiboPure-Blood (Thermo Fisher Scientific, EE. UU) para extraer el ARN total, el cDNA se sintetizó inmediatamente con High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, EE. UU) y fue guardado a -20 °C hasta su utilización. La cuantificación relativa del ARNm de IL-4, IL-10, IL-12B, INF-γ y TNF-α se realizó utilizando β-actina (ACTB) y gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) como genes de referencia. Los *primers* y los protocolos se tomaron de Puech *et al.*, (2015). El cálculo de expresión relativa se realizó utilizando el método de Pfaffl (2001). Para ello, los valores de *Ct* y eficiencia del gen de referencia se calcularon como la media geométrica de los valores de *Ct* y eficiencia de los genes ACTB y GAPDH. A su vez, la muestra calibradora se construyó con los valores obtenidos al día 0 de todos

los animales (**ECUACIÓN 2**). Para construir la curva estándar se clonaron las secuencias *target* (metodología en **Apéndice 1**) y se realizaron diluciones seriadas del plásmido con la secuencia *target*.

**ECUACIÓN 2:**

$$Ratio = \frac{E(target)^{\Delta Ct TARGET}}{E(ref)^{\Delta Ct REF}}$$

siendo,

**E (Target):** eficiencia de reacción del gen *target* (citoquinas).

**E (Ref):** media geométrica de las eficiencias de reacción de ambos genes de referencia (ACTB y GAPDH).

**$\Delta Ct$  Target:** diferencia en el valor de *Ct* del gen *target* entre la muestra problema y la muestra calibradora que en este trabajo se tomó como el promedio del valor de *Ct* al día 0 de todos los animales.

**$\Delta Ct$  Ref:** diferencia en el valor de *Ct* de los genes de referencia entre la muestra problema y la muestra calibradora

#### *3.5.4 Cuantificación de IgA total en plasma y heces*

Al día 15 se tomaron muestras de heces y sangre para realizar la cuantificación de IgA total. La sangre se tomó de la vena yugular con tubos al vacío con EDTA: tripotassium, se centrifugó a 2000 xg por 5 minutos y se tomó el plasma para mantenerlo a -80 °C hasta su uso. Las heces se tomaron de la ampolla rectal luego de estimulación manual y se recogieron en frascos estériles. Luego se resuspendieron en una relación 1:4 con una solución fría de PBS adicionado con EDTA 0,5 mM pH=8 y PMSF 0,5mM, se agitaron por 5 minutos en vortex y se centrifugaron por 20 minutos a 10.000 xg a 4°C (Delucchi *et al.*, 2014). El sobrenadante se guardó a -80°C hasta su uso. Se utilizó el kit comercial Bovine IgA ELISA (Bethyl Laboratories, EEUU) con

el protocolo recomendado por los fabricantes. Las muestras de plasma se diluyeron 1:500 y las de heces 1:10.000 en PBS.

### *3.5.5 Análisis estadísticos*

Se utilizó el test de Kruskal-Wallis para comparar la expresión de citoquinas, la cuantificación de IgA, los parámetros sanguíneos, el aumento de peso diario y el índice de consistencia fecal. El efecto del tratamiento en el *score* fecal se evaluó mediante un modelo de regresión logística ordinal con la función `polr` del paquete `{MASS}` de R (Ripley *et al.*, 2013). Las variables independientes ofrecidas al modelo fueron ‘Tratamiento’ (el grupo control fue el valor de referencia), ‘Semana’ y el ‘Año’ (la instancia de 2016 fue el valor de referencia). Se utilizó el test de Brant para probar el supuesto de probabilidades proporcionales implementado en el paquete `{car}` (Brant, 1990). Con fines comparativos se analizaron datos climáticos de cada instancia obtenidos desde la estación agrometeorológica presente en INIA-La Estanzuela ([http://www.inia.org.uy/disciplinas/agroclima/banco\\_met/observacion/index.html](http://www.inia.org.uy/disciplinas/agroclima/banco_met/observacion/index.html)). El valor de  $p$  fue de 0,05.

## 3.6 RESULTADOS

---

### *3.6.1 Efecto sobre la incidencia de diarreas, score fecal, ICF y GDP.*

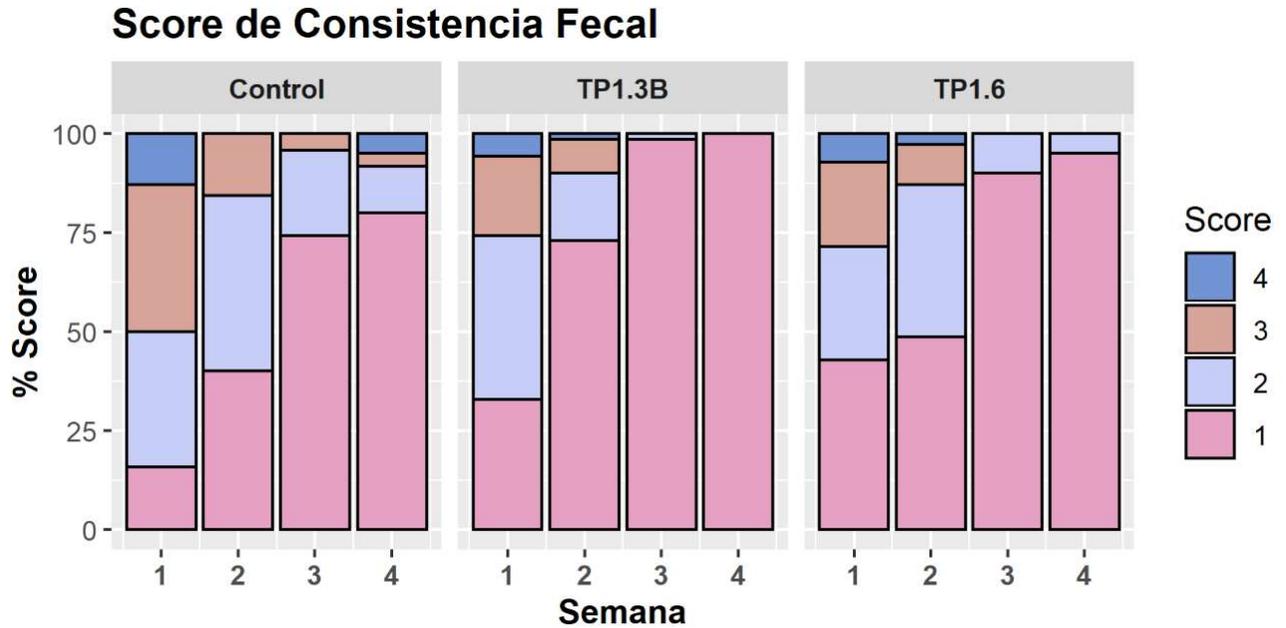
En general, los terneros presentaron *scores* fecales más altos durante las primeras dos semanas, mientras que en las semanas 3 y 4 solo se presentaron *scores* fecales de 1 y 2 y no se presentaron episodios de diarrea (**FIGURA 3.2**). Por lo tanto, se presentan los resultados de incidencia de diarreas e ICF para las semanas 1 y 2. La incidencia de diarreas se calculó como la proporción de días con *score* fecal 3 y 4. Ambos grupos tratados presentaron menor incidencia

de diarreas que el grupo control durante la primera semana. El índice de consistencia fecal (ICF) también se calculó por semanas y ambos grupos tratados mostraron valores significativamente menores que el control en la primera semana. A su vez, el grupo tratado con la cepa TP1.3B presentó menor ICF que el control en la segunda semana (**FIGURA 3.3**).

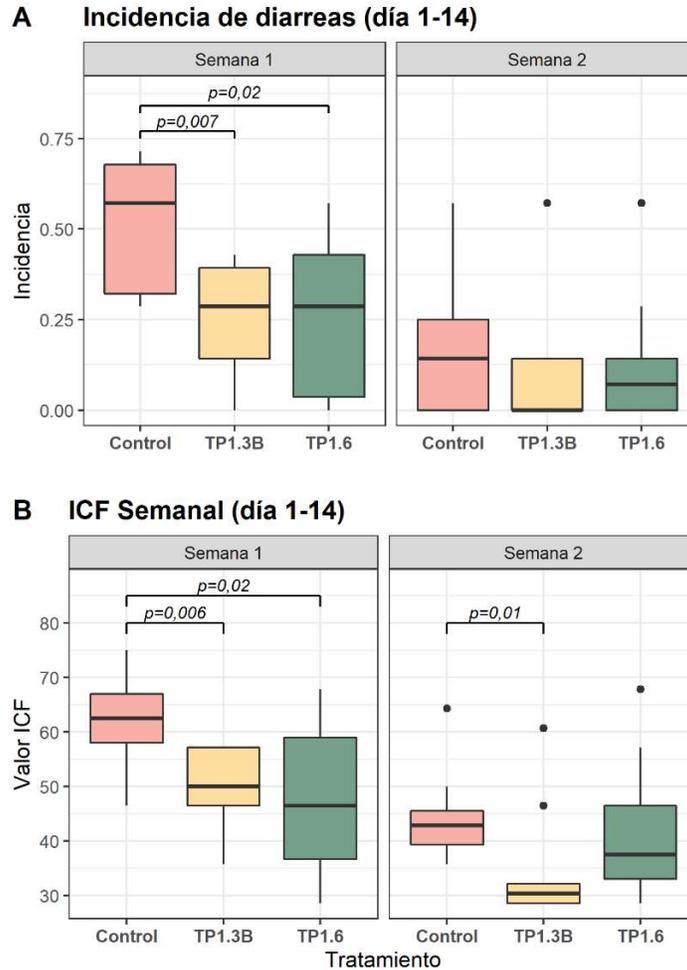
El efecto de la administración de las cepas sobre el *score* fecal diario se determinó utilizando un modelo logístico ordinal. El supuesto de probabilidades proporcionales del modelo de regresión logística se confirmó y se pudo determinar que las variables “Tratamiento”, “Semana” y “Año” tuvieron efectos significativos en el *score* fecal (**TABLA 3.2**). Los tratamientos con ambas cepas, la edad (en semanas) y la instancia de otoño-2017 se asociaron con valores de *score* fecal más bajos, o sea menos episodios de diarrea. El efecto de la variable “Año” sobre el *score* fecal significó que hubo diferencias entre ambas instancias. A continuación, se analizaron los datos de incidencia de diarreas e ICF por separado para determinar si los resultados cambiaban al dividir los datos por año. En cuanto a la incidencia de diarreas se pudo observar que en la instancia de otoño-2017 el tratamiento con la cepa TP1.6 no presentó diferencias significativas con el control. Por otro lado, el cuanto al ICF, la única diferencia significativa en otoño-2017 se dio entre el grupo control y el TP13.B en la segunda semana (**FIGURA 3.4**).

No hubo diferencias estadísticamente significativas en la ganancia diaria de peso (GDP) entre los grupos control y los tratados, pero sí hubo diferencias significativas entre ambas instancias, siendo mayor la GDP en otoño-2017 (**FIGURA 3.5**). Todos los terneros sobrevivieron el período experimental. No se observaron reacciones adversas a la administración de los probióticos, como el aumento de la frecuencia cardíaca y respiratoria o la temperatura corporal, durante el período de administración y los días siguientes. Tampoco se observaron diferencias en los valores de eritrocitos, hematocrito, hemoglobina,

plaquetas, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos de los hemogramas semanales (resultados no mostrados).



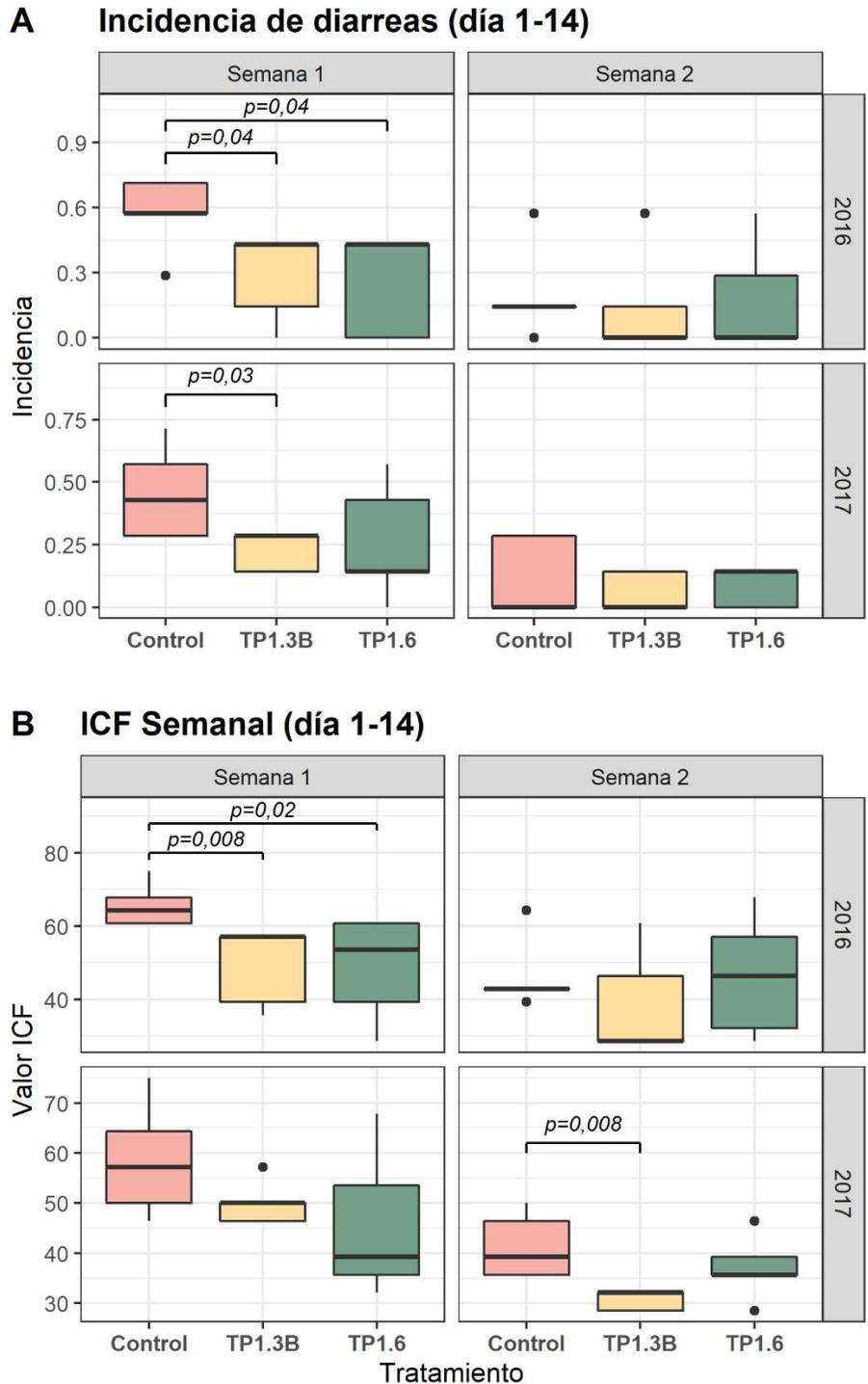
**FIGURA 3.2.** Distribución media del *score* fecal (1-4) durante las cuatro semanas de ensayo separado por grupos (En resumen: 1 = muestras fecales bien formadas; 2 = muestras fecales semiformadas; 3 = heces sin forma; 4 = heces acuosas).



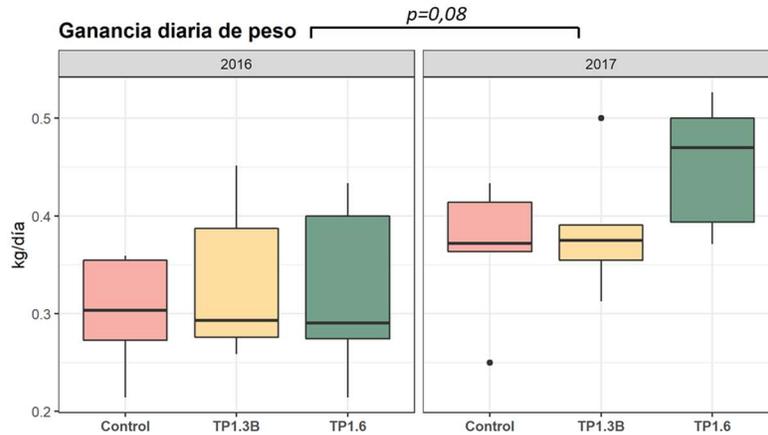
**FIGURA 3.3. Incidencia de diarreas e ICF en las primeras dos semanas.** (A) Incidencia de diarreas en las dos primeras semanas. (B) Valor del Índice de Consistencia Fecal (ICF) semanal. Se muestran los *p*-valores que fueron significativos según el test de Kruskal-Wallis.

**TABLA 3.2.** Modelo de regresión logística para determinar el efecto del tratamiento, semana y año sobre el *score* fecal. Los valores de referencia para “Tratamiento” y “Año” fueron el grupo control y primavera-2016, respectivamente.

Variable	Valores	SEM	<i>p</i> -valor	OR (95% CL)
Tratamiento-TP1.3B	-1,37	0,21	<0,0001	0,25 (0,17-0,38)
Tratamiento-TP1.6	-0,9	0,20	<0,0001	0,41 (0,28-0,59)
Semana	-1,36	0,10	<0,0001	0,26 (0,21-0,31)
Otoño-2017	-0,77	0,17	<0,0001	0,47 (0,34-0,64)



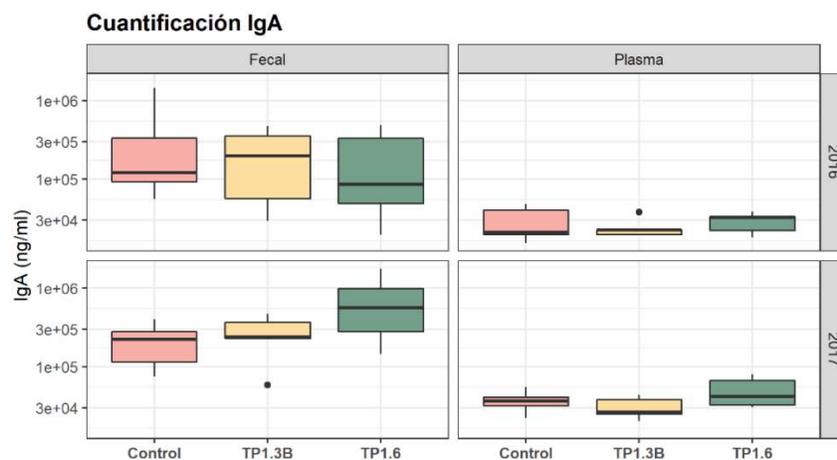
**FIGURA 3.4.** Incidencia de diarreas e ICF en las primeras dos semanas de las instancias por separado. **(A)** Incidencia de diarreas en las dos primeras semanas. Se muestran los valores de  $p$  que fueron significativos según el test de Kruskal-Wallis. **(B)** Valor del Índice de Consistencia Fecal (ICF) semanal.



**FIGURA 3.5.** Ganancia de peso diaria para cada grupo y cada instancia. No se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados y el control, pero sí se encontraron diferencias entre ambas instancias.

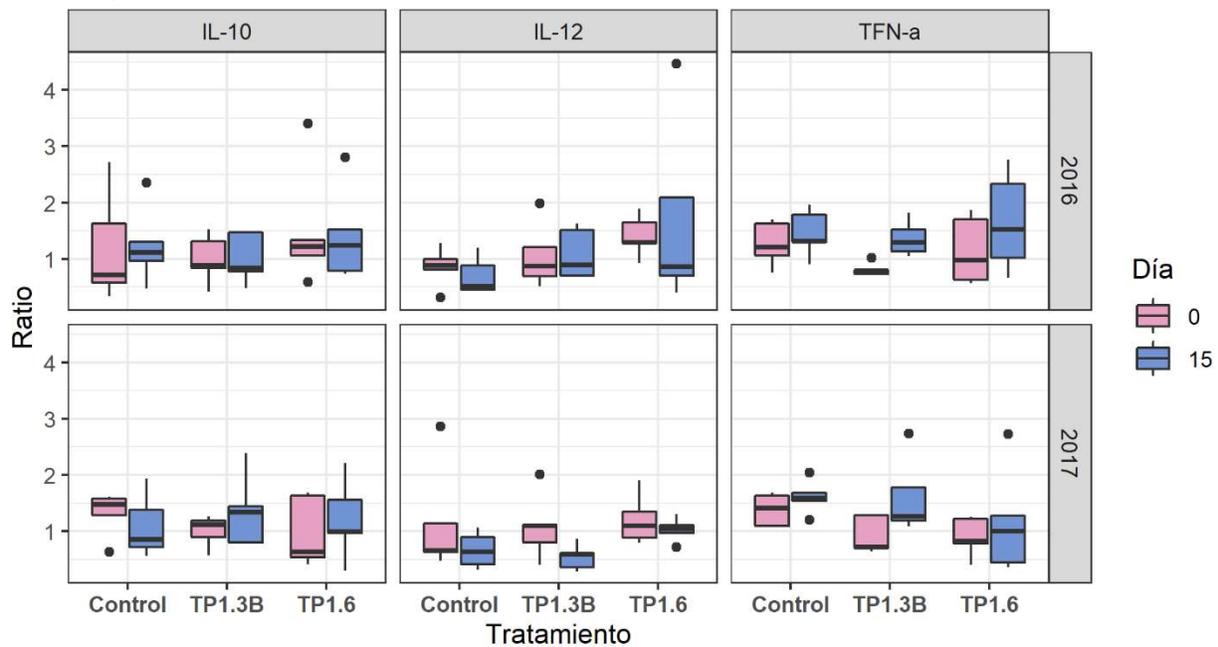
### 3.6.2 Efecto sobre parámetros inmune

La cuantificación de IgA total se realizó en muestras de heces y plasma (FIGURA 3.6). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y los tratados. En cuanto a la cuantificación del ARNm de citoquinas, no se logró detectar IL-4 ni INF- $\gamma$  en las muestras de plasma y solo se cuantificaron IL-10, IL-12B y TNF- $\alpha$  (FIGURA 3.7). No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el control.



**FIGURA 3.6.** Cuantificación de IgA total en heces y en plasma a los 15 días. No se observaron diferencias significativas entre el control y los tratamientos.

### Expresión citoquinas en sangre



**FIGURA 3.7.** Expresión de citoquinas en sangre. Los genes de referencia fueron GAPDH y ACTB. La muestra calibradora para el cálculo utilizando la ecuación de Pfaffl (2001) fue un promedio de los datos de todos los animales en el día 0.

## 3.7 DISCUSIÓN

En este estudio se realizó un ensayo *in vivo* en dos instancias para determinar el efecto de la administración de dos potenciales probióticos sobre la DNT y parámetros del sistema inmune. Los probióticos utilizados fueron seleccionados según resultados obtenidos en el capítulo anterior de este trabajo. Las cepas *L. johnsonii* TP1.3B y *L. reuteri* TP1.6 mostraron resultados promisorios en su caracterización *in vitro* y capacidad de persistir en el TGI de terneros, y por lo tanto fueron las seleccionadas para continuar su caracterización. Se determinó que la incidencia de diarreas y el ICF fue menor en ambos grupos tratados en la primera semana de vida. Al analizar los datos de ambas instancias por separado se pudo observar que en primavera-2016 el efecto de la administración de las cepas fue más notorio en cuanto a la incidencia de diarreas y el ICF. Igualmente, en ambas instancias se observó que la

administración de las cepas disminuyó el *score* fecal. Esto último se pudo observar a partir de los valores arrojados por el modelo de probabilidades proporcionales. Este modelo fue utilizado debido a la naturaleza categórica del *score* fecal. Cuando la variable de respuesta es categórica y tiene un determinado orden se pueden utilizar los modelos de regresión logística ordinal, entre otros (Faraway, 2006; Agresti, 2010). Los resultados indicaron que ambos tratamientos, la edad (medida en semanas) y la instancia de otoño-2017 se asociaron con menores valores de *score* fecal, o sea materia fecal más consistente (valores negativos de coeficientes y *odds ratio* -OR- menores a 1). Hubo diferencias en los parámetros ambientales medidos entre ambas instancias. La temperatura ambiental máxima, media y mínima fue distinta, siendo significativamente menor en primavera-2016. Además, durante este mismo período hubo varios eventos de heladas agrometeorológicas y las unidades de frío fueron significativamente más altas (**FIGURA suplementaria 1, S1**). Es sabido que en países de clima templado, la estación del año en la cual nacen los terneros afecta su rendimiento, morbilidad y mortalidad, siendo peor en los meses más fríos (Khan & Khan, 1991; Bendali *et al.*, 1999; Raboisson *et al.*, 2013; Windeyer *et al.*, 2014). Si bien la incidencia de diarrea total fue igual en ambas instancias (datos no mostrados), el aumento en el *score* fecal en primavera-2016 podría deberse, entre otras cosas, al estrés asociado a las bajas temperaturas. Se considera que el rango de temperatura ambiental en el cual los terneros de menos de 21 días no deben gastar más energía de la necesaria para mantener la temperatura corporal es entre 15-25 °C (Drackley, 2008). En este estudio, la temperatura media en primavera-2016 fue de 12,3 °C. Esto a su vez podría asociarse a que la GDP fue significativamente menor en este período. La asociación entre baja GDP y temperaturas ambientales frías también han sido reportado previamente (Waltner-Toews *et al.*, 1986b; Soberon *et al.*, 2012). Estos resultados mostraron

que podría ser necesario considerar el efecto estacional para evaluar el efecto de los potenciales probióticos, y se deberían realizar varios ensayos durante las temporadas de parto anuales. Por otro lado, también es bien sabido que los terneros más jóvenes son más susceptibles a la diarrea y exhiben valores más altos de *score* fecal (Bendali *et al.*, 1999). En este estudio se observó que independientemente del año y del tratamiento, la edad (medida en semanas) se asoció con *scores* fecales más bajos según el modelo de probabilidades proporcionales.

El efecto de probióticos sobre la diarrea y el *score* fecal ya ha sido descrito por otros autores. Algunos han observado efectos positivos en estos parámetros asociados a la administración de probióticos (Magalhães *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011; Agazzi *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2019), y otros no han observado efecto (Donovan *et al.*, 2002; Kowalski *et al.*, 2009; Riddell *et al.*, 2010). En este trabajo se observó un efecto beneficioso sobre la incidencia de diarreas durante la primera semana del tratamiento, que se corresponde con la segunda semana de vida de los animales, ya que el período de administración comenzó cuando los terneros tenían 5-8 días. Varios autores han demostrado que los valores más altos de incidencia de diarreas se dan durante la segunda semana de vida (Waltner-Toews *et al.*, 1986a; Bendali *et al.*, 1999; Bartels *et al.*, 2010; Coura *et al.*, 2014; Meganck *et al.*, 2014), por lo tanto resulta promisorio que se hayan observado cambios beneficiosos en la incidencia de diarrea durante este período crítico.

El efecto beneficioso sobre las diarreas y el *score* fecal no se vio reflejada en la GDP, un parámetro que se ha demostrado que es muy importante en el rendimiento posterior de los animales (Soberon *et al.*, 2012). La falta de efecto en la GDP podría explicarse, entre otros factores, por el tipo de régimen de alimentación de los terneros, que fue con volumen fijo de leche. Este tipo de alimentación restringida es bastante utilizado mundialmente (USDA, 2016) y

es generalmente fijado en un 10% del peso al nacimiento, o sea 4 a 5 l/día (Drackley, 2008; Vasseur *et al.*, 2012; Hötzel *et al.*, 2014). En otros casos se utiliza una alimentación con volúmenes variables, basada en aumentos semanales en el volumen de leche ofrecido a los terneros (Omid-Mirzaei *et al.*, 2015). Tanto la aplicación de alimentación fija o variable se basa en la existencia de un control del consumo de cada ternero, ya sea por alojamiento individual o por alojamiento grupal con amamantadoras automáticas que reconocen al ternero y administran un volumen de leche preestablecido. El tipo de dieta a utilizar es muy discutido, ya que por un lado el aumento progresivo de leche permite una mayor ganancia diaria de peso, mientras que un volumen fijo obliga al ternero a empezar tempranamente con la alimentación sólida, promoviendo el desarrollo del rumen (Drackley, 2008; Khan *et al.*, 2011; Kertz *et al.*, 2017). La alimentación con leche *ad libitum* se ha asociado con un bajo rendimiento y retraso en el crecimiento posterior al destete, probablemente debido a un retraso del desarrollo ruminal (Baldwin *et al.*, 2010). A su vez, puede suceder que en las dietas de mayor ofrecimiento de leche o de aumento progresivo los terneros sufran diarrea nutricional (no asociada a patógenos) y valores de *score* fecal superiores (Quigley *et al.*, 2010; Daneshvar *et al.*, 2017; de Paula *et al.*, 2017), aunque por otro lado hay otros autores que no han visto diferencias (Khan *et al.*, 2007; Omid-Mirzaei *et al.*, 2015). En este ensayo se administró un volumen fijo de leche representando aproximadamente el 10% del peso al nacimiento, buscando por un lado imitar el manejo más utilizado en nuestro país y en el mundo y por otro limitar lo máximo la probabilidad de diarreas nutricionales. Sin embargo, la limitación de nutrientes podría no permitir a los terneros acceder a tasas de crecimiento más altas y tal vez con otro tipo de manejo se podría ver si los probióticos podrían afectar la ganancia de peso.

Por otro lado, en este ensayo no se contó con protocolos preestablecidos para la decisión sobre la administración de algún tipo de tratamiento cuando se presentaron diarreas. Si bien ningún ternero recibió antibióticos, sí se administraron sales rehidratantes. Para futuros ensayos *in vivo* se debería establecer un protocolo a seguir para evitar subjetividades a la hora de tratar las diarreas. Con estos datos se podría calcular si existe una disminución en tratamientos y en costos debido a la administración de probióticos, como han realizado otros autores (Galvão *et al.*, 2005; Berge *et al.*, 2009; Wehnes *et al.*, 2009).

El efecto beneficioso de los probióticos en la salud se ha atribuido, en parte, a la capacidad para modular el sistema inmune, promoviendo la respuesta tanto innata como adaptativa (Matsuzaki & Chin, 2000; Yang *et al.*, 2009). En vacas lecheras, se vio que la suplementación con probióticos orales tuvo un efecto sistémico en la expresión genética global, incluyendo genes involucrados en la inmunidad (receptores TLR y citoquinas) y la homeostasis (Adjei-Fremah *et al.*, 2018). En cabras también se observó un aumento en la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune innata y adaptativa (Ekwemalor *et al.*, 2017). Dado que en el capítulo anterior se determinó que las cepas persistieron hasta al menos 10 días después de la última administración, se decidió que este estudio determinara si había efecto a largo plazo sobre la inmunidad. Este efecto a largo plazo no se detectó, al menos en las citoquinas IL-10, IL-12B y TNF- $\alpha$ , pero no se excluye que pudiera existir algún efecto durante el período de administración. Además, este análisis se basó en la cuantificación del ARN mensajero en sangre de las citoquinas de interés y no en la cuantificación directa de las citoquinas circulantes, como han realizado otros autores (Wang *et al.*, 2009; Marranzino *et al.*, 2012). Existen otras metodologías para evaluar el efecto de la administración de probióticos sobre el sistema inmune de

animales. Una de ellas es el estudio de la activación *ex vivo* de glóbulos blancos, especialmente polimorfonucleares, y el estudio de su actividad fagocítica, expresión de genes, análisis por citometría de flujo, entre otros (Magalhães *et al.*, 2008; Fleige *et al.*, 2009; Marranzino *et al.*, 2012; Qadis *et al.*, 2013). También se han realizado estudios de expresión de citoquinas directamente en la mucosa intestinal, lo cual implica el sacrificio de los animales y la realización de necropsias (Wang *et al.*, 2009; Marranzino *et al.*, 2012).

La cantidad de IgA presente en el TGI se utiliza como un indicador de la salud general y la función inmune (Heinrichs *et al.*, 2009). La IgA es la inmunoglobulina más abundante en las secreciones mucosas, se une a los antígenos que neutralizan los potenciales patógenos y ayuda a mantener la homeostasis (Gutzeit *et al.*, 2014). Se han descrito cepas probióticas capaces de estimular la producción de IgA en varias especies animales (Erickson & Hubbard, 2000; Delcenserie *et al.*, 2008; Campeotto *et al.*, 2011; Delucchi *et al.*, 2014). Se ha demostrado que el tratamiento previo con ciertos probióticos puede estimular la producción de IgA específica para un patógeno específico después de un desafío (Ogawa *et al.*, 2001; Qiao *et al.*, 2002; Vinderola *et al.*, 2007). En este trabajo, se observó una gran variabilidad entre las muestras y no se detectó ningún efecto estadísticamente significativo sobre la cantidad de IgA en el día 15, es decir, 5 días después de la última dosis. La alta variabilidad podría deberse a varios factores, como la tasa de defecación del animal y la consistencia de las heces (Bakker-Zierikzee *et al.*, 2006). Otra forma de evaluar la cantidad de IgA secretada podría ser mediante la cuantificación de su expresión por qPCR a nivel intestinal (Reséndiz-Albor *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2016).

### 3.8 CONCLUSIONES

Los resultados de este capítulo mostraron que la administración de estas cepas con potencial probiótico podría mejorar la incidencia de diarreas y se presentan como posibles probióticos para terneros bajo sistemas de cría artificial. Sería oportuno realizar más estudios para determinar si factores estacionales influyen en la acción de los probióticos sobre la DNT. A su vez, en futuros ensayos se deberían analizar las diferencias en tratamientos y costos asociados a la administración de estos probióticos de forma de determinar su viabilidad en sistemas de producción comerciales. Por otro lado, los parámetros inmunes estudiados no revelaron posibles mecanismos de acción subyacentes. En el siguiente capítulo se analizará el efecto de la administración sobre la microbiota fecal de los terneros.

---

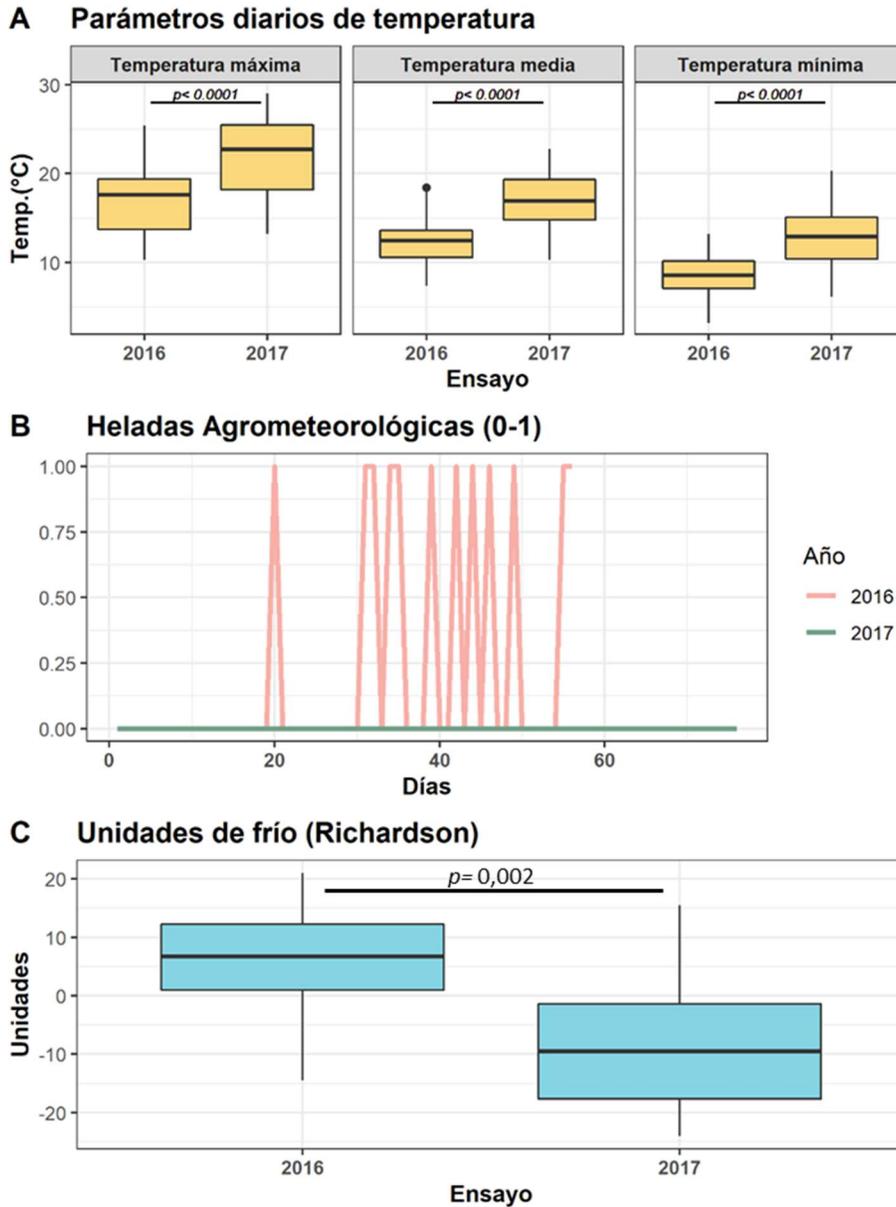
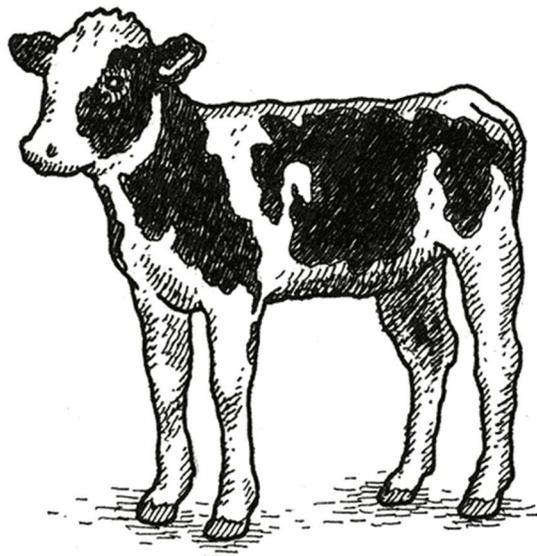


FIGURA S1. Parámetros de ambientales obtenidos diariamente en cada instancia . (A) Parámetros de temperatura. (B) Heladas agrometeorológicas (0-1). En el 2016 se presentaron 9 eventos de heladas mientras en el 2017 ninguna. (C) Unidades de frío (Richardson).

# CAPÍTULO IV

EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE  
CEPAS SELECCIONADAS EN LA  
MICROBIOTA FECAL DE TERNEROS.



## 4.1 RESUMEN

---

Uno de los mecanismos de acción propuestos para los probióticos es su capacidad de modular la composición de la microbiota intestinal incluyendo a potenciales patógenos. En este capítulo se analizó el efecto de la administración de probióticos sobre la microbiota intestinal mediante secuenciación masiva de la región V4 del gen ribosomal 16S. El ensayo realizado fue el mismo que en capítulo anterior y para determinar el efecto en la microbiota se tomaron muestras en los días 0, 10 y 21. Por otro lado, en el día 10, se realizó la cuantificación por qPCR de patógenos asociados a la diarrea neonatal. Se observaron diferencias en la composición general de microbiota causado por la administración de probióticos. Análisis de abundancias diferenciales mostraron cambios en géneros específicos. Por ejemplo, en primavera-2016 al día 21 se observó menor abundancia de *Escherichia/Shigella* en ambos grupos tratados. A su vez, se observó un aumento del género *Akkermancia* spp. en los grupos tratados. En cuanto a la cuantificación de patógenos, tanto coronavirus como *Salmonella enterica*. no fueron detectados en heces. Rotavirus fue solo detectado en primavera-2016, *Stx1* y *eae* sólo se detectaron en otoño-2017. No se encontraron diferencias en relación con la presencia o la abundancia de patógenos entre los grupos tratados y el control.

## 4.2 INTRODUCCIÓN

---

La microbiota intestinal es el conjunto de microorganismos que reside en el intestino en forma simbiótica y desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis tanto sistémica como de las mucosas (Hooper *et al.*, 2012). Cumple funciones vitales en todos los vertebrados, como degradación de compuestos complejos, síntesis de metabolitos de importancia nutricional como el butirato y la vitamina k, mantiene la homeostasis del sistema inmune y confiere protección frente a patógenos, entre otras (Sommer

& Bäckhed, 2013; Rooks & Garrett, 2016). La disbiosis en la microbiota intestinal se ha relacionado con varios trastornos entéricos que causan inflamación de la mucosa intestinal en humanos y otros animales (Sartor & Mazmanian, 2012). El mantenimiento de una composición microbiana normal es necesario para un intestino sano (Bischoff, 2011), por lo tanto, fomentar un microbioma intestinal saludable es un tema de interés para la producción animal (Malmuthuge & Guan, 2017). Oikonomou *et al.* (2013) han sugerido que la composición microbiana intestinal temprana de los terneros podría estar relacionada con la susceptibilidad a las infecciones entéricas, lo que indicaría que las variaciones individuales en la microbiota intestinal podrían desempeñar un papel importante en la patogénesis de la DNT. Por este motivo, han ido en aumento los estudios que exploran la composición microbiana del intestino, el sistema inmune de la mucosa y la manipulación temprana de la dieta para mejorar la salud de los terneros de lechería (Malmuthuge & Guan, 2017). La composición de la microbiota del TGI influye en la salud de los animales y en su productividad (Uyeno *et al.*, 2015; Celi *et al.*, 2017). La diversidad y la composición de la microbiota pueden verse influidas por muchos factores, como la edad, la genética, el manejo, la dieta y los aditivos (Malmuthuge *et al.*, 2015b; Castro *et al.*, 2016). Dentro de estos factores, se considera que la dieta cumple un papel fundamental en la composición de la microbiota del TGI (Callaway *et al.*, 2010; Conlon & Bird, 2015). A su vez, en terneros se sabe que el destete cambia de forma sustancial la microbiota ruminal e intestinal (Malmuthuge *et al.*, 2013; Meale *et al.*, 2016, 2017).

El establecimiento del microbioma en el TGI del ternero recién nacido está mediado por factores sucesivos y mediados por el hospedero (Taschuk & Griebel, 2012). La colonización se da de forma temprana y hoy en día está cambiando el paradigma sobre la colonización *in utero* (Klein-jöbstl *et al.*, 2014; Alipour *et al.*, 2018). Se ha demostrado que la administración de calostro

inmediatamente después del nacimiento favorece la colonización de microorganismos en el intestino (Malmuthuge *et al.*, 2015a). Hasta la tercera semana de vida se considera a los terneros como pre-rumiantes ya que el rumen se encuentra subdesarrollado anatómica y fisiológicamente (Baldwin *et al.*, 2004). En esta etapa su dieta es predominantemente leche, que es transportada por el surco esofágico directamente al abomaso sin pasar por el rumen (Davis & Drackley, 1998). El comienzo de la ingesta de alimentos sólidos (por ejemplo ración) alrededor de las 3 semanas de edad desencadena un proceso crítico de transición de un no rumiante funcional a un verdadero rumiante que se basa en el establecimiento y la actividad de la microbiota del rumen (Drackley, 2008).

La industria ganadera se enfrenta a muchos desafíos y uno de ellos son las altas tasas de mortalidad de terneros que afectan el reemplazo de hembras (USDA, 2010). A su vez, a pesar de medidas preventivas, las infecciones entéricas son una de las principales causas de muerte de neonatos (Uetake, 2013). Métodos para mejorar la salud intestinal de los terneros durante el período previo a al destete son necesarios para minimizar la susceptibilidad a las infecciones entéricas. Además, con las nuevas regulaciones que limitan el uso sub-terapéutico de antimicrobianos (Smith, 2015), la necesidad de enfoques alternativos para minimizar la incidencia de diarrea es urgente. Por lo tanto, la alta mortalidad de los terneros causada por infecciones entéricas, así como el aumento de la presión para disminuir el uso de antimicrobianos, fomenta enfoques multidisciplinarios para mejorar la salud intestinal mediante la manipulación de la microbiota (Malmuthuge & Guan, 2017).

La DNT resulta de una compleja interacción entre el hospedero, agentes infecciosos y el ambiente (Blanchard, 2012; Muktar *et al.*, 2015). Varios patógenos como virus, bacterias y protozoarios han sido asociados con la DNT

(Foster & Smith, 2009; Cho *et al.*, 2013). Particularmente rotavirus, coronavirus, algunos patotipos de *E. coli*, algunos serotipos de *Salmonella enterica*, y el protozoario *Cryptosporidium parvum* han sido los patógenos más comúnmente asociados a esta patología (Blanchard, 2012; Cho & Yoon, 2014). A su vez es muy común que existan infecciones con más de un agente causal a la vez, y se ha visto que es común la co-infección de rotavirus con *C. parvum* (Enemark *et al.*, 2003; Bartels *et al.*, 2010; Al Mawly *et al.*, 2015; Muktar *et al.*, 2015).

### *Rotavirus y coronavirus*

Rotavirus se encuentra dentro de la familia Reoviridae, no tiene envoltura y posee 11 segmentos de ARN de doble cadena (16~21 kb). Estas características lo hacen muy estable a amplios rangos de pH y temperatura. En cambio coronavirus es un virus envuelto con un genoma de ARN simple cadena (27~32 kb) (Cho & Yoon, 2014). Estos virus pueden detectarse en terneros desde el primer día de vida y mayoritariamente causan diarrea entre los 2 a 24 días, aunque puede haber casos de terneros más grandes que son afectados. Rotavirus tiene un período de incubación de 1 a 3 días y la diarrea dura de 2 a 5 días si no presenta complicaciones, mientras que coronavirus tiene un período de incubación de 2 días y la diarrea dura de 3 a 6 días (Foster & Smith, 2009; Blanchard, 2012). Tanto rotavirus como coronavirus causan atrofia de las vellosidades, lo que resulta en diarrea debido a la mala digestión y malabsorción. La mala digestión resulta en la presencia de alimentos sin digerir en el colon, lo que conduce a un crecimiento excesivo de bacterias y aumento de la presión osmótica lo cual exacerba la diarrea (Foster & Smith, 2009; Boileau & Kapil, 2010).

### *Patotipos de E. coli*

*E. coli* coloniza el tracto gastrointestinal de muchos animales y coexiste como parte de la microbiota intestinal (Kaper *et al.*, 2004). No obstante, existen diferentes patotipos de *E. coli* que pueden instalarse y causar enfermedades en animales sanos (Kolenda *et al.*, 2015). Se considera que los patotipos diarreogénicos más importantes son: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), enteropatogénica (EPEC), productoras de toxina Shiga (STEC) incluyendo a enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC), de agregado difuso (DAEC) y enteroinvasiva (EIEC) (Croxen *et al.*, 2013). Se considera que ETEC es un causante importante de diarreas en terneros. EPEC, STEC y EHEC son aisladas frecuentemente de terneros con y sin diarrea y su rol en la patología es controversial. Sin embargo, estos tres patotipos son conocidos patógenos de humanos, por lo que los bovinos de producción constituyen un reservorio importante. Por otro lado, EAEC y DAEC son menos conocidas en bovinos (Kolenda *et al.*, 2015). La adhesión a las células del hospedero es un paso crucial para el establecimiento de la infección y este patógeno puede utilizar varios mecanismos, como adhesinas fimbriales y afimbriales y/o proteínas de membrana externa como intimina (*eae*) (Kaper *et al.*, 2004; Croxen & Finlay, 2010; Mainil, 2013). ETEC se caracteriza por tener fimbrias como F4, F5, F6, F17 y F41 (Nagy & Fekete, 2005) y las toxinas termolábil y termoestable (Fleckenstein *et al.*, 2010). Se considera que las fimbrias F5 y F17 y la adhesina CS31A (gen *clpG*) están entre las adhesinas más relevantes en infecciones por *E. coli* en terneros, corderos, cerdos y perros, y cumplen un rol esencial en las primeras etapas de colonización (Mercado *et al.*, 2003; Nagy & Fekete, 2005; Mainil, 2013). En particular, se ha reportado que las fimbrias F17 y CS31A están altamente asociadas entre sí (Bertin *et al.*, 1996, 2000).

*Salmonella enterica*

*Salmonella* es un bacilo Gram negativo de la familia Enterobacteriaceae, que contiene más de 2500 serotipos en 2 especies: *S. enterica* (con 6 subespecies) y *S. bongori* (Agbaje *et al.*, 2011). Varios serotipos de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* son responsables de infecciones en animales (Costa *et al.*, 2012). Dentro de estos, los serotipos más comúnmente encontrados en bovinos son *S. Dublin* y *S. Typhimurium* (Cho & Yoon, 2014). El serotipo Typhimurium generalmente se asocia con diarrea aguda en terneros jóvenes, mientras que Dublin a menudo se asocia con infecciones sistémicas que pueden resultar en la muerte, sin causar necesariamente síntomas de diarrea (Carrique-Mas *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2012). El estado fisiológico del animal, la edad, la inmunidad y la dosis infectiva afectan el desarrollo de la enfermedad (Nielsen, 2013). Últimamente se han desarrollado técnicas de biología molecular más rápidas para la detección de patógenos como *Salmonella enterica*. En el caso de Salmonella se utiliza comúnmente la amplificación del gen *invA* que codifica para un factor de virulencia involucrado en la invasión del epitelio intestinal (Malorny *et al.*, 2003).

### *Cryptosporidium parvum*

*Cryptosporidium* es un parásito protozoario, zoonótico, de distribución mundial, y una de las principales causas de diarrea en humanos y otros animales (Ryan *et al.*, 2014). La infección ocurre cuando los ooquistes son ingeridos del ambiente y, una vez en el hospedero, el organismo atraviesa un ciclo de vida complejo que involucra múltiples etapas (Foster & Smith, 2009). Varias especies de *Cryptosporidium*, se han reportado en bovinos, siendo *C. parvum* el más relevante clínicamente (Meireles *et al.*, 2011). Animales infectados pueden liberar al ambiente alrededor de  $1 \times 10^7$  ooquistes infectivos durante semanas (Fayer *et al.*, 1998), que a su vez pueden mantenerse viables en el ambiente por largos períodos de tiempo (De Graaf *et al.*, 1999; Tzipori &

Ward, 2002). La excreción de *C. parvum* en las heces puede ocurrir desde los 3 días de vida, con valores máximos a las 2 semanas y continuar hasta la etapa adulta. Sin embargo, la diarrea causada por *C. parvum* raramente ocurre luego de los 3 meses de vida (Harp *et al.*, 1990; O’Handley *et al.*, 1999; Santín *et al.*, 2004). Algunos estudios han mostrado que hasta un 100% de los terneros estudiados excretaban en sus heces este parásito (Xiao & Herd, 1994; O’Handley *et al.*, 1999). En Uruguay se realizó recientemente un estudio en 30 tambos y se determinó que en el 100% había al menos un ternero infectado y que la infección se asociaba con diarreas en la segunda semana de vida (Caffarena, 2017).

### 4.3 OBJETIVO

---

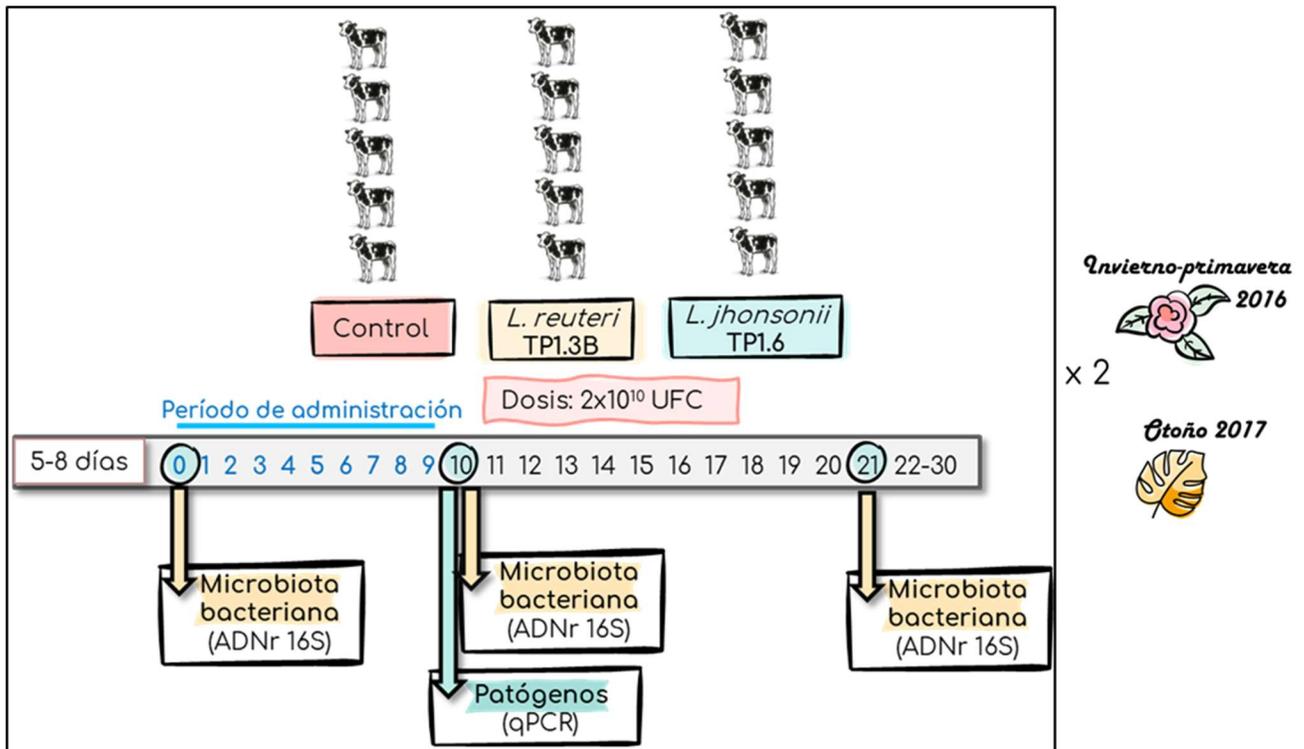
Determinar el efecto de la administración de probióticos sobre la microbiota fecal y patógenos asociados a la DNT.

### 4.4 ESTRATEGIA GENERAL

---

El ensayo presentado en este capítulo es el mismo que el presentado en el capítulo anterior y este capítulo se enfocará en el efecto sobre la microbiota. Brevemente, se realizó un ensayo *in vivo* en dos instancias de acuerdo con los dos períodos anuales de parición del Tambo Experimental de INIA-La Estanzuela. En cada instancia se utilizaron 15 terneros divididos en tres grupos de cinco animales. Los grupos correspondieron al tratamiento control, tratamiento con la cepa TP1.3B y tratamiento con la cepa TP1.6. Los terneros comenzaron el período de administración oral al cumplir 5-8 días de vida. A los grupos tratados se les administró una dosis diaria de *ca.*  $2 \times 10^{10}$  UFC por 10 días consecutivos y al grupo control el vehículo estéril. Para el análisis de la microbiota bacteriana fecal se tomaron muestras de heces el primer día de la administración (día 0), al día siguiente de la última administración (día 10)

y en el día 21. Se realizó la extracción de ADN total con un kit comercial y se secuenció de forma masiva la región hipervariable V4 del gen ribosomal 16S. A su vez, en el día 10 se cuantificaron por qPCR algunos de los patógenos más comúnmente asociados con la DNT.



**FIGURA 4.1.** Esquema de la estrategia experimental del Capítulo IV. Este ensayo se realizó en dos períodos de parición del año (**primavera-2016** y **otoño-2017**).

## 4.5 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.5.1 Animales y diseño experimental

Tanto los animales como el diseño experimental de este capítulo fueron los descritos en el capítulo anterior (ver Capítulo III). Brevemente, se realizó un ensayo *in vivo* en dos instancias, una en invierno-primavera (**primavera-2016**) y otra en otoño (**otoño-2017**) de acuerdo con las épocas de parición de las vacas del tambo experimental de INIA-La Estanzuela. En cada instancia se

utilizaron 15 terneros que se criaron desde su nacimiento y se dividieron en tres grupos. Uno de los grupos fue tratado con la cepa *L. reuteri* TP1.3B, otro grupo con la cepa *L. johsonii* TP1.6 y el grupo control que recibió el vehículo estéril. Los terneros comenzaron el tratamiento con probióticos a los 5-8 días de vida, que consistió en la administración de una dosis oral diaria durante 10 días consecutivos de *ca.*  $2 \times 10^{10}$  UFC (día 0 a día 9) con la alimentación de la mañana. Para realizar el análisis de la microbiota y la cuantificación de patógenos se tomaron muestras de materia fecal directamente de la ampolla rectal los días 0, 10 y 21 y se procedió a guardar una parte a  $-80$  °C. Otra parte de las muestras (2 g) fue diluida en PBS frío (1:5), agitadas durante 5 minutos y centrifugadas durante 10 minutos a  $10.000 \times g$  para eliminar los residuos, las células bacterianas y eucariotas. El sobrenadante se guardó a  $-80$  °C hasta la extracción de ARN viral.

#### *4.5.2 Extracción de ADN y ARN*

Las muestras de heces se descongelaron a temperatura ambiente. La extracción de ADN microbiano total se realizó con el kit ZR Fecal DNA MiniPrep® (ZYMO Research, EEUU) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. La agitación se realizó con FastPrep-24® a 6 m/s durante 40 s y el ADN extraído se guardó a  $-20$  °C. La extracción de ARN viral se realizó con PureLink Viral RNA/DNA (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). El ADNc se sintetizó inmediatamente con el kit de retrotranscripción High Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fischer Scientific, EEUU) y se mantuvo a  $-20$  °C.

#### *4.5.3 Cuantificación de patógenos*

Para cuantificar patógenos comúnmente asociados con la DNT se realizó un abordaje utilizando el método de qPCR. Se tomaron muestras de heces, se extrajo el ADN y ARN total como se mencionó anteriormente y se cuantificó

rotavirus, coronavirus, *S. enterica*, *Cryptosporidium parvum* y algunos factores de virulencia de *E. coli* (*eae*: intimina, *Stx1*: toxina tipo Shiga 1, *clpG*: adhesina no fimbrial)

1. ***S. Typhimurium***. Los *primers* y protocolos se tomaron de Clark *et al.*, 2011 y para la cuantificación se utilizó una curva estándar construida con diluciones seriadas de ADN de un cultivo puro de *S. Typhimurium* (perteneciente al cepario del Dpto. de Microbiología del IIBCE).
2. Factores de virulencia de *E. coli*. Se diseñaron *primers* con el programa Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>) para el gen *clpG* a partir de secuencias disponibles en la base de datos del NCBI. Los *primers* y protocolos para los genes *Stx1* y *eae* se tomaron de la bibliografía (**TABLA 4.1**). Para la construcción de las curvas estándar se utilizó ADN genómico de cepas de *E. coli* que contenían estos factores de virulencia (Umpiérrez *et al.*, 2016).

Tanto para cuantificar *S. Typhimurium* como los factores de virulencia de *E. coli* se utilizó el kit Power SYBR Green Master Mix (Thermo Fischer Scientific, EE. UU) y los ciclados consistieron de un primer paso de desnaturalización y activación de la polimerasa a 95 °C por 10 min, luego 35 ciclos de 95 °C por 20 s, *annealing* por 30 s a la temperatura indicada en la **TABLA 4.1** y extensión a 60 °C por 30 s. Como último paso se realizó curva de *melting*. Se utilizó el equipo CFX96 (BioRad).

3. ***C. parvum*** se cuantificó utilizando *primers* y sonda diseñados por Guy *et al.* 2003. Para construir la curva estándar, se amplificó el fragmento *target* a partir una muestra positiva por ELISA para *C. parvum* (facilitada por Darío Caffarena de INIA-La Estanzuela) y se clonó en un plásmido. Los pasos para el clonado se especifican en el **Apéndice 1**.

4. **Rotavirus** y **coronavirus** fueron cuantificados en el Laboratorio de Virología Molecular del Centro Regional Norte en Salto a cargo del Dr. Rodney Colina. Los *primers* y sondas fueron tomados de la bibliografía como indica la **TABLA 4.1**. Las curvas estándar fueron construidas con el fragmento *target* clonado y se utilizó el equipo Rotor-Gene (QIAGEN, Alemania).

Para cuantificar *C. parvum*, coronavirus y rotavirus se utilizó el kit SensiFAST™ Probe No-ROX (Bioline, Inglaterra) y los ciclados consistieron en un primer paso de desnaturalización y activación de la polimerasa a 95 °C por 5 minutos, luego 40 ciclos de 95 °C por 15 s, *annealing* por 30 s a la temperatura indicada en la **TABLA 4.1** y extensión a 60 °C por 30 s.

**TABLA 4.1.** Secuencias de *primers* utilizadas para la cuantificación de patógenos asociados a la DNT.

Patógeno	Target	Primers	Concentración	Annealing	Referencia
<i>E. coli</i>	<i>clpG</i>	TCT GCT GGC CTG TTT TCC TA	600 nM	51 °C	Este trabajo
		CTG ATG CTG CGT CTT TAC CC	600 nM		
	<i>Stx1</i>	GTC ACA GTA ACA AAC CGT AAC A	600 nM	51 °C	Jothikumar & Griffiths, 2002
		TCG TTG ACT ACT TCT TAT CTG GA	600 nM		
	<i>eae</i>	CGG CGA TTA CGC GAA AGA	400 nM	56 °C	Oh <i>et al.</i> , 2014
		CCT AAA TTT GCC GTA AAG CGG	400 nM		
<i>S. typhimurium</i>	<i>invA</i>	TAT GCC CGG TAA ACA GAT GAG	500 nM	59 °C	Clark <i>et al.</i> , 2011
		GTA TAA GTA GAC AGA GCG GAG G	500 nM		
<i>C. parvum</i>	COW	CAA ATT GAT ACC GTT TGT CCT TCTG	600 nM	60 °C	Guy <i>et al.</i> , 2003
		GG CAT GTC GAT TCT AAT TCA GCT	600 nM		
		HEX-TGCCATACATTGTTGTCCTGACAAATTGAAT-BHQ1	200 nM		
Coronavirus	Región S	TGT TTT AAA GCT TCC ACA AAT TTC TG	400 nM	50 °C	Castells <i>et al.</i> , 2019
		AAC CAG CAT CTA TAC CAG GAC CAT	400 nM		
		Cy5-CGTGTA AATTGGATGGGTCTTTGTGTGTAGGT-BHQ1	200 nM		
Rotavirus	NSP3	ACC ATC TWC ACR TRA CCC TCT ATG AG	400 nM	60 °C	Zeng <i>et al.</i> , 2008
		GGT CAC ATA ACG CCC CTA TAG C	400 nM		
		FAM-AGT TAAAAGCTAACACTGTCAAA-BHQ1	200 nM		

#### 4.5.4 Secuenciación masiva de 16S rRNA y procesamiento

##### *de datos*

El análisis de la comunidad bacteriana de las heces se realizó mediante la secuenciación masiva pareada de la región V4 del gen ADNr 16S. La preparación de la biblioteca y la secuenciación se realizó en el Centro de Secuenciación y Análisis Genómico de la Universidad de Austin (UT GSAF, Texas, EEUU) en una plataforma Illumina MiSeq para generar lecturas pareadas de 250 bases de longitud en cada dirección. Los datos generados se procesaron con el paquete `{dada2}` de R (Callahan *et al.*, 2016b) siguiendo el *pipeline* presentado en el repositorio de GitHub del paquete <https://benjjnn.g.gubub.io/dada2/tutorial.html> y en Callahan *et al.* (2016a). En resumen, las lecturas se filtraron y ajustaron utilizando los parámetros recomendados de `dada2` (es decir, un umbral máximo de error esperado de 2 nucleótidos combinado con el recorte de 10 nucleótidos en cada extremo). Se definieron las *Amplicon Sequence Variants* (ASV) y, después de eliminar las quimeras (función `removeBimeraDenovo`), se asignó taxonomía con la base de datos de Silva (versión 132). Las ASVs, a diferencia de las OTUs se asignan a secuencias con un 100% de similitud en vez de 97%. Esto se puede realizar porque en `dada2` existe un paso de aprendizaje de errores de secuenciación que se utiliza para predecir las ASVs. Se eliminaron las ASVs con menos de 10 lecturas en total y, cuando el análisis lo requería, los conteos se normalizaron mediante el cálculo de abundancias relativas. Se utilizó `{DECIPHER}` para realizar alineaciones múltiples (Wright, 2015) y el paquete `{phangorn}` de R (Schliep, 2011) para construir un árbol filogenético con los parámetros recomendados en Callahan *et al.*, (2016a).

#### 4.5.5 Visualización de datos y análisis estadísticos de datos de la secuenciación de 16S rRNA.

Se utilizó el paquete `{phyloseq}` de R (McMurdie y Holmes, 2013) para visualizar y analizar los datos de secuenciación. Con este paquete se construyeron los gráficos de barra, *Non-metric multidimensional scaling* (NMDS) y *heatmaps* a partir de la matriz de distancias construida con el método de Bray-Curtis. También se calcularon matrices de distancia utilizando los métodos de Jaccard (presencia/ausencia), UniFrac y Weighted-UniFrac para construir gráficos de NMDS. Tanto UniFrac como Weighted-UniFrac incorporan las distancias filogenéticas para el cálculo de distancias y, a su vez, Weighted-UniFrac pondera las abundancias. Este paquete utiliza el NMDS como método de agrupamiento para la construcción de *heatmaps* (Rajaram & Oono, 2010). La función `NbClust` (con el método de *k-means*) se utilizó para determinar el mejor número de *clusters* utilizando la matriz de distancias y esta división se marcó sobre alguno de los gráficos de NMDS. Se utilizó la función `estimate_richness` para calcular los parámetros de diversidad alfa, implementado en `{phyloseq}` con funciones del paquete `{vegan}` (Oksanen *et al.*, 2019). Se realizaron análisis de varianza con permutaciones (PERMANOVA) utilizando la función `adonis` del paquete `{vegan}` y la matriz de distancias calculada con el método de Bray-Curtis para evaluar el efecto del tratamiento, tiempo e instancia del ensayo (año) en la comunidad bacteriana. A su vez, se utilizaron las funciones `betadisper` y `permutest` de `{vegan}` para chequear que la dispersión dentro de un mismo grupo no fuera significativa. Se determinaron abundancias diferenciales con el paquete `DESeq2` (Love *et al.*, 2014). Se utilizó PICRUST2 para inferir el perfil funcional de las muestras (<https://github.com/picrust/picrust2>).

#### 4.5.6 Análisis estadísticos de otro tipo de datos

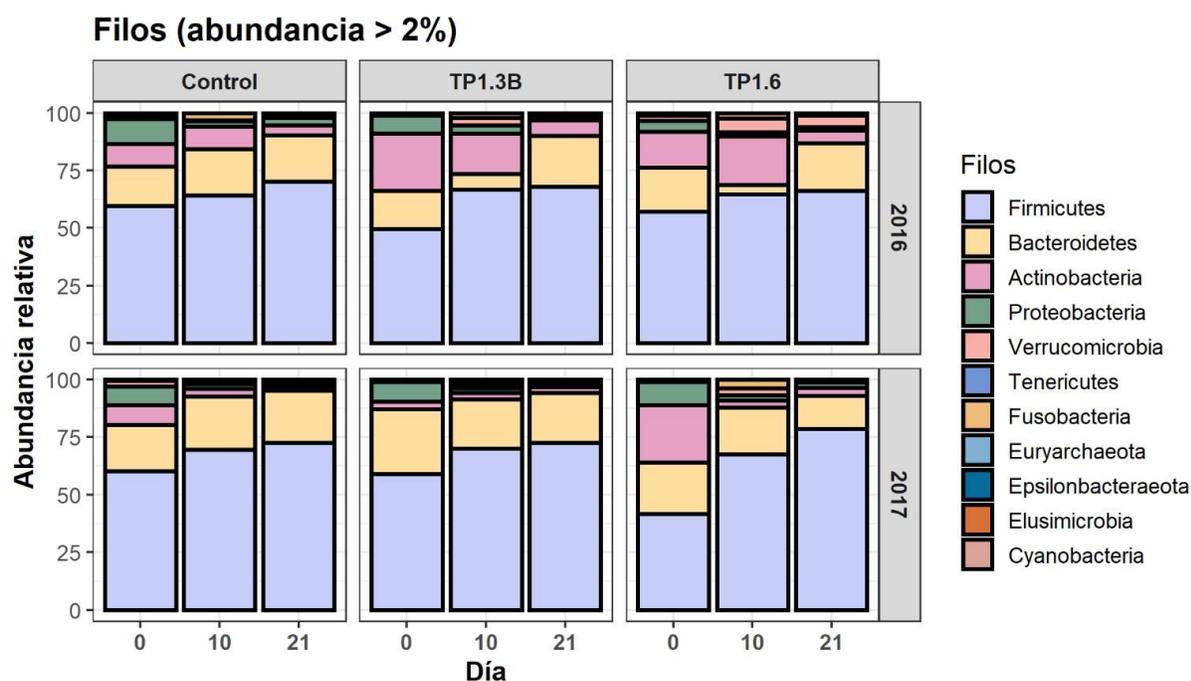
Los índices de diversidad alfa y la abundancia de patógenos entre cada grupo tratado y el control se compararon utilizando el test de Kruskal-Wallis. La abundancia de cada filo bacteriano a lo largo del tiempo fue comparada con Kruskal-Wallis y Mann-Whitney como test post-hoc. Además de comparar la abundancia de cada patógeno, los datos se convirtieron a presencia/ausencia y fueron comparados con el test de Chi<sup>2</sup>. En todos los casos el umbral de *p* se fijó en 0,05.

## 4.6 RESULTADOS

---

### 4.6.1 Descripción general de la microbiota bacteriana

La microbiota fecal de 30 terneros en tres tiempos diferentes se caracterizó por la secuenciación de la región V4 del ADNr 16S. Después de filtrar por calidad y tamaño y eliminar el ruido y quimeras, se mantuvo el 83,33% de las lecturas iniciales, dejando en promedio 14.841 ( $\pm$  3.429) secuencias por muestra. Se filtraron los ASVs que estaban en baja proporción y se obtuvieron en total 1539 ASVs diferentes. Un 24,8% de las ASVs no pudieron ser clasificadas a nivel de género. En general, los géneros más abundantes en todas las muestras fueron *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Blautia*, *Faecalibacterium*, *Collinsela*, *Subdoligranulum*, *Bifidobacterium* y *Escherichia/Shigella*. Los filos más abundantes fueron Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria, que en conjunto representaron desde el 74 al 99% de la microbiota bacteriana total (**FIGURA 4.2**). En la **TABLA 4.2** se muestran los cinco filos más abundantes con sus respectivas abundancias y los resultados de la comparación de las abundancias en los distintos tiempos. Se pudieron observar cambios en la abundancia de algunos filos con el tiempo, como por ejemplo el aumento de Firmicutes y la disminución de Proteobacteria.



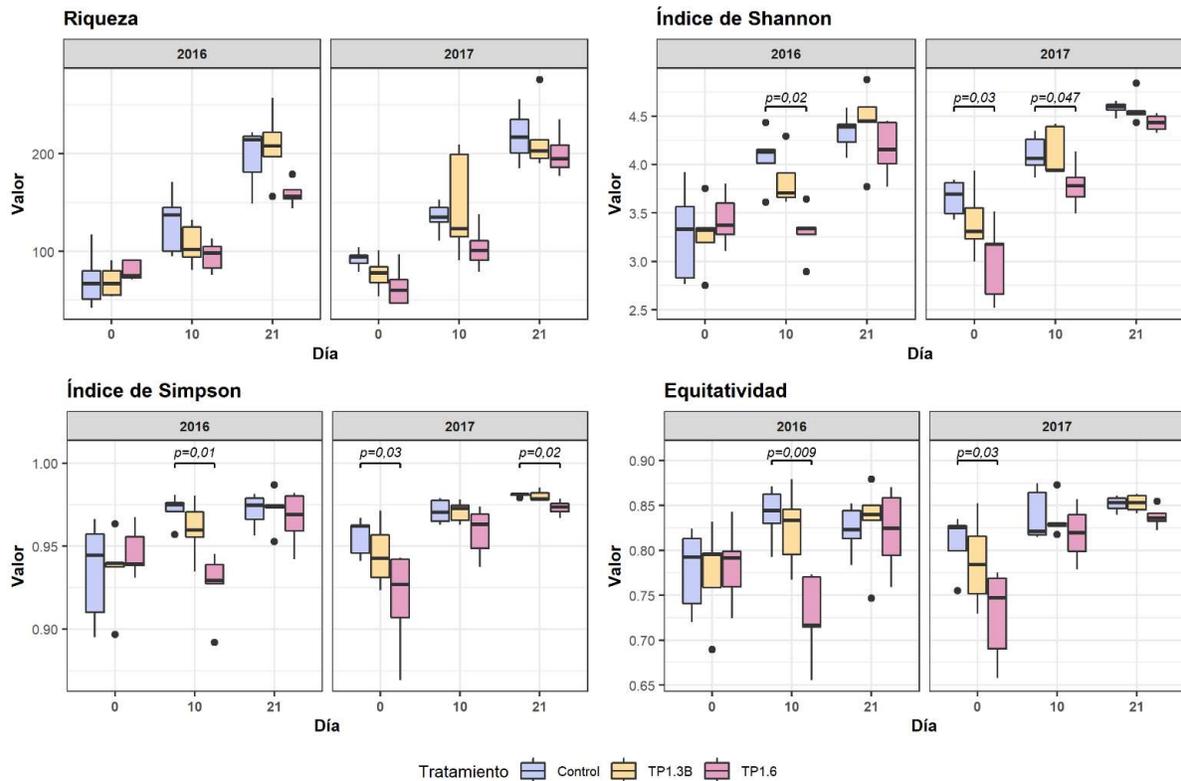
**FIGURA 4.2.** Abundancia relativa de filios bacterianos que se encontraron en una proporción mayor al 2% separado por tratamientos e instancias del ensayo.

**TABLA 4.2.** Abundancias relativas (en porcentaje) de los 5 filios bacterianos más abundantes. Se presentan los promedios y el desvío estándar entre paréntesis. Letras distintas en una misma fila indican valores significativamente diferentes por el test de Mann-Whitney.

		Día 0	Día 10	Día 21
2016	Actinobacteria	16,7 · (10,2) <sup>ab</sup>	16,3 · (15,7) <sup>a</sup>	5,6 · (15,7) <sup>b</sup>
	Bacteroidetes	17,5 · (7,8) <sup>ac</sup>	10,3 · (9,7) <sup>b</sup>	20,9 · (7,8) <sup>c</sup>
	Firmicutes	55,5 · (9,0) <sup>a</sup>	65,2 · (12,1) <sup>b</sup>	68,1 · (13,7) <sup>b</sup>
	Proteobacteria	7,8 · (5,0) <sup>a</sup>	2,5 · (2,9) <sup>b</sup>	2,0 · (2,4) <sup>b</sup>
	Verrucomicrobia	1,2 · (2,1) <sup>a</sup>	3,2 · (6,2) <sup>a</sup>	2,0 · (6,0) <sup>a</sup>
2017	Actinobacteria	12,2 · (14,2) <sup>a</sup>	3,06 · (1,7) <sup>a</sup>	2,5 · (2,2) <sup>a</sup>
	Bacteroidetes	23,5 · (13,0) <sup>a</sup>	21,5 · (5,6) <sup>a</sup>	19,7 · (5,7) <sup>a</sup>
	Firmicutes	53,6 · (13,8) <sup>a</sup>	69,2 · (8,3) <sup>b</sup>	74,4 · (5,4) <sup>c</sup>
	Proteobacteria	9,0 · (8,0) <sup>a</sup>	2,1 · (1,1) <sup>b</sup>	1,85 · (0,9) <sup>b</sup>
	Verrucomicrobia	1,3 · (2,2) <sup>a</sup>	1,7 · (2,4) <sup>a</sup>	0,028 · (0,03) <sup>b</sup>

### 4.6.2 Diversidad alfa

La riqueza, los índices de Shannon, Simpson y equitatividad se calcularon y analizaron como descriptores de comunidad (**FIGURA 4.3**). No hubo diferencias significativas en la riqueza entre los grupos tratados y el grupo control. El grupo tratado con TP1.3B no mostró diferencias significativas con el control en ninguno de los parámetros mientras que el grupo tratado con TP1.6 mostró diferencias en algunos tiempos. Por un lado, en la instancia de primavera-2016, el grupo que recibió TP1.6 mostró en el día 10 valores más bajos de los índices de Simpson, Shannon y equitatividad. Por otro lado, en otoño-2017, en el día 0 este grupo presentó menores índices de Shannon, Simpson y equitatividad, en el día 10 presentó menor valor de índice de Shannon y en el día 21 presentó menor valor de índice de Simpson.



**FIGURA 4.3.** Valores de Riqueza, índice de Shannon, índice de Simpson y Equitatividad calculados por tiempo, tratamiento e instancia del ensayo.

### 4.6.3 Diversidad beta-PERMANOVA

Se utilizó PERMANOVA para determinar cuáles variables aportaron de forma significativa a la composición de las comunidades bacterianas de la microbiota fecal. El tratamiento, el día, la instancia del ensayo (Año) y las interacciones dobles fueron significativas (**TABLA 4.3**). Luego, los datos se separaron por instancia (Año), por día y por tratamiento para comparar de forma pareada las comunidades bacterianas de cada tratamiento con el grupo control. En la **FIGURA 4.4** se presenta un resumen de las diferencias estadísticamente significativas de este análisis. Los resultados mostraron que la comunidad bacteriana fue significativamente diferente entre ambas instancias ( $p = 0,001$ ) y esta diferencia también se observó cuando se compararon los diferentes tiempos por separado. En primavera-2016, se observaron diferencias significativas entre el grupo TP1.6 y el grupo control en los días 10 y 21. En cuanto al grupo TP1.3B, los valores de  $p$  estuvieron muy cerca del umbral establecido, pero no fueron significativos ( $p = 0,06$ ). En otoño-2017, se encontraron diferencias en el día 21 entre el grupo TP1.3B y el grupo de control, y una tendencia a presentar diferencias significativas entre el grupo TP1.6 y el grupo control ( $p = 0,1$ ) No se encontraron diferencias al comparar las comunidades en el día 0. Por otro lado, cada grupo presentó diferencias significativas a lo largo del tiempo. En ningún caso la dispersión de los datos fue significativa (datos no mostrados).

**TABLA 4.3.** Variables explicativas utilizadas para el análisis de PERMANOVA de las comunidades bacterianas y su significancia.

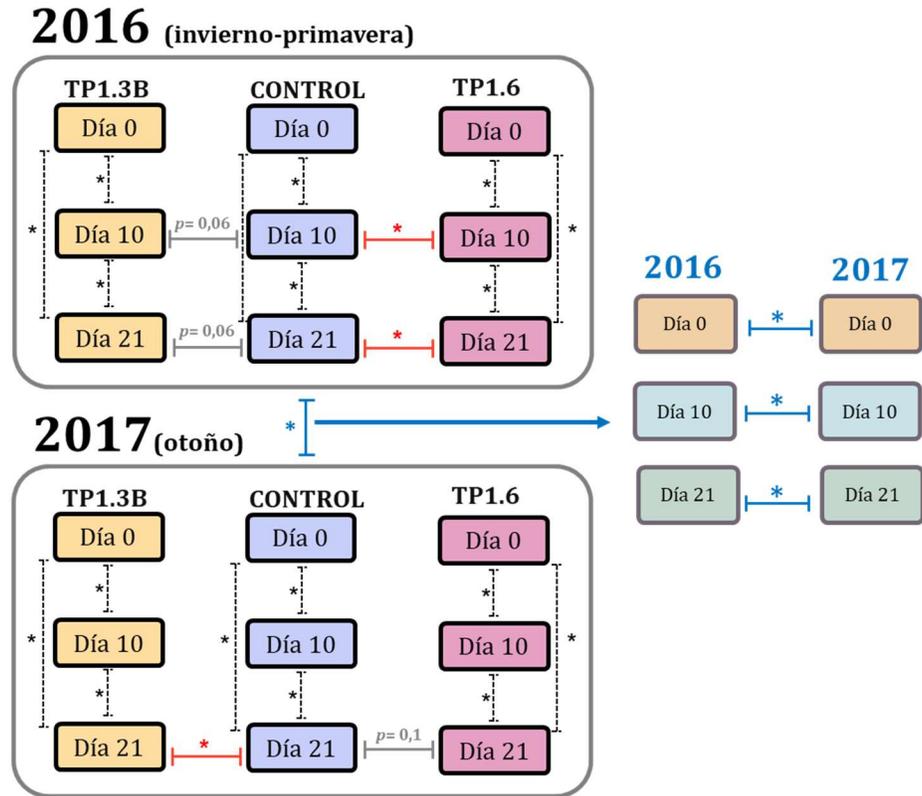
Variable	$p$ -valor
Tratamiento	0,031*
Día	0,001*
Año	0,001*
Tratamiento:Día	0,014*

Tratamiento:Año	0,034*
Día:Año	0,001*
Tratamiento:Día:Año	0,098

#### *4.6.4 Diversidad beta- Métodos de reducción dimensional*

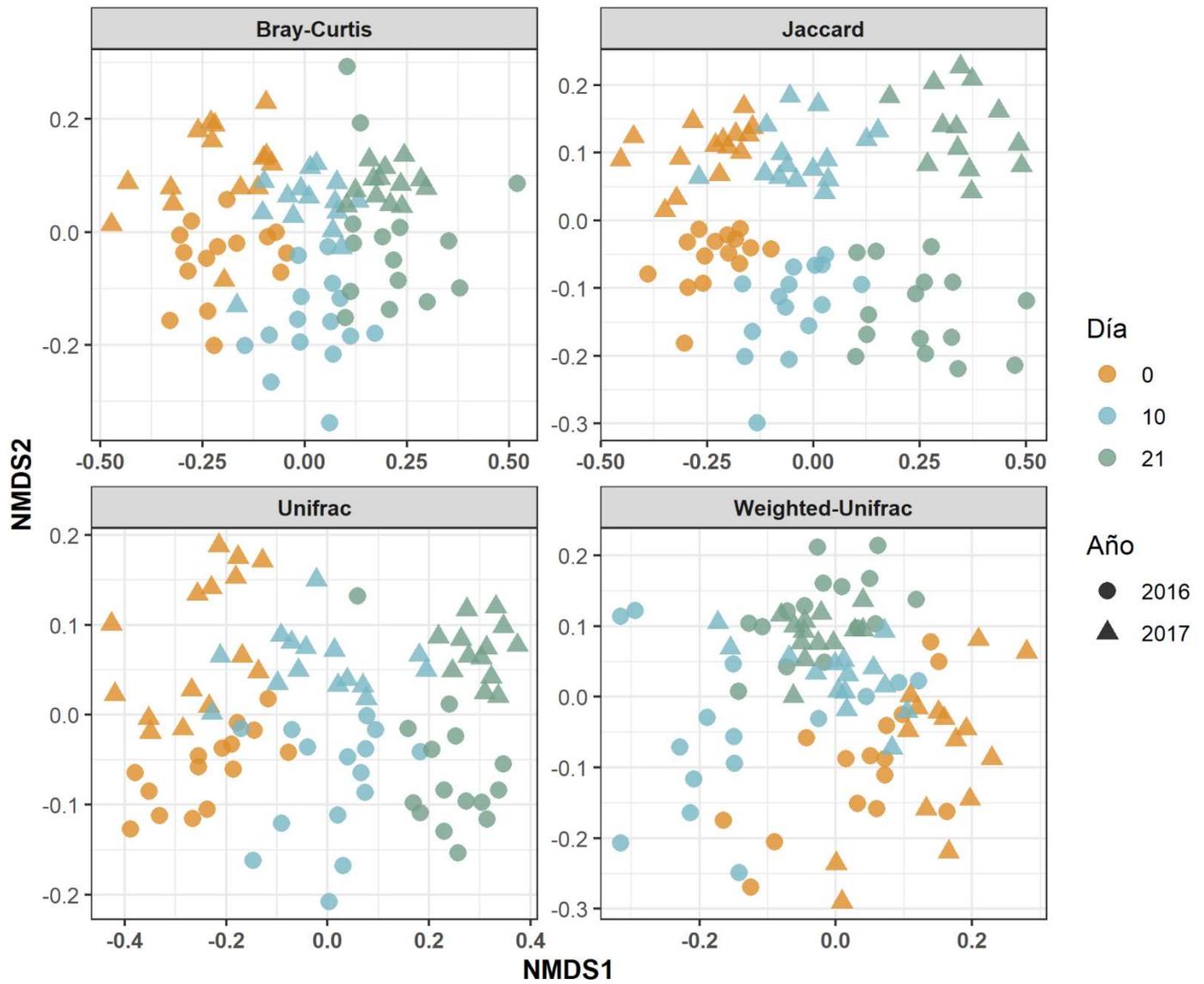
Los gráficos de NMDS mostraron que las comunidades bacterianas tendieron a agruparse por día y año utilizando distintos métodos de cálculo de distancia (**FIGURA 4.5**). Luego, las muestras fueron separadas por año para comparar las comunidades de ambos grupos tratados con el control, utilizando el cálculo de distancia Bray-Curtis (**FIGURAS 4.6 y 4.7**). En estos casos también se pudo una clara separación según los días de muestreo y al analizar los días por separado no se observaron agrupamientos claros por tratamiento (datos no mostrados).

Los *heatmaps* fueron construidos con NMDS como método de agrupamiento, por eso en la figura no se observan *clusters* de tipo jerárquico. Se puede observar que en ambas instancias las muestras se agruparon por día, siendo más claro el agrupamiento del día 21 (**FIGURA 4.8 Y 4.9**). Ciertos géneros presentes en las muestras del día 21 estaban ausentes o en muy baja abundancia en el día 0 y el día 10.

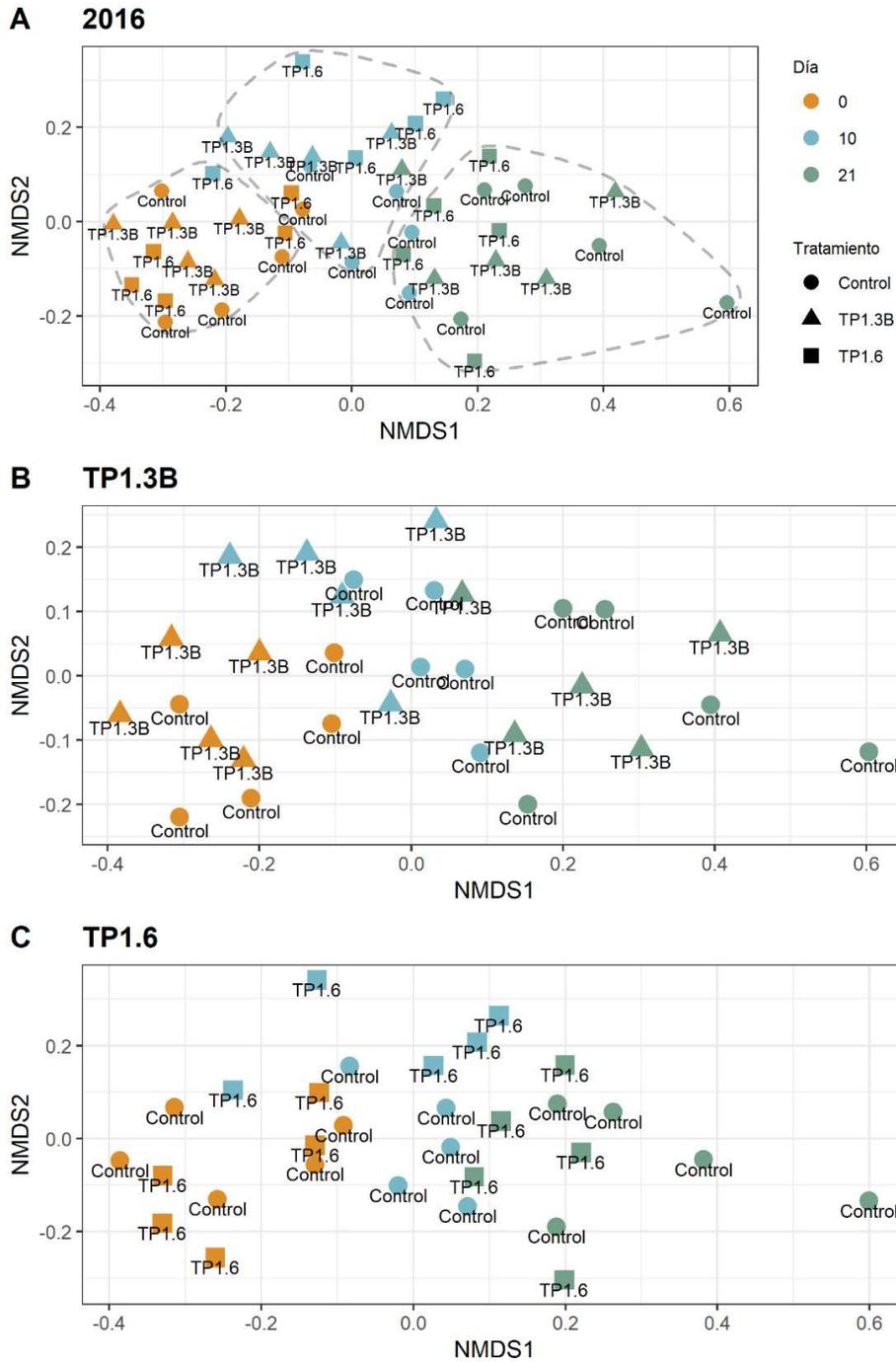


**FIGURA 4.4.** Esquema que resume las comparaciones pareadas que mostraron diferencias significativas con el análisis de PERMANOVA. Se comparó por un lado la composición de la comunidad microbiana total entre ambas instancias, la composición de la microbiota de cada grupo tratado en cada día vs. el grupo control y entre los distintos días dentro de un mismo grupo.

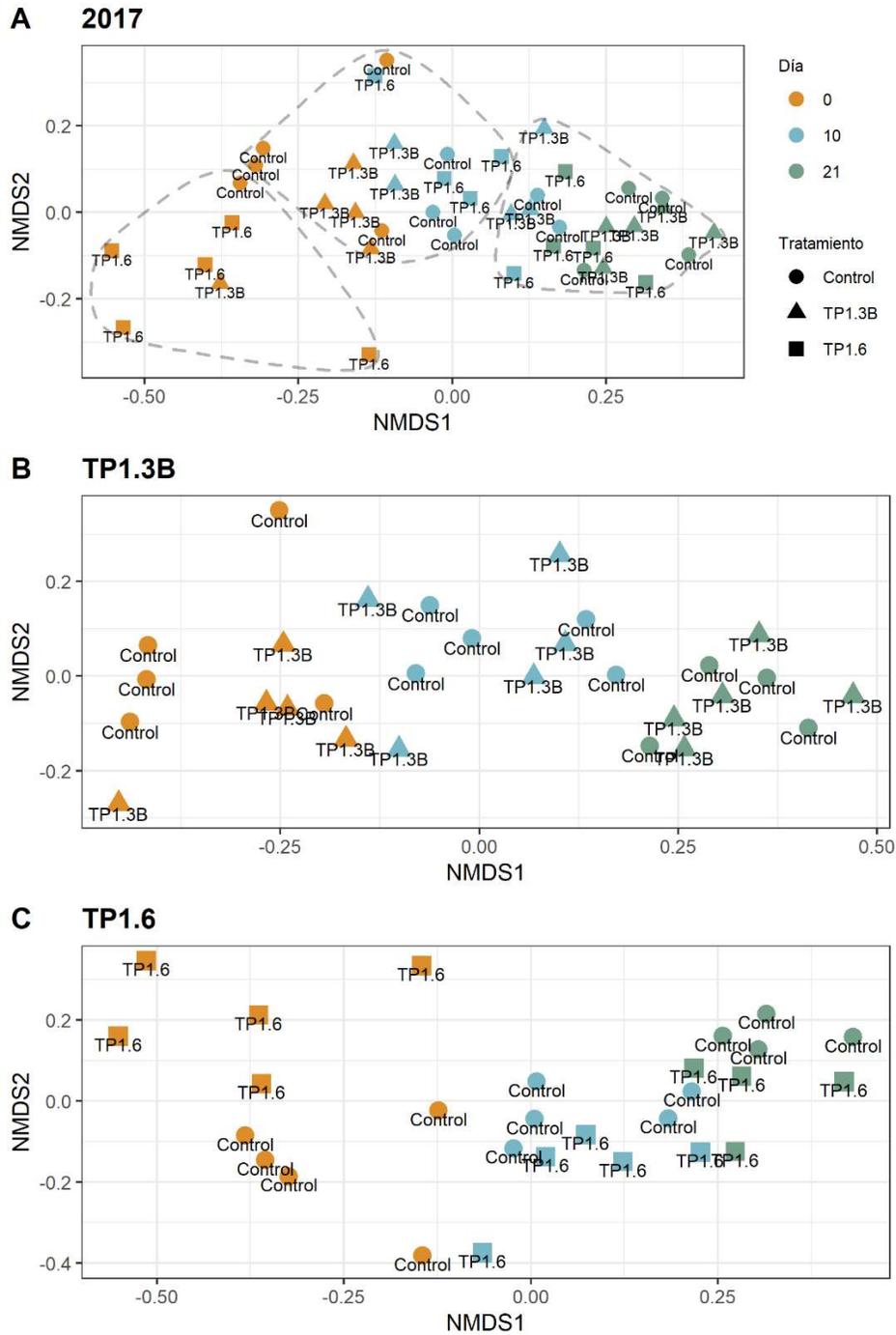
### NMDS utilizando diferentes distancias



**FIGURA 4.5.** Gráficos de NMDS de las comunidades bacterianas de todas las muestras utilizando diferentes medidas de distancia. Para el método de distancia de Jaccard las abundancias de las ASVs se transformaron a presencia/ausencia.



**FIGURA 4.6.** Gráficos de NMDS de las comunidades bacterianas de las muestras de la instancia primavera-2016. (A) Se observan las comunidades de todas las muestras obtenidas en esta instancia y las líneas punteadas abarcan los mejores agrupamientos según el método de *k-means*. (B) Se observan los datos de los animales tratados con TP1.3B vs. los animales del grupo control. (C) Se observan los datos de los animales tratados con TP1.6 vs. los animales del grupo control.



**FIGURA 4.7.** Gráficos de NMDS de las comunidades bacterianas de las muestras de otoño-2017. (A) Se observan las comunidades de todas las muestras obtenidas en esta instancia y las líneas punteadas abarcan los mejores agrupamientos según el método de *k-means*. (B) Se observan los datos de los animales tratados con TP1.3B vs. los animales del grupo control. (C) Se observan los datos de los animales tratados con TP1.6 vs. los animales del grupo control.

2016

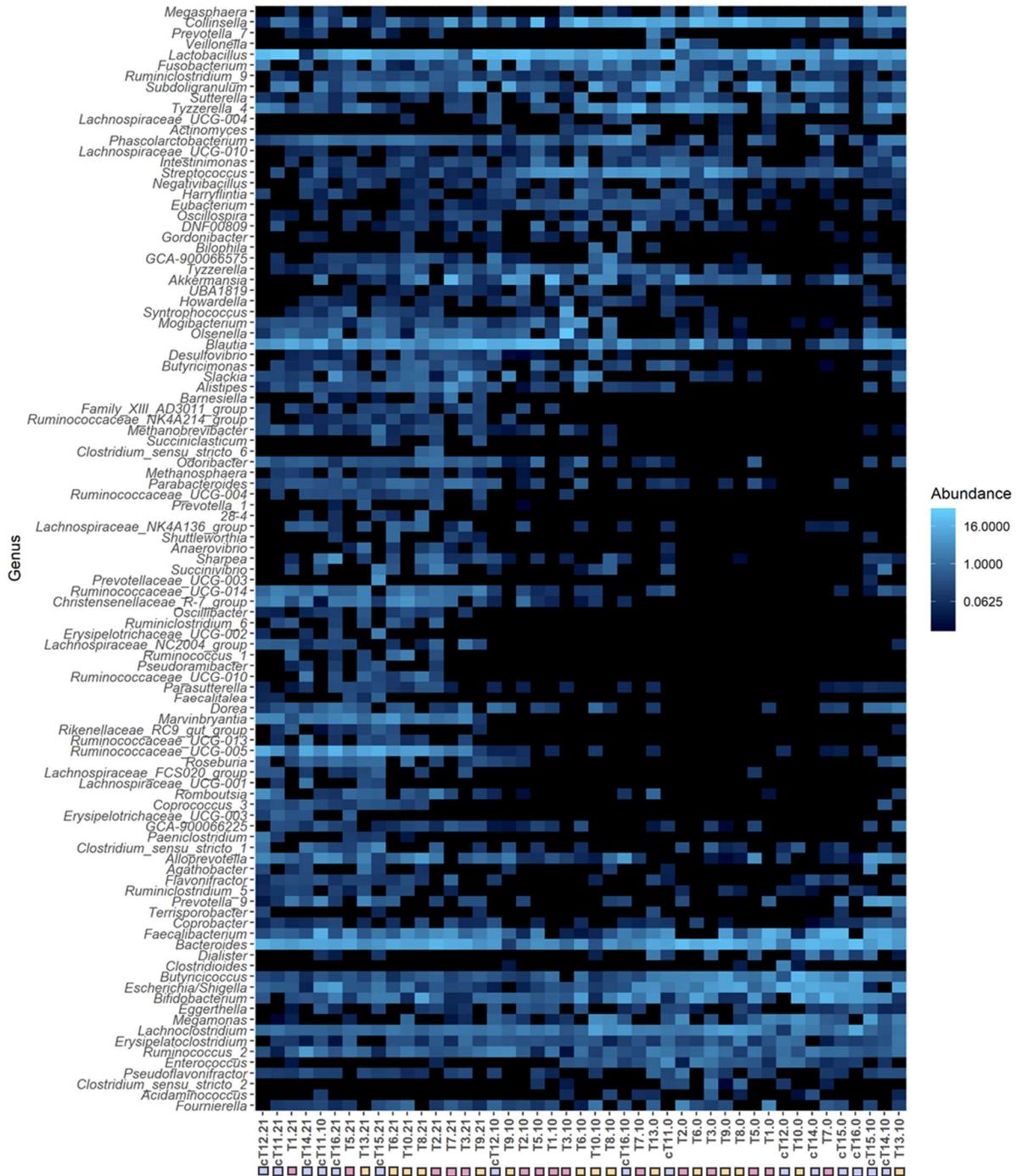


FIGURA 4.8. Heatmap de las muestras obtenidas en primavera-2016. Se observa un agrupamiento de las muestras por tiempo. Control: □ TP1.3B: □ TP1.6: □ Cada muestra tiene un código asociado que indica el número del animal al principio y luego el día de toma de muestra. Por ejemplo “T1.21” refiere el animal 1 en el día 21. A su vez los animales del grupo control presentan la letra “c” adelante..

2017

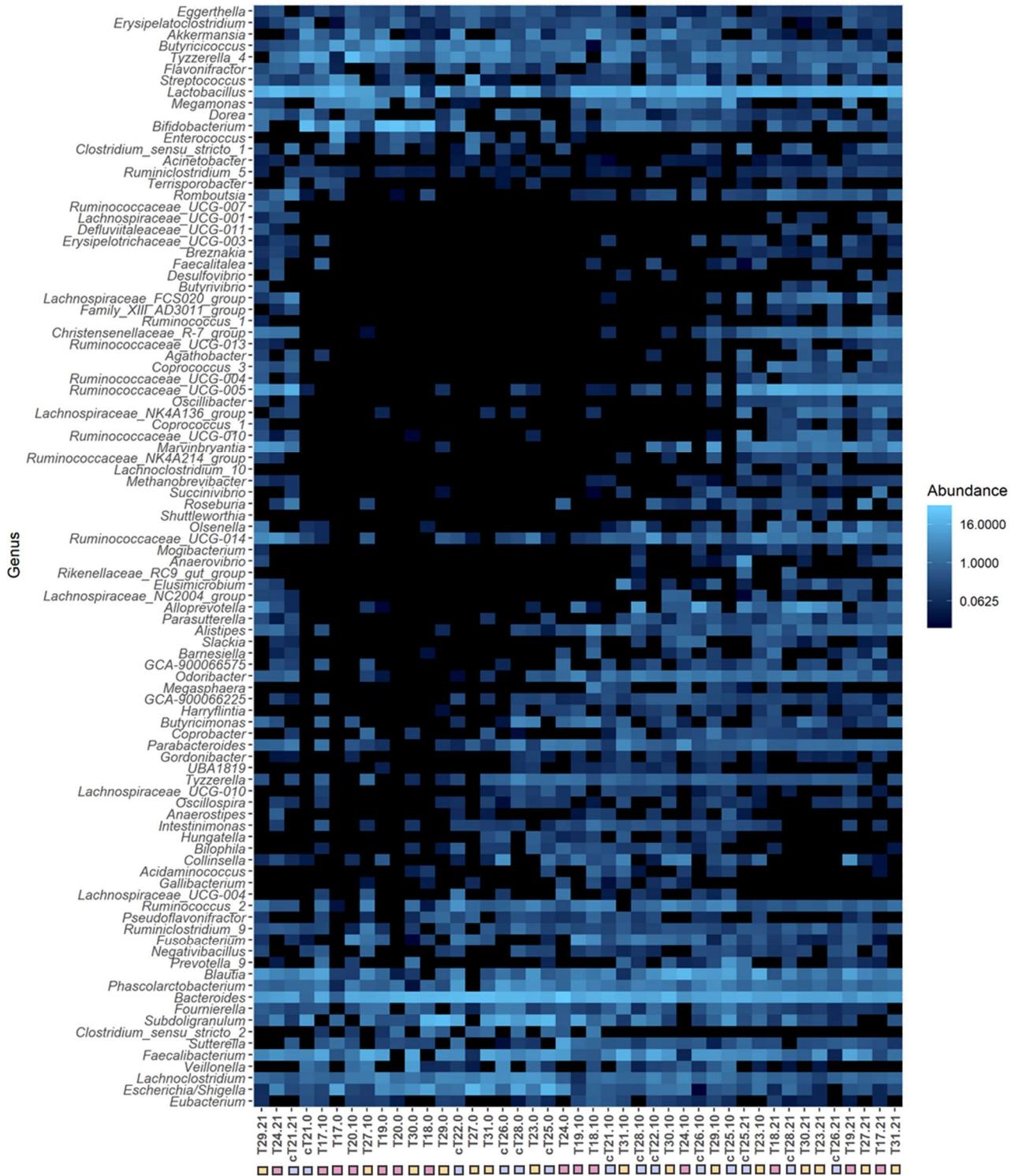
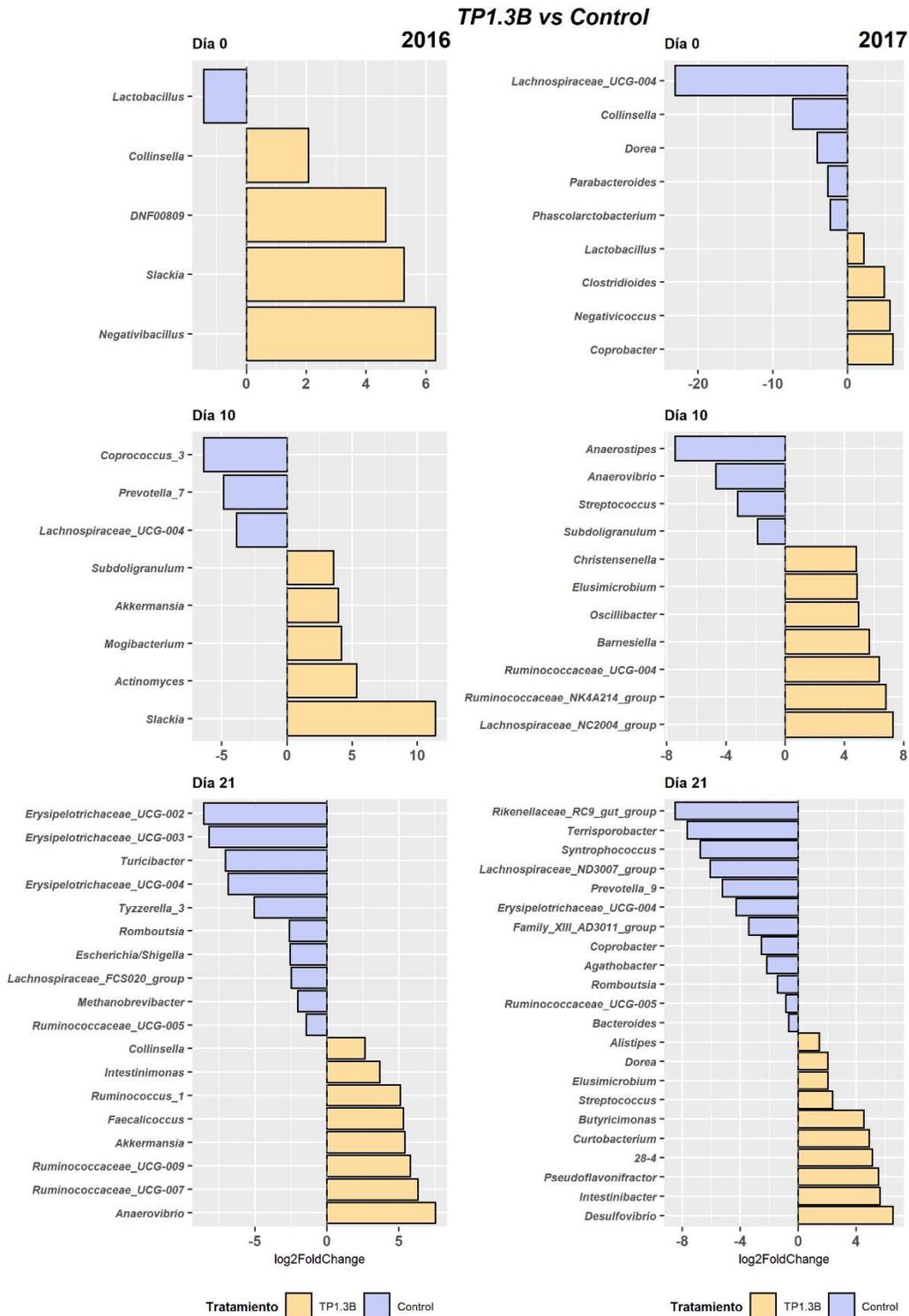


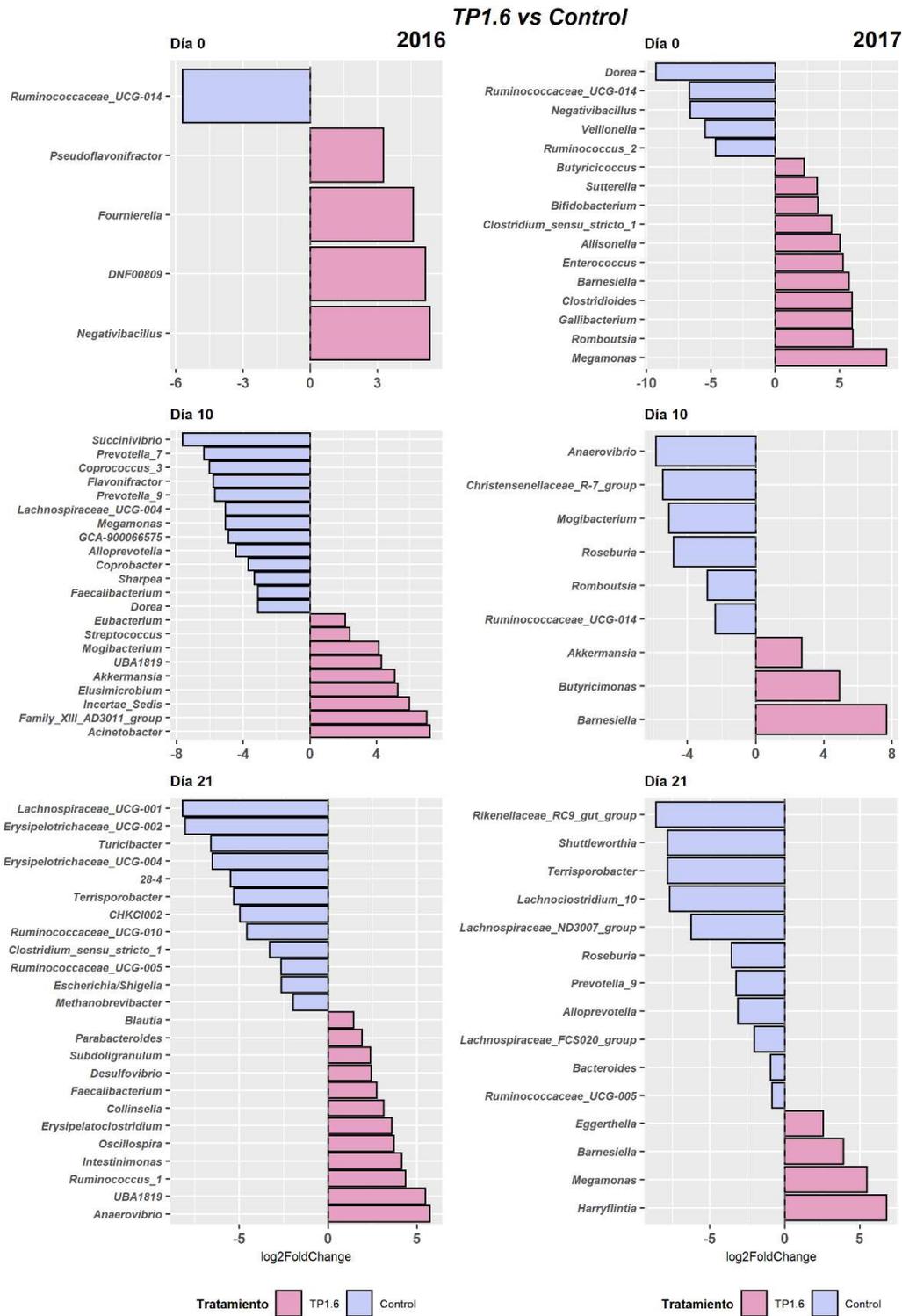
FIGURA 4.9. Heatmap de las muestras obtenidas en otoño-2017. Se observa un agrupamiento de las muestras por tiempo. Control: □, TP1.3B: ■ y TP1.6: ■. Los códigos de los nombres de las muestras se explican en la figura 4.8

#### 4.6.5 Cambios específicos en las comunidades

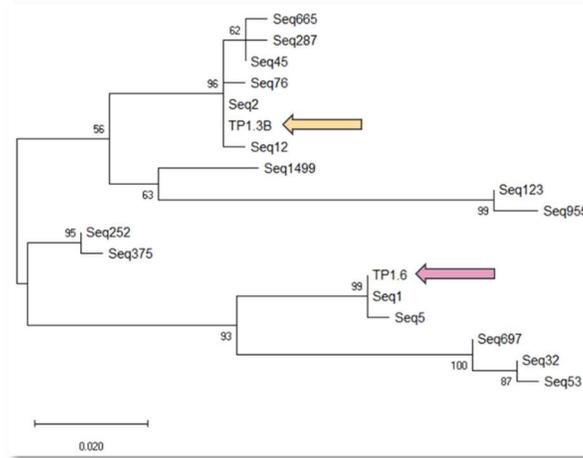
Con el paquete {DESeq2} se analizaron las diferencias en abundancias relativas de los géneros bacterianos presentes en las distintas muestras. Se comparó cada tratamiento con el control en los diferentes días y cada instancia por separado. Se observaron varios cambios en la composición microbiana entre los grupos tratados y los grupos de control en diferentes días. Dentro de los cambios más relevantes, se encontró que el género *Escherichia/Shigella* fue más abundante en el grupo control en comparación con ambos tratamientos en el día 21 de primavera-2016, pero esto no se observó en otoño-2017 (**FIGURAS 4.10 y 4.11**). No hubo diferencias en la abundancia relativa del género *Lactobacillus* asociado a la administración de probióticos. Se encontraron 16 ASVs distintas que pertenecieron a este género y se construyó un árbol filogenético con estas secuencias para determinar cuáles podrían ser similares a las secuencias de las cepas administradas (**FIGURA 4.12**). Se determinó que las Seq1 y Seq2 presentaron un 100% de homología con las cepas TP1.6 y TP1.3B, respectivamente. Se analizó la abundancia relativa de estas dos ASVs en el tiempo. Se determinó que en otoño-2017 el grupo administrado con la cepa TP1.6 presentó un aumento significativo de la abundancia relativa de la Seq1 al comparar el día 0 con el día 21. A su vez, el grupo tratado con la cepa TP1.3B, en esa misma instancia, presentó un aumento significativo en la abundancia relativa de la Seq2 en el día 21 comparado con el día 0. El grupo control no presentó diferencias en la abundancia relativa de estas dos ASVs a lo largo del tiempo (**FIGURA 4.13**). Por otro lado, con {DESeq2} se compararon todas las muestras del día 0 con el día 21 de forma de determinar si hubo cambios asociados con la edad y desarrollo de los terneros. Se observó que en el día 0 hubo mayor abundancia de anaerobios facultativos y en el día 21 se observó un aumento de géneros bacterianos y de arqueas asociados a la actividad ruminal (**FIGURA 4.14**).



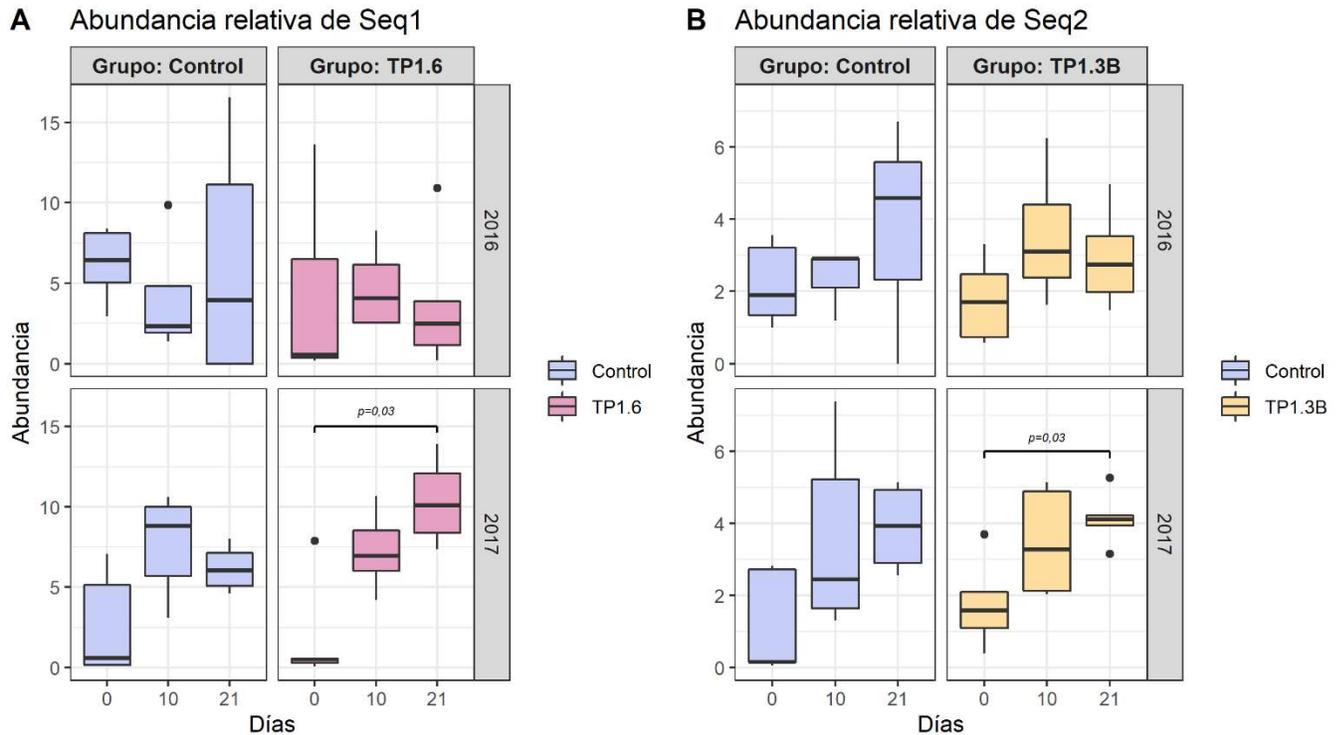
**FIGURA 4.10.** Abundancias diferenciales de géneros bacterianos calculado con el paquete {DESeq2} comparando el grupo tratado con la cepa TP1.3B y el grupo control en ambas instancias por separado. Un valor negativo de  $\log_2\text{FoldChange}$  significó que ese género fue significativamente más abundante en el grupo control que en el tratado y viceversa.



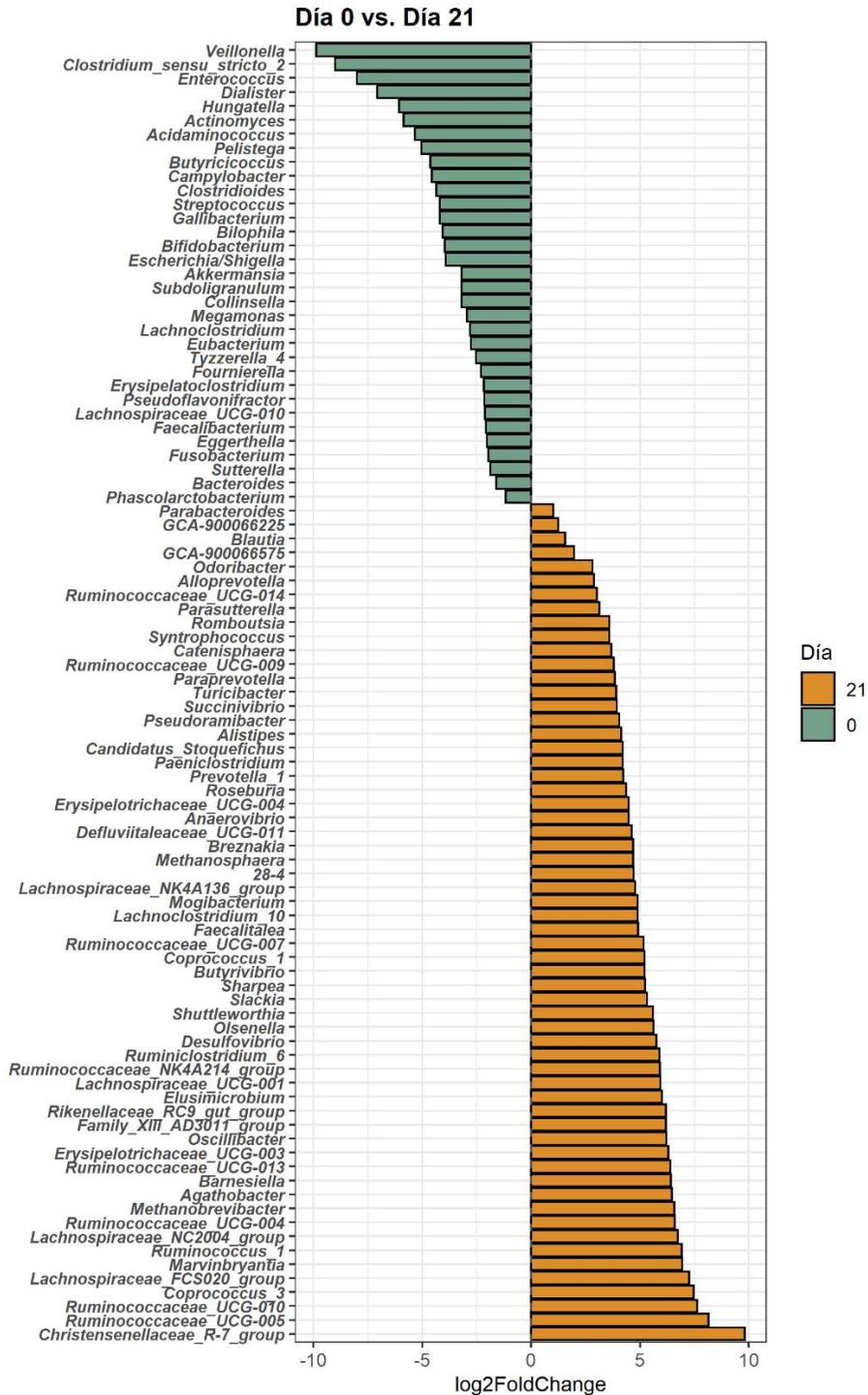
**FIGURA 4.11.** Abundancias diferenciales de géneros bacterianos calculado con el paquete {DESeq2} comparando el grupo tratado con la cepa TP1.6 y el grupo control en ambas instancias por separado. Un valor negativo de  $\log_2\text{FoldChange}$  significó que ese género fue significativamente más abundante en el grupo control que en el tratado y viceversa.



**FIGURA 4.12.** Análisis filogenético molecular de las ASVs pertenecientes al género *Lactobacillus* y las secuencias de las cepas administradas. Se utilizó el método de máxima verosimilitud basado en el modelo Kimura de 2 parámetros. Se muestra el árbol consenso de un *bootstrap* de 500 repeticiones. Las ramas cuyos valores de *bootstrap* fueron menores al 55% se colapsaron.



**FIGURA 4.13.** Abundancia relativa de las ASV Seq1 y Seq2. La abundancia de la Seq1 se evaluó en el grupo control y el grupo tratado con TP1.6 (A). La abundancia de la Seq2 se evaluó en el grupo control y el grupo tratado con TP1.3B(B).

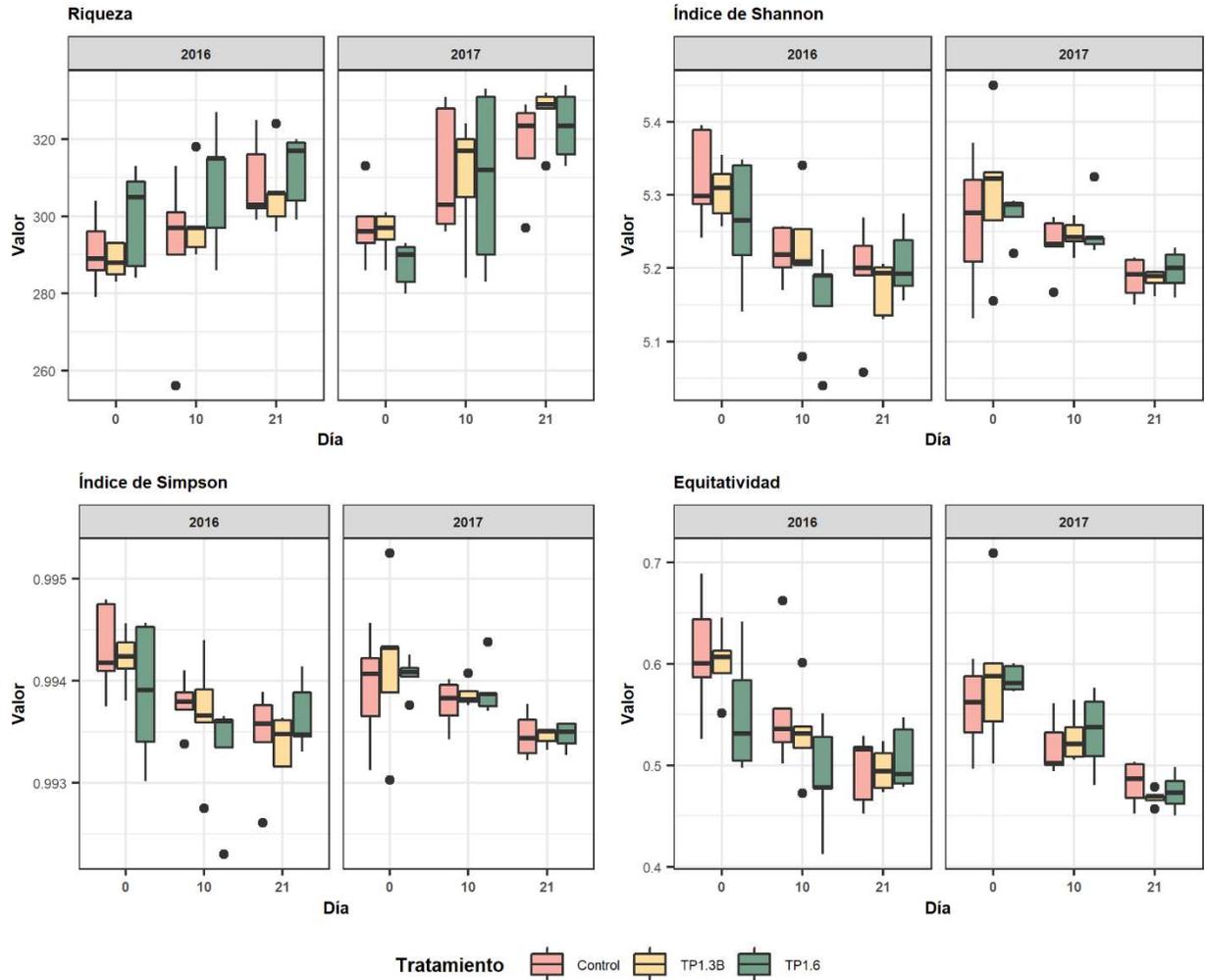


**FIGURA 4.14.** Abundancias diferenciales de géneros bacterianos calculado con el paquete {DESeq2} entre las comunidades bacterianas obtenidas en el día 0 vs. día 21. Se incluyeron las muestras de ambas instancias. Un valor negativo de  $\log_2$ FoldChange significó que ese determinado género fue significativamente más abundante en el día 0 y un valor positivo significa que fue más abundante en el día 21.

#### *4.6.6 Perfil funcional*

Con la herramienta PICRUSt2 se construyeron perfiles funcionales para cada muestra. Estos perfiles están constituidos por vías metabólicas que podrían estar presentes en cada muestra y su abundancia correspondiente. En total se describieron 575 vías metabólicas. Los datos fueron analizados con PERMANOVA e indicadores de diversidad alfa, similar a como si fueran datos de composición taxonómica. Con respecto a los índices de diversidad, los tratamientos no presentaron diferencias significativas con el grupo control. Se pudo observar una tendencia a aumentar la riqueza con el tiempo y a disminuir los índices de Shannon, Simpson y equitatividad (**FIGURA 4.15**). Los resultados de PERMANOVA mostraron que existieron diferencias significativas entre ambas instancias y los diferentes días, pero no hubo diferencias significativas entre los tratamientos y el control (**TABLA 4.4**). Los análisis pareados mostraron que en general hubo diferencias en los diferentes días y no hubo diferencias entre los grupos tratados y el grupo control salvo por el grupo TP1.6 al día 21 en otoño-2017. Los datos presentaron una gran variabilidad y por eso hubo casos en los que la significancia no se logró determinar ya que, si bien el PERMANOVA fue significativo, la dispersión entre las muestras dentro de un mismo grupo también lo fue, dificultando su interpretación (marcado con el signo “?” en la **FIGURA 4.16**). Con los gráficos de NMDS se pudo determinar que, al igual que con los datos de composición, las muestras se agruparon por día y se distingue una tendencia de las muestras del día 0 a separarse de las de los días 10 y 21 (**FIGURA 4.17**).

### Diversidad alfa - PICRUST2

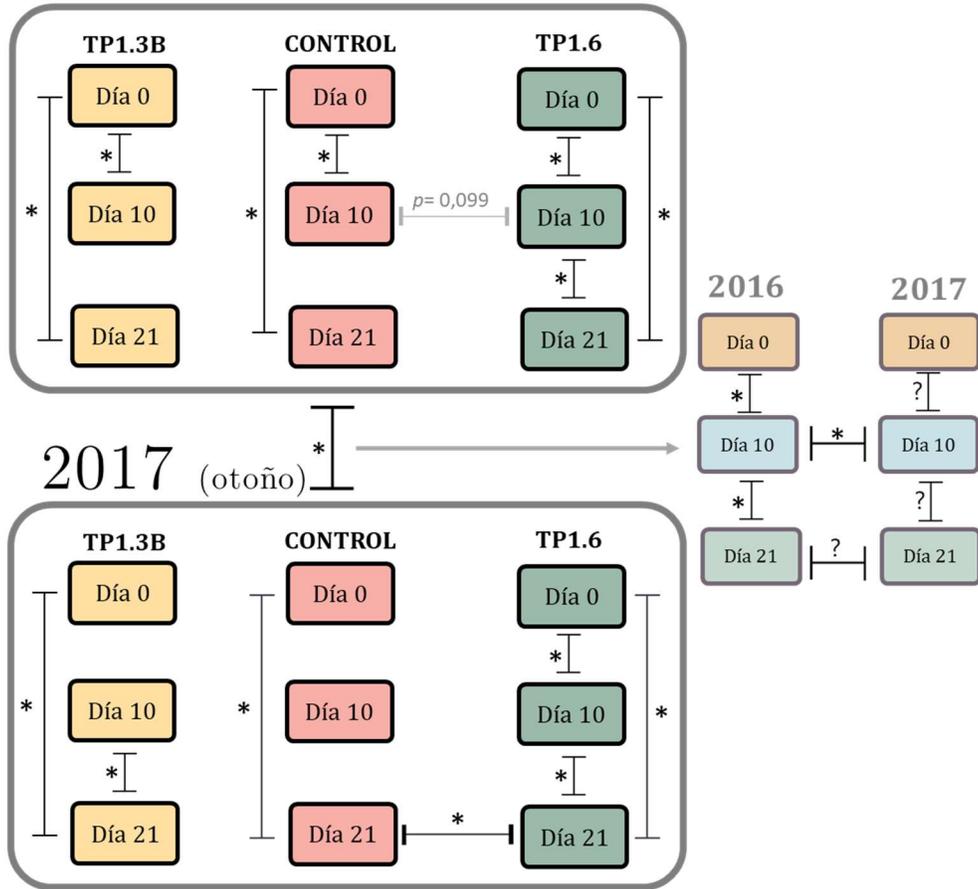


**FIGURA 4.15.** Valores de riqueza, índice de Shannon, índice de Simpson y equitatividad calculados utilizando los datos de los perfiles funcionales de cada muestra.

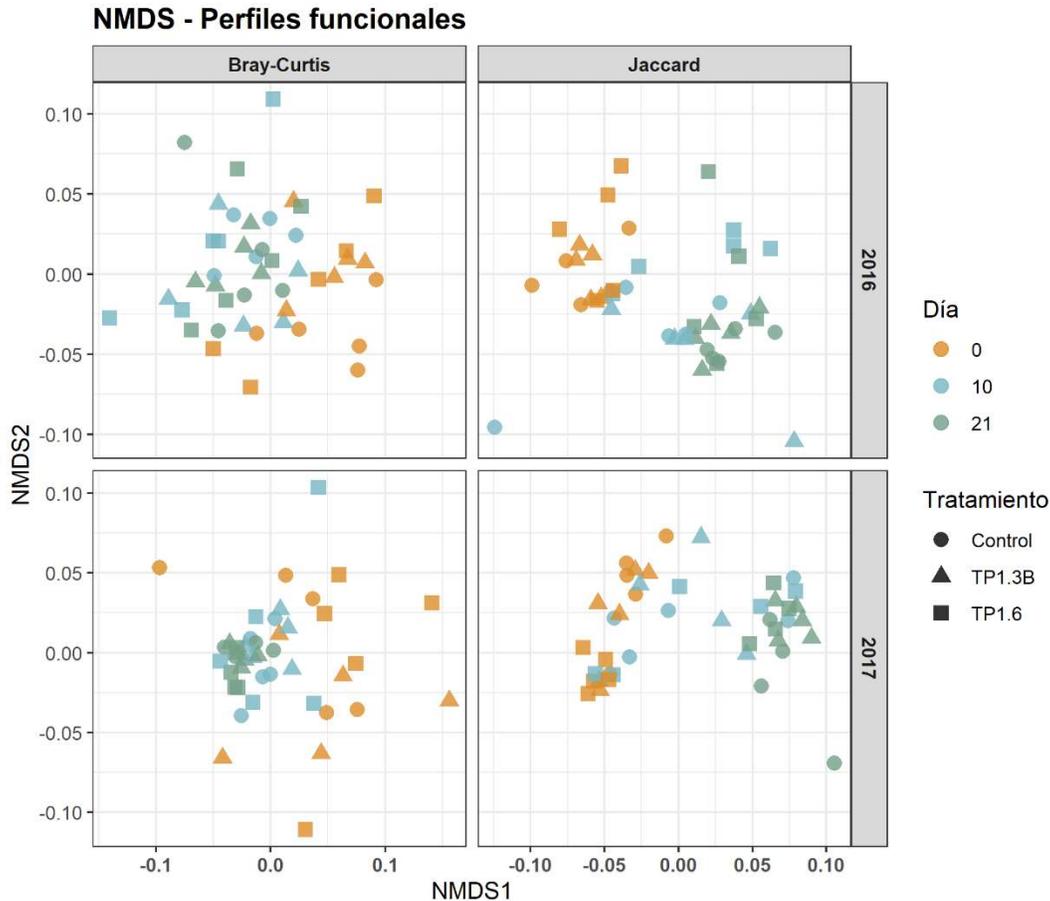
**TABLA 4.4.** Variables explicativas utilizadas para el análisis de PERMANOVA de los perfiles funcionales y su significancia.

Variable	<i>p</i> -value
Tratamiento	0,639
Día	0,001*
Año	0,034*
Tratamiento:Día	0,512
Tratamiento:Año	0,377
Día:Año	0,140
Tratamiento:Día:Año	0,109

2016 (invierno-primavera)



**FIGURA 4.16.** Esquema que resume las comparaciones pareadas que mostraron diferencias significativas con el análisis de PERMANOVA. Se comparó por un lado los perfiles funcionales de las comunidades microbianas entre ambas instancias, los perfiles de cada grupo tratado en cada día vs. el grupo control y entre los distintos días dentro de un mismo grupo. Con el signo “?” se marcan aquellas comparaciones que el resultado del PERMANOVA fue significativo pero la dispersión calculada con betadisper también lo fue, lo cual dificulta su interpretación



**FIGURA 4.17.** NMDS construido con datos de perfil funcional calculado con PICRUSt2 utilizando distancias de Bray-Curtis (abundancias relativas) y Jaccard (presencia/ausencia).

#### 4.6.7 Patógenos

En todos los casos las eficiencias de reacción fueron entre el 90 y el 100%. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y los controles en relación con la presencia y/o abundancia de patógenos o factores de virulencia asociados a la DNT evaluados en este trabajo. Tanto coronavirus como *Salmonella enterica* no fueron detectados en ninguna de las instancias. Hubo diferencias entre algunos de los patógenos encontrados en cada instancia. Rotavirus fue solo detectado en primavera-2016 y los factores de virulencia *Stx1* y *eae* solo fueron detectados en otoño-2017. Tanto *C. parvum* como el factor de virulencia *clpG* fueron detectados en ambas instancias (**TABLA 4.5**).

**TABLA 4.5.** Presencia y abundancia de patógenos asociados a la DNT para cada ternero en el día 10 en ambas instancias. La “x” demuestra la falta de detección de un determinado patógeno en una determinada muestra.

	Tratamiento	Ternero	Día	Coronavirus	<i>S. enterica</i>	<i>eae</i>	<i>Stx1</i>	<i>clpG</i>	Rotavirus	<i>C. parvum</i>
2016	Control	11	10	x	x	x	x	3,49E+02	1,01E+07	8,21E+03
	Control	12	10	x	x	x	x	x	9,49E+04	5,94E+04
	Control	14	10	x	x	x	x	x	x	1,65E+04
	Control	15	10	x	x	x	x	x	x	1,78E+03
	Control	16	10	x	x	x	x	x	x	2,91E+05
	TP1.3B	6	10	x	x	x	x	2,51E+02	x	2,77E+03
	TP1.3B	8	10	x	x	x	x	2,58E+02	2,68E+08	2,09E+04
	TP1.3B	9	10	x	x	x	x	x	x	1,53E+04
	TP1.3B	10	10	x	x	x	x	x	3,52E+02	4,96E+04
	TP1.3B	13	10	x	x	x	x	x	x	x
	TP1.6	1	10	x	x	x	x	1,61E+05	2,58E+05	x
	TP1.6	2	10	x	x	x	x	x	1,43E+05	x
	TP1.6	3	10	x	x	x	x	x	3,36E+03	2,34E+03
	TP1.6	5	10	x	x	x	x	1,39E+03	x	8,17E+03
	TP1.6	7	10	x	x	x	x	x	x	1,06E+04
2017	Control	21	10	x	x	1,13E+04	1,71E+03	x	x	x
	Control	22	10	x	x	x	5,36E+01	x	x	x
	Control	25	10	x	x	x	x	7,46E+04	x	4,63E+03
	Control	26	10	x	x	2,29E+02	5,97E+01	x	x	7,38E+02
	Control	28	10	x	x	6,29E+04	2,31E+04	2,77E+03	x	2,88E+03
	TP1.3B	23	10	x	x	2,10E+04	x	x	x	x
	TP1.3B	27	10	x	x	9,32E+03	2,39E+03	x	x	6,13E+04
	TP1.3B	29	10	x	x	2,01E+02	2,28E+02	x	x	x
	TP1.3B	30	10	x	x	x	x	1,95E+05	x	2,60E+03
	TP1.3B	31	10	x	x	x	x	x	x	x
	TP1.6	17	10	x	x	x	x	x	x	9,67E+03
	TP1.6	18	10	x	x	x	2,92E+04	2,26E+03	x	1,30E+04
	TP1.6	19	10	x	x	3,30E+03	x	x	x	4,17E+03
	TP1.6	20	10	x	x	x	x	x	x	9,68E+04
	TP1.6	24	10	x	x	2,06E+05	7,14E+04	x	x	x

## 4.7 DISCUSIÓN

### *Microbiota*

En terneros neonatos, la colonización de bacterias comensales en el TGI es un proceso vital para el desarrollo de un sistema inmune competente y estable (Taschuk & Griebel, 2012). Los animales nacen con un sistema inmune

inmaduro y entran en contacto con factores ambientales y patógenos durante los primeros días de vida. Esto coincide con el proceso de colonización microbiana y, por lo tanto, es un momento crucial para el desarrollo adecuado de la microbiota y posteriormente de un sistema inmunológico funcional (Wilson *et al.*, 1996). Los probióticos podrían participar activamente en este proceso mediante la exclusión competitiva de microorganismos indeseables y la promoción de un entorno gastrointestinal homeostático (Borchers *et al.*, 2009).

La mayoría de los estudios sobre microbiota intestinal en rumiantes neonatos se han centrado en la microbiota fecal, ya que se cree que son representativos de la microbiota de intestino grueso (Meale *et al.*, 2017). La composición general de la microbiota fue similar a otros estudios previos que describieron a Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria y Actinobacteria como los filos principales (Oikonomou *et al.*, 2013; Meale *et al.*, 2016; Alipour *et al.*, 2018; Du *et al.*, 2018). En este estudio Firmicutes fue el filo más abundante y *Lactobacillus* spp. fue el género más abundante, como se ha descrito en otros estudios (Castro *et al.*, 2016; Fomenky *et al.*, 2018). La composición de la microbiota no se mantuvo constante sino que varió significativamente a lo largo del tiempo. Por ejemplo, se observó que la abundancia de Firmicutes aumentó progresivamente y lo contrario sucedió con Actinobacteria y Proteobacteria. El aumento de Firmicutes con el tiempo en el tracto gastrointestinal de terneros es un fenómeno que ya ha sido descrito previamente y este trabajo apoya esos resultados (Malmuthuge *et al.*, 2015b; Castro *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017). Los géneros más abundantes también cambiaron con el tiempo, por ejemplo, *Ruminococcaceae\_UCG-005* incrementó significativamente su abundancia en el día 21. Esta bacteria no cultivada hasta el momento se ha descrito como el género más abundante en el colon de terneros destetados (Fomenky *et al.*, 2018) y se ha asociado con el

TGI de varias especies como cabras, camellos y ciervos (Guan *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018; He *et al.*, 2019). El género *Escherichia/Shigella* también varió, siendo su abundancia significativamente mayor en el día 0 (5-8 días de vida) que en los siguientes días. Alipour *et al.* (2018) mostraron en su estudio que la diversidad microbiana fecal de los terneros colapsó significativamente luego de 24 h de nacidos causada por un aumento en la abundancia del género *Escherichia/Shigella* que luego disminuyó con el tiempo.

La administración de probióticos tuvo efecto significativo en la estructura de la microbiota total de los animales tratados y esto fue evidenciado por los resultados del PERMANOVA. Este hecho resulta interesante ya que no abundan los trabajos en los cuales se haya logrado cambios significativos en la microbiota de terneros con la administración de probióticos (Du *et al.*, 2018; Fomenky *et al.*, 2018). Como forma de control se chequeó que las comunidades no fueran significativamente diferentes al comienzo del ensayo (día 0), de forma de asegurarse que las posibles diferencias encontradas no estuvieran asociadas a una heterogeneidad intrínseca entre la composición de las comunidades microbianas de los distintos los grupos. Por otro lado, con relación a los índices de diversidad alfa, no se encontraron diferencias significativas en la riqueza, pero sí se observaron diferencias en los índices de Shannon, Simpson y equitatividad para el tratamiento con TP1.6 en algunos días. El índice de Shannon es afectado tanto por la riqueza como por la equidad de la comunidad. En este estudio, dado que la riqueza fue similar en ambos grupos, se podría decir que en el día 10 del grupo tratado con TP1.6 la distribución de las abundancias fue menos equitativa. El índice de Simpson, está relacionado con la dominancia y se interpreta como la probabilidad de que si se toman dos individuos al azar, estos pertenezcan géneros distintos. En otoño-2017, el grupo TP1.6 presentó menores índices de diversidad ya desde el día 0, y por lo tanto no se podría asegurar que las diferencias observadas en los siguientes tiempos

se debieron a la administración de probióticos o simplemente a que ese grupo comenzó con una comunidad menos diversa. En cambio, en primavera-2016, al día 0 no hubo diferencias entre este grupo y el control y por lo tanto la disminución en los índices de Shannon y Simpson en el día 10 podría deberse a la administración del probiótico. Luego al día 21, estas diferencias se perdieron y esto podría interpretarse como “lavado” del efecto del probiótico luego del cese de la administración, aunque como se mencionó anteriormente el análisis de PERMANOVA mostró que existían diferencias significativas en este día. Por lo tanto, se recuperó la diversidad, pero la estructura de la comunidad se mantuvo distinta con respecto al control. Si bien no es deseable que la diversidad disminuya, existe hoy en día un debate sobre su rol en el tracto gastrointestinal y la complejidad de las interacciones microorganismo-hospedero hace que sea difícil definir el papel de la diversidad microbiana en la salud y la enfermedad (Gerritsen *et al.*, 2011). Algunos autores consideran que la riqueza es uno de los parámetros más importante para determinar la “salud” de un ecosistema porque se asocia con una mayor diversidad y redundancia funcional y esto permitiría la recuperación de la comunidad luego de perturbaciones ambientales (Sommer *et al.*, 2017). En ambos tratamientos la riqueza se mantuvo igual al control y con el análisis de PICRUST2 también se pudo observar que la diversidad funcional fue igual al control, aún en los puntos en que algunos índices de diversidad taxonómica fueron menores.

El análisis con el paquete {DESeq2} permitió ver en qué géneros bacterianos específicos se diferenciaron los grupos tratados de los grupos control. Dentro de los cambios más relevantes se encuentra una menor proporción de *Escherichia/Shigella* en ambos grupos tratados en primavera-2016. Esta diferencia fue observada al día 21, o sea en un momento de la vida de los terneros en el cual la incidencia de diarreas no es tan alta y la mortalidad es menor. Igualmente, esto podría ser un aspecto positivo si esa disminución en

la abundancia de *Escherichia/Shigella* se pudiera asociar con una disminución en el *shedding* o excreción al ambiente. En muchos casos los terneros recién nacidos son alojados con terneros más grandes y estos pueden funcionar como reservorio de microorganismos que podrían ser patógenos o tener una carga infectiva menor en terneros susceptibles (Smith, 2012). En esa misma instancia, en el día 10 de ambos grupos tratados se observó un aumento en la abundancia del género *Akkermansia*, y en el caso del tratamiento con TP1.3B este aumento se mantuvo hasta el día 21. La especie *Akkermansia muciniphila* ha sido muy estudiada últimamente debido a sus características probióticas ya que reside en el mucus intestinal y regula la homeostasis y la integridad de la barrera intestinal mediante la interacción con vías de señalización del huésped (Shin *et al.*, 2019). Su abundancia se correlaciona inversamente con muchas enfermedades en humanos, desde metabólicas hasta inflamatorias y por eso se lo considera un probiótico de “siguiente generación” (Cani & de Vos, 2017; Zhai *et al.*, 2018). En humanos su abundancia oscila entre 1-5% (Belzer & De Vos, 2012) y en este trabajo se encontró en la misma proporción. Además, en el día 10 de otoño-2017, también hubo un aumento de este género en el grupo tratado con TP1.6 como había sucedido en la instancia anterior. *Faecalibacterium* también varió en el grupo TP1.6 en primavera-2016 ya que el día 10 se observó una disminución y al día 21 un aumento de la abundancia con respecto al control. Este fue uno de los géneros más abundante, llegando en algunos casos a representar el 25% de la comunidad (datos no mostrados). *Faecalibacterium prausnitzii* ha sido propuesto recientemente como probiótico para terneros con resultados prometedores (Foditsch *et al.*, 2015). En muchos casos los cambios observados fueron en géneros que no han podido ser cultivados, en su mayoría pertenecientes las familias *Ruminococcaceae* y *Lachnospiraceae* que se caracterizan por ser anaerobios estrictos (Cotta &

Forster, 2006; Rainey, 2015), por lo tanto, la interpretación de estos cambios y la determinación de su rol en la comunidad se dificultan.

El factor ambiental desempeña un papel muy importante en la estructura de la comunidad microbiana (Taschuk & Griebel, 2012) y esto en la salud de los terneros neonatos (Gomez *et al.*, 2017). En este estudio, el análisis con PERMANOVA demostró que las comunidades bacterianas fueron significativamente diferentes entre ambas instancias y esta diferencia fue evidente desde el día 0, o sea entre los 5 y 8 días de vida. A su vez, el efecto de la administración de los probióticos sobre la microbiota fue distinto según este análisis así como en los índices de diversidad alfa. Esto podría indicar que el factor ambiental jugó un rol importante y que se debería tener en cuenta para futuros ensayos. El análisis con `DESeq2` de los perfiles funcionales mostraron algunas diferencias, pero sin un patrón claro (datos no mostrados). El día de muestreo influyó fuertemente sobre la comunidad bacteriana y los cambios se pudieron observar con los resultados de PERMANOVA, `DESeq2`, *heatmaps* y NMDS. Esto era de esperarse ya que se ha descrito ampliamente que los rumiantes experimentan cambios drásticos en la anatomía y fisiología de su TGI desde el nacimiento hasta la edad adulta (Drackley, 2008). En este trabajo se observaron cambios importantes en la microbiota entre los diferentes días y estos cambios pudieron observarse a nivel de filo. Los resultados mostraron que la abundancia relativa de Firmicutes y Bacteroidetes aumentaron mientras que la de Proteobacteria disminuyó. Se ha observado que el rumen a lo largo de su desarrollo sigue un patrón similar (Wang *et al.*, 2017). Si bien la microbiota fecal no representa la composición de la microbiota ruminal (Michelland *et al.*, 2009), ciertos cambios en la microbiota del rumen se ven reflejados en la microbiota fecal (Uyeno *et al.*, 2010; Dill-Mcfarland *et al.*, 2017). El análisis con `DESeq2` entre los días 0 y 21 mostraron varias diferencias en la composición. Se pudo observar que en el día 21 hubo mayor

abundancia de bacterias asociadas al ambiente ruminal, como *Desulfovibrio* spp., *Succinivibrio* spp., *Anaerovibrio* spp. (Minuti *et al.*, 2015), *Coprococcus* spp. (Jami *et al.*, 2013) y de las arqueas *Methanobrevibacter* spp. y *Methanosphaera* spp. (Dill-Mcfarland *et al.*, 2017). Ambos géneros del dominio Archaea son anaerobios estrictos que producen metano, han sido encontrados tanto en el intestino como el rumen (Janssen & Kirs, 2008; Dridi *et al.*, 2009) y en particular algunas especies de *Methanobrevibacter* spp. se han encontrado asociados a ciliados del rumen (Tokura *et al.*, 1999, 2005). El aumento de estas arqueas en el rumen se ha asociado con terneros que consumen ración además de leche (Zhou *et al.*, 2015; Dias *et al.*, 2017). A su vez en el día 0 se pudo observar una mayor proporción de anaerobios facultativos y microaerófilos como *Escherichia/Shigella* spp., *Enterococcus* spp., *Actinomyces* spp. y *Streptococcus* spp. Se ha sugerido que la presencia de los anaerobios facultativos en las primeras instancias de colonización sería de mucha importancia para la disminución de la concentración de oxígeno y la generación de condiciones ecológicas adecuadas para el establecimiento de comunidades anaerobias, tanto en el intestino (Gilliland *et al.*, 2012) como en el rumen (Jami *et al.*, 2013; Meale *et al.*, 2017). Igualmente, los mecanismos detrás de esa sucesión en la colonización no han sido descritos en su totalidad y algunos trabajos desafían esa hipótesis ya que se encontró ADN de anaerobios estrictos en el rumen e intestino de terneros al momento del nacimiento (Guzman *et al.*, 2015; Alipour *et al.*, 2018). Los índices de diversidad alfa también se vieron afectadas por el tiempo y se observó que estos aumentaron progresivamente, como se ha descrito en otros trabajos (Uyeno *et al.*, 2010; Oikonomou *et al.*, 2013; Klein-jöbstl *et al.*, 2014; Foditsch *et al.*, 2015). A su vez, se calcularon índices de diversidad alfa para los datos de perfil funcional de la comunidad y se observó que, si bien la riqueza aumentó con el tiempo, los índices de Shannon, Simpson y equitatividad tendieron a disminuir. Se podría asumir que

con el tiempo fueron apareciendo nuevas funciones en la comunidad, asociado probablemente a un aumento en la riqueza composicional, pero con una distribución menos equitativa de las abundancias y dominancia de ciertas vías metabólicas. Análisis con DESeq2 de los perfiles funcionales indicó que hubo diferencias en 233 vías metabólicas entre los días 0 y 21, un 40% del repertorio total de vías encontradas. Por ejemplo, en el día 21 hubo mayor abundancia de vías de la metanogénesis y asociadas a aqeas metanógenas y vías asociadas a ambientes reductores (datos no mostrados).

### *Patógenos*

Una de las características probióticas más estudiadas es la actividad antimicrobiana (Liévin-Le Moal & Servin, 2014). Muchos lactobacilos estudiados presentan este tipo de actividad como resultado de la producción de metabolitos como ácido láctico, bacteriocinas y moléculas no proteicas que tienen un efecto bactericida directo (Servin, 2004; O'Shea *et al.*, 2012; Cotter *et al.*, 2013). Muchas bacteriocinas actúan generando poros o canales iónicos en la envoltura celular de los patógenos y otras ejercen su función dentro de la célula afectando la expresión génica (McAuliffe *et al.*, 2001; Oscáriz & Pisabarro, 2001). También se ha visto que algunas cepas pueden sintetizar otro tipo de moléculas que afectan la expresión de factores de virulencia de enteropatógenos o que modulan los efectos deletéreos que tienen estos sobre la estructura celular y función intestinal (Freitas *et al.*, 2003; Kleerebezem *et al.*, 2010; Bron *et al.*, 2012; van Baarlen *et al.*, 2013). Además, se ha visto en ensayos *in vitro* que los probióticos pueden inhibir la adhesión de los patógenos a los enterocitos (Servin, 2004). En modelos de infección con rotavirus se ha visto que varios probióticos fueron capaces de inhibir la adhesión viral. El mecanismo involucrado fue la secreción de factores solubles que modificaron el estado de glicosilación del receptor en las células epiteliales (Freitas *et al.*,

2003). En cuanto a enteropatógenos bacterianos se ha visto que uno de los mecanismos más comunes es la exclusión y competencia por los sitios de adhesión a los enterocitos (Lee *et al.*, 2003; Saxelin *et al.*, 2005). En estudios *in vivo* se ha demostrado que el tratamiento con cepas de *Lactobacillus* spp. disminuye la excreción de patógenos (*shedding*) en la materia fecal de animales y humanos infectados naturalmente o desafiados con cepas de *E. coli*, *Salmonella enterica* o rotavirus (Genovese *et al.*, 2000; Younts-Dahl *et al.*, 2004; Casey *et al.*, 2007). Una menor liberación de patógenos al ambiente podría disminuir la diseminación y la probabilidad de infección de otros animales que se encuentren en el mismo espacio físico (Smith, 2012). En este trabajo, coronavirus no fue detectado mientras que rotavirus se encontró en primavera-2016 en concentraciones variadas y no se encontraron diferencias significativas entre los animales del grupo control y los tratados. La estacionalidad de rotavirus ha sido descrita en la bibliografía (Cook *et al.*, 1990; Nourmohammadzadeh *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2013) y en Uruguay se ha detectado una mayor prevalencia en muestras ambientales en meses fríos, desde junio a setiembre (Victoria *et al.*, 2014). La variabilidad en los niveles detectados de rotavirus podría deberse a varios factores. Por un lado, la toma de muestras de heces se realizó en tiempos fijados *a priori* de forma de tener una idea del estado sanitario de cada animal en determinados momentos del período experimental. Una de las desventajas de aplicar este criterio es que se pueden perder las diferencias por las distintas dinámicas de eliminación del patógeno que puede presentar cada animal. Además, se ha descrito ampliamente la existencia de animales sanos que presentan rotavirus en sus heces sin presentar síntomas (Bartels *et al.*, 2010; Swiatek *et al.*, 2010) y podrían ser reservorios de este patógeno (Abe *et al.*, 2009). También se detectó estacionalidad en los genes de virulencia de *E. coli* *Stx1* y *eae*. Estos genes fueron detectados sólo en otoño-2017, mientras que *clpG* se encontró en ambas

instancias. En un estudio previo sobre la presencia de genes de virulencia de *E. coli* en terneros de algunos establecimientos lecheros de nuestro país se determinó que la prevalencia de *clpG* en esa colección fue de 17,5% (Umpiérrez *et al.*, 2016). En nuestro trabajo este gen se detectó en un 26,7% de los animales en primavera-2016 y en el 32,7% en otoño-2017. Esto se corresponde con un estudio más reciente, aún no publicado, que encontró que el tambo de INIA-La Estanzuela presentó una prevalencia de este gen en el 32,7% y 33,8% de los animales en 2016 y 2017, respectivamente (comunicación personal de la Dra. Umpiérrez). La identificación de patotipos específicos de *E. coli* requiere la detección de determinadas combinaciones de factores de virulencia en aislamientos. Por lo tanto, debido al enfoque metodológico, en este trabajo no se llegó a detallar la presencia de patotipos exactos sino la presencia de determinados genes de virulencia. La prevalencia de *Salmonella enterica* en terneros con diarreas ha sido variable alrededor del mundo, con algunos valores reportados de 2,3% (Egualé *et al.*, 2016), 8,8% (Ansari *et al.*, 2014), 9,75% (Zahran & El-Behiry, 2014), 18,1% (El-Seedy *et al.*, 2016), entre otros. Se considera problemático extrapolar los resultados de prevalencia de patógenos de un país a otro debido a las diferencias ambientales y de manejo. Por ejemplo, en Uruguay es común tener temporadas de parto anuales planificadas. Esto podría influir en la distribución temporal de los agentes infecciosos en comparación con los países en los que hay terneros neonatos durante todo el año (Al Mawly *et al.*, 2015). En nuestro trabajo no se detectó *S. Typhimurium* en ninguna muestra, tanto por qPCR de *invA* como a partir de los datos de secuenciación masiva de 16S. A su vez, ningún ternero presentó los síntomas característicos de la diarrea por *S. enterica* como heces acuosas con presencia abundante de mucus, fibrina y sangre (Blanchard, 2012). Hasta el momento no hay trabajos publicados de Uruguay pero en un trabajo realizado en INIA-La Estanzuela se encontró *S. Typhimurium* en 9 de 30 tambos estudiados y

del total de 544 terneros muestreados, 282 sin diarrea y 262 con diarrea, solo 22 (4,04%) fueron positivos al cultivo de *S. enterica* (Casaux, 2018). *C. parvum* fue detectado en ambas instancias, en 21 terneros en total, representando un 70% de los animales, sin encontrarse diferencias significativas entre el grupo control y los grupos tratados. En un estudio hecho en Uruguay (Caffarena, 2017) se encontró, mediante un kit comercial de ELISA, que 30/30 tambos analizados presentaron *C. parvum* y el 48,2% de los terneros fueron positivos para este patógeno. En nuestro estudio fue mayor el número de terneros positivos, pero eso podría deberse a diferencias en la sensibilidad de los métodos utilizados en ambos estudios. En este trabajo no se encontró correlación entre la presencia de rotavirus y *C. parvum*, como han sugerido otros autores (Cho *et al.*, 2013; Al Mawly *et al.*, 2015). Dado que frecuentemente se observa la presencia de patógenos en heces de terneros sin síntomas diarreicos, surge la pregunta de si los métodos de alta sensibilidad serían útiles en el diagnóstico de la enfermedad. El momento de muestreo de este trabajo, planificado para que fuera el día siguiente a la última dosis, coincide con el fin de la segunda semana y el comienzo de la tercera. Ha sido descrito previamente que la excreción de ooquistes es mayor durante la segunda semana de vida (Foster & Smith, 2009; Silverlås *et al.*, 2010; De Waele *et al.*, 2011). Por lo tanto, podría haber sido útil haber tomado más muestras durante el período de administración de los probióticos de forma de realizar un seguimiento más fino de la dinámica de este patógeno en los terneros control y tratados. Hasta el momento no existen estudios realizados sobre el efecto de la administración de probióticos sobre la criptosporidiosis en terneros.

## 4.8 CONCLUSIONES

---

Por un lado, en esta instancia se pudo determinar que la administración de probióticos produjo cambios en la microbiota intestinal. Por otro lado, no están

claros los mecanismos por los cuales se pueden haber dado estos cambios ni la relevancia de estos cambios específicos sobre la salud de los terneros. Igualmente resulta promisorio que se haya observado efecto sobre la microbiota ya que no abundan los estudios que demuestren que es posible la manipulación de la microbiota intestinal de terneros mediante la administración de probióticos. No se encontraron diferencias en la presencia y abundancia de patógenos asociados a la DNT, pero esto podría deberse a que la dinámica de cada patógeno es muy variable y sería interesante evaluarla durante el período de administración de los probióticos. Se requiere seguir estudiando estos cambios y dilucidar posibles mecanismos de modulación de la microbiota y los efectos de esta modulación sobre la salud de los terneros.

# CONSIDERACIONES FINALES

En este trabajo se realizó el aislamiento, la identificación y caracterización de probióticos destinados a terneros de lechería con el fin de disminuir la incidencia y severidad de la diarrea neonatal.

Se puede concluir, por un lado, que el proceso de caracterización y los criterios de selección fueron adecuados ya que se observaron cambios significativos en ciertos aspectos de la salud de los terneros. El ensayo *in vivo* mostró prometedores en relación con el efecto de los probióticos sobre la incidencia de la DNT y mostraron que el efecto del ambiente podría ser muy importante a la hora de evaluar el desarrollo de futuros probióticos.

En ambas instancias del ensayo se observaron algunas diferencias en varios aspectos. La temperatura ambiental fue significativamente menor en primavera-2016, lo que podría asociarse con los valores más altos de *score* fecal observados, la menor ganancia de peso diaria y la presencia de rotavirus. En esta instancia fue en la que se observaron más cambios asociados a la administración de probióticos, desde una menor incidencia de DNT hasta efectos significativos en la comunidad microbiana total, así como específicos como la disminución de *Escherichia/Shigella*. Con estos datos se podría pensar que el efecto de los probióticos podría haber sido más significativo en condiciones ambientales de mayor riesgo para los animales, pero habría que realizar más ensayos para comprobar esta hipótesis. Por otro lado, no se pudo

dilucidar posibles mecanismos de acción de los probióticos por lo que sería de interés continuar con nuevos estudios para profundizar en este aspecto. Hubiera sido interesante haber agregado protocolos relacionados con la administración de tratamientos rehidratantes de forma de determinar si el aumento en el *score* fecal o la menor incidencia de diarreas podría asociarse con menores gastos para el productor. Además, no se observaron efectos significativos sobre la ganancia diaria de peso, pero, como se mencionó anteriormente, esto podría relacionarse con la dieta restrictiva administrada. En futuros ensayos sería interesante realizar ensayos con un mayor número de animales y con dietas de tipo *step up/step down* por ejemplo para comprobar si la no limitación nutricional podría ayudar a determinar diferencias en la ganancia de peso diaria.

La conclusión principal de este trabajo fue:

**Cepas de *Lactobacillus* spp. aislados de materia fecal de terneros sanos criados al pie de la madre disminuyeron la frecuencia de diarreas en terneros criados bajo sistemas artificiales. Por lo tanto, podrían considerarse potenciales probióticos que beneficiarían la salud de terneros.**

## **PERSPECTIVAS**

Se podrían realizar ensayos con un mayor número de animales y manejo distinto, agregando datos de tratamientos administrados y consumo, de forma de determinar cambios en la eficiencia energética. Además, se podría realizar un seguimiento de los animales para determinar si la administración de los probióticos podría tener un efecto a largo plazo en la productividad de las terneras, determinado, por ejemplo, por el rendimiento de leche y la edad de comienzo del primer celo. Por otro lado, dada su altísima prevalencia y su asociación con la incidencia de diarreas en Uruguay y en el mundo, se podrían

realizar estudios sobre la dinámica de *C. parvum* en terneros tratados con estos probióticos. También se podría pensar en una administración conjunta de ambos probióticos estudiados, siempre y cuando se chequee previamente que no exista inhibición entre ellos. Además de esto, la administración de estos probióticos en conjunto con sustancias que pudieran potenciar su sobrevivencia en el intestino (prebióticos) podría ser una estrategia interesante.

En este momento el equipo de trabajo se encuentra analizando los genomas de estos potenciales probióticos. Con esta información se buscarán genes asociados a la actividad probiótica como bacteriocinas y adhesinas con afinidad al mucus intestinal. La información de los genomas permitirá diseñar *primers* cepa-específicos de forma de poder realizar un seguimiento de cada cepa en el ambiente gastrointestinal y determinar dinámica de eliminación de forma más precisa.

# REFERENCIAS

# BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, F., Ishibashi, N. & Shimamura, S. (1995) Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *Journal of dairy science*, 78, 2838–2846.
- Abe, M., Ito, N., Morikawa, S., Takasu, M., Murase, T., Kawashima, T., Kawai, Y., Kohara, J. & Sugiyama, M. (2009) Molecular epidemiology of rotaviruses among healthy calves in Japan: Isolation of a novel bovine rotavirus bearing new P and G genotypes. *Virus Research*.
- Adjei-Fremah, S., Ekwemalor, K., Asiamah, E.K., Ismail, H., Ibrahim, S. & Worku, M. (2018) Effect of probiotic supplementation on growth and global gene expression in dairy cows. *Journal of Applied Animal Research*, 46, 257–263.
- Agazzi, A., Tirloni, E., Stella, S., Marocco, S., Ripamonti, B., Bersani, C., Michela Caputo, J., Dell, V., Rota, N. & Savoini, G. (2014) Effects of species-specific probiotic addition to milk replacer on calf health and performance during the first month of life. *Annals of Animal Science*, 14, 101–115.
- Agbaje, M., Begum, R.H., Oyekunle, M.A., Ojo, O.E. & Adenubi, O.T. (2011) Evolution of Salmonella nomenclature: A critical note. *Folia Microbiologica*.
- Agresti, A. (2010) *Analysis of Ordinal Categorical Data*. P. in.: 2nd edition. John Wiley & Sons, Inc.
- Ahmed, B., Loos, M., Vanrompay, D. & Cox, E. (2014) Oral immunization with Lactococcus lactis-expressing EspB induces protective immune responses against Escherichia coli O157: H7 in a murine model of colonization. *Vaccine*.
- Akins, M.S. (2016) Dairy Heifer Development and Nutrition Management. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*.
- Alipour, M.J., Jalanka, J., Pessa-Morikawa, T., Kokkonen, T., Satokari, R., Hynönen, U., Iivanainen, A. & Niku, M. (2018) The composition of the perinatal intestinal microbiota in cattle. *Scientific Reports*.
- Allain, T., Chaouch, S., Thomas, M., Vallée, I., Buret, A.G., Langella, P., Grellier, P., Polack, B., Bermúdez-Humarán, L.G. & Florent, I. (2018) Bile-Salt-Hydrolases from the probiotic strain Lactobacillus johnsonii La1 mediate anti-giardial activity in vitro and in vivo. *Frontiers in Microbiology*.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*.
- Alvarez, A., del Corral, J., Solís, D. & Pérez, J.A. (2008) Does Intensification Improve the Economic Efficiency of Dairy Farms? *Journal of Dairy Science*.
- Anderson, D.C., Kress, D.D., Bernardini, T.M.M., Davis, K.C., Boss, D.L. & Doornbos, D.E. (2003) The Effect of Scours on Calf Weaning Weight. *The Professional Animal Scientist*.
- De Angelis, M., Siragusa, S., Caputo, L., Ragni, A., Burzigotti, R. & Gobbetti, M. (2007) Survival and persistence of Lactobacillus plantarum 4.1 and Lactobacillus reuteri 3S7 in the gastrointestinal tract of pigs. *Veterinary Microbiology*, 123, 133–144.
- Ansari, A.R.M.I.H., Rahman, M.M., Islam, M.Z., Das, B.C., Habib, A., Belal, S.M.S.H. & Islam, K. (2014) Prevalence and Antimicrobial Resistance Profile of Escherichia Coli and Salmonella Isolated from Diarrheic Calves. *Journal of Animal Health and Production*, 2.

- Argyri, A.A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.A.G., Tsakalidou, E., Nychas, G.J.E., Panagou, E.Z. & Tassou, C.C. (2013) Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiology*, 33, 282–291.
- Arnold, J.W., Simpson, J.B., Roach, J., Kwintkiewicz, J. & Azcarate-Peril, M.A. (2018) Intra-species genomic and physiological variability impact stress resistance in strains of probiotic potential. *Frontiers in Microbiology*.
- Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., Taniguchi, T., Takeda, K., Hori, S., Ivanov, I.I., Umesaki, Y., Itoh, K. & Honda, K. (2011) Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science*.
- Atilola, O., Gyawali, R., Aljaloud, S. & Ibrahim, S. (2015) Use of Phytone Peptone to Optimize Growth and Cell Density of Lactobacillus reuteri. *Foods*, 4, 318–327.
- Azcarate-Peril, M.A., Altermann, E., Hoover-Fitzula, R.L., Cano, R.J. & Klaenhammer, T.R. (2004) Identification and inactivation of genetic loci involved with Lactobacillus acidophilus acid tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*.
- van Baarlen, P., Wells, J.M. & Kleerebezem, M. (2013) Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli. *Trends in Immunology*.
- Bakker-Zierikzee, A.M., Van Tol, E.A.F., Kroes, H., Alles, M.S., Kok, F.J. & Bindels, J.G. (2006) Faecal SIgA secretion in infants fed on pre- or probiotic infant formula. *Pediatric Allergy and Immunology*, 17, 134–140.
- Baldwin, R.L., VI, McLeod, K.R., Klotz, J.L. & Heitmann, R.N. (2004) Rumen Development, Intestinal Growth and Hepatic Metabolism In The Pre- and Postweaning Ruminant. *J. Dairy Sci*.
- Baldwin, R.L., McLeod, K.R., Klotz, J.L. & Heitmann, R.N. (2010) Rumen Development, Intestinal Growth and Hepatic Metabolism In The Pre- and Postweaning Ruminant. *Journal of Dairy Science*.
- Bartels, C.J.M., Holzhauer, M., Jorritsma, R., Swart, W.A.J.M. & Lam, T.J.G.M. (2010) Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine*, 93, 162–169.
- Basset-Mens, C., Ledgard, S. & Boyes, M. (2009) Eco-efficiency of intensification scenarios for milk production in New Zealand. *Ecological Economics*, 68, 1615–1625.
- Belzer, C. & De Vos, W.M. (2012) Microbes inside-from diversity to function: The case of Akkermansia. *ISME Journal*.
- Bendali, F., Bichet, H., Schelcher, F. & Sanaa, M. (1999) Pattern of diarrhoea in newborn beef calves in south-west France. *Veterinary Research*, 30, 61–74.
- Berg, R.D. & Savage, D.C. (1975) Immune responses of specific pathogen free and gnotobiotic mice to antigens of indigenous and nonindigenous microorganisms. *Infection and Immunity*.
- Berge, A.C.B., Lindeque, P., Moore, D.A. & Sisco, W.M. (2005) A Clinical Trial Evaluating Prophylactic and Therapeutic Antibiotic Use on Health and Performance of Prewaned Calves. *J. Dairy Sci*.
- Berge, A.C.B., Moore, D.A., Besser, T.E. & Sisco, W.M. (2009) Targeting therapy to minimize antimicrobial use in preweaned calves: Effects on health, growth, and treatment costs. *Journal of Dairy Science*.
- Bernardeau, M., Guguen, M. & Vernoux, J.P. (2006) Beneficial lactobacilli in food and feed: Long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiology Reviews*.
- Bertin, Y., Martin, C., Oswald, E. & Girardeau, J.P. (1996) Rapid and specific detection of F17-related pilin and adhesin genes in diarrheic and septicemic Escherichia coli strains by multiplex PCR. Rapid and Specific Detection of F17-Related Pilin and Adhesin Genes in Diarrheic and Septicemic Escherichia coli St. *Journal of clinical microbiology*, 34, 2921–2928.
- Bertin, Y., Girardeau, J.P., Darfeuille-Michaud, A. & Martin, C. (2000) Epidemiological study of pap genes among diarrheagenic or septicemic Escherichia coli strains producing CS31A and F17 adhesins and characterization of Pap(31A) fimbriae. *Journal of Clinical Microbiology*.
- Bezkorovainy, A. (2001) Probiotics: Determinants of survival and growth in the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 399–405.
- Bianchi, M.A., Del Rio, D., Pellegrini, N., Sansebastiano, G., Neviani, E. & Brighenti, F. (2004) A fluorescence-based method for the detection of adhesive properties of lactic acid bacteria to Caco-2 cells. *Letters in Applied Microbiology*, 39, 301–305.
- Bik, E.M. (2009) Composition and function of the human-associated microbiota. P. in: *Nutrition Reviews*.
- Bischoff, S.C. (2011) “Gut health”: A new objective in medicine? *BMC Medicine*.

- Blanchard, P.C. (2012) Diagnostics of Dairy and Beef Cattle Diarrhea. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 28, 443–464.
- Boileau, M.J. & Kapil, S. (2010) Bovine Coronavirus Associated Syndromes. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. .
- Borchers, A.T., Selmi, C., Meyers, F.J., Keen, C.L. & Gershwin, M.E. (2009) Probiotics and immunity. *Journal of Gastroenterology*. .
- Von Borell, E. & Sørensen, J.T. (2004) Organic livestock production in Europe: Aims, rules and trends with special emphasis on animal health and welfare. P. in: *Livestock Production Science*.
- Brandtzaeg, P. (2013) Secretory IgA: Designed for anti-microbial defense. *Frontiers in Immunology*.
- Brant, R. (1990) Assessing Proportionality in the Proportional Odds Model for Ordinal Logistic Regression. *Biometrics*, 1171–1178.
- Bron, P.A., Marco, M., Hoffer, S.M., Van Mullekom, E., De Vos, W.M. & Kleerebezem, M. (2004) Genetic characterization of the bile salt response in *Lactobacillus plantarum* and analysis of responsive promoters in vitro and in situ in the gastrointestinal tract. *Journal of Bacteriology*.
- Bron, P.A., Van Baarlen, P. & Kleerebezem, M. (2012) Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nature Reviews Microbiology*. .
- Bruno-Bárcena, J.M., Andrus, J.M., Libby, S.L., Klaenhammer, T.R. & Hassan, H.M. (2004) Expression of a heterologous manganese superoxide dismutase gene in intestinal lactobacilli provides protection against hydrogen peroxide toxicity. *Applied and Environmental Microbiology*.
- von Buenau, R., Jaekel, L., Schubotz, E., Schwarz, S., Stroff, T. & Krueger, M. (2005) *Escherichia coli* Strain Nissle 1917: Significant Reduction of Neonatal Calf Diarrhea. *Journal of Dairy Science*, 88, 317–323.
- Bujnakova, D., Strakova, E. & Kmet, V. (2014) In vitro evaluation of the safety and probiotic properties of *Lactobacilli* isolated from chicken and calves. *Anaerobe*, 29, 118–127.
- Bunešová, V., Domig, K.J., Killer, J., Vlková, E., Kopečný, J., Mrázek, J., Ročková, S. & Rada, V. (2012) Characterization of bifidobacteria suitable for probiotic use in calves. *Anaerobe*, 18, 166–168.
- Bustos, A.Y., Raya, R., de Valdez, G.F. & Taranto, M.P. (2011) Efflux of bile acids in *Lactobacillus reuteri* is mediated by ATP. *Biotechnology Letters*.
- Bustos, A.Y., de Valdez, G.F., Raya, R., de Almeida, A.M., Fadda, S. & Taranto, M.P. (2015) Proteomic analysis of the probiotic *Lactobacillus reuteri* CRL1098 reveals novel tolerance biomarkers to bile acid-induced stress. *Food Research International*.
- Caffarena, D. (2017) Aspectos clínicos y epidemiológicos de la diarrea neonatal en terneros de tambos de Uruguay y su asociación con infección por *Cryptosporidium* spp. y *Escherichia coli* F5 (K99)+. Universidad de la República.
- Cai, H., Thompson, R., Budinich, M.F., Broadbent, J.R. & Steele, J.L. (2009) Genome Sequence and Comparative Genome Analysis of *Lactobacillus casei*: Insights into Their Niche-Associated Evolution. *Genome Biology and Evolution*.
- Callahan, B.J., Sankaran, K., Fukuyama, J.A., McMurdie, P.J. & Holmes, S.P. (2016a) Bioconductor Workflow for Microbiome Data Analysis: from raw reads to community analyses. *F1000Research*.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A. & Holmes, S.P. (2016b) DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*.
- Callaway, T.R., Dowd, S.E., Edrington, T.S., Anderson, R.C., Krueger, N., Bauer, N., Kononoff, P.J. & Nisbet, D.J. (2010) Evaluation of bacterial diversity in the rumen and feces of cattle fed different levels of dried distillers grains plus solubles using bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing. *Journal of Animal Science*.
- Campeotto, F., Suau, A., Kapel, N., Magne, F., Viallon, V., Ferraris, L., Waligora-Dupriet, A.J., Soulaines, P., Leroux, B., Kalach, N., Dupont, C. & Butel, M.J. (2011) A fermented formula in pre-term infants: Clinical tolerance, gut microbiota, down-regulation of faecal calprotectin and up-regulation of faecal secretory IgA. *British Journal of Nutrition*, 105, 1843–1851.
- Cani, P.D. & de Vos, W.M. (2017) Next-generation beneficial microbes: The case of *Akkermansia muciniphila*. *Frontiers in Microbiology*. .
- Cantarel, B.L., Lombard, V. & Henrissat, B. (2012) Complex carbohydrate utilization by the healthy human microbiome. *PLoS ONE*.
- Cantor, M.C., Neave, H.W. & Costa, J.H.C. (2019) Current perspectives on the short- and long-term effects of

- conventional dairy calf raising systems: a comparison with the natural environment. *Translational Animal Science*, 3, 549–563.
- Carrique-Mas, J.J., Willmington, J.A., Papadopoulou, C., Watson, E.N. & Davies, R.H. (2010) Salmonella infection in cattle in Great Britain, 2003 to 2008. *Veterinary Record*.
- Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X. & Gibbs, P. (2004) Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 14, 835–847.
- Casaux, L. (2018) Salmonella enterica en terneros lecheros de Uruguay: su rol como causal de enfermedad y mortalidad, caracterización de serotipos y resistencia a antibióticos. Tesis de Maestría en Salud Animal.
- Casey, P.G., Gardiner, G.E., Casey, G., Bradshaw, B., Lawlor, P.G., Lynch, P.B., Leonard, F.C., Stanton, C., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. & Hill, C. (2007) A five-strain probiotic combination reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in pigs challenged with Salmonella enterica serovar typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 1858–1863.
- Castells, M., Giannitti, F., Caffarena, R.D., Casaux, M.L., Schild, C., Castells, D., Riet-Correa, F., Victoria, M., Parreño, V. & Colina, R. (2019) Bovine coronavirus in Uruguay: genetic diversity, risk factors and transboundary introductions from neighboring countries. *Archives of Virology*, 1–10.
- Castro, J.J., Gomez, A., White, B., Loften, J.R. & Drackley, J.K. (2016) Changes in the intestinal bacterial community, short-chain fatty acid profile, and intestinal development of preweaned Holstein calves. 2. Effects of gastrointestinal site and age1. *Journal of Dairy Science*, 99, 9703–9715. Elsevier.
- Celi, P., Cowieson, A.J., Fru-Nji, F., Steinert, R.E., Kluenter, A.M. & Verlhac, V. (2017) Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: New opportunities for sustainable animal production. *Animal Feed Science and Technology*.
- Chapman, C.M.C., Gibson, G.R. & Rowland, I. (2012) In vitro evaluation of single- and multi-strain probiotics: Inter-species inhibition between probiotic strains, and inhibition of pathogens. *Anaerobe*.
- Chaucheyras-Durand, F. & Durand, H. (2010) Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial Microbes*, 1, 3–9.
- Cho, Y. il & Yoon, K.J. (2014) An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. *Journal of Veterinary Science*, 15, 1–17.
- Cho, Y. Il, Han, J.I., Wang, C., Cooper, V., Schwartz, K., Engelken, T. & Yoon, K.J. (2013) Case-control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea. *Veterinary Microbiology*, 166, 375–385. Elsevier B.V.
- Christensen, H.R., Frokiaer, H. & Pestka, J.J. (2002) Lactobacilli Differentially Modulate Expression of Cytokines and Maturation Surface Markers in Murine Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*.
- Clancy, R. (2003) Immunobiotics and the probiotic evolution. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*.
- Clark, S.T., Gilbride, K.A., Mehrvar, M., Laursen, A.E., Bostan, V., Pushchak, R. & McCarthy, L.H. (2011) Evaluation of low-copy genetic targets for waterborne bacterial pathogen detection via qPCR. *Water Research*, 45, 3378–3388.
- Cole, J.R., Wang, Q., Fish, J.A., Chai, B., McGarrell, D.M., Sun, Y., Brown, C.T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C.R. & Tiedje, J.M. (2014) Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 42, D633-D642.
- Collado, C., Isolauri, E., Salminen, S. & Sanz, Y. (2009) The Impact of Probiotic on Gut Health. *Current Drug Metabolism*, 10, 68–78.
- Collado, M.C., Meriluoto, J. & Salminen, S. (2007) Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Letters in Applied Microbiology*, 45, 454–460.
- Conlon, M.A. & Bird, A.R. (2015) The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients*.
- Constable, P.D., Hinchcliff, K.W., Done, S.H. & Grünberg, W. (2016) *Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. P. in.: 11th ed. Elsevier Health Sciences.
- Cook, S.M., Glass, R.I., LeBaron, C.W. & Ho, M.S. (1990) Global seasonality of rotavirus infections. *Bulletin of the World Health Organization*, 68, 171.
- Costa, L.F., Paixão, T.A., Tsolis, R.M., Bäumlner, A.J. & Santos, R.L. (2012) Salmonellosis in cattle: Advantages of being an experimental model. *Research in Veterinary Science*.
- Cotta, M. & Forster, R. (2006) The Family Lachnospiraceae, Including the Genera Butyrivibrio, Lachnospira and Roseburia. Pp. 1002–1021 in: *The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*.
- Cotter, P., Ross, R. & Hill, C. (2013) Bacteriocins: a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, 11,

- Coura, F.M., Freitas, M.D., Ribeiro, J., de Leme, R.A., de Souza, C., Alfieri, A.A., Facury Filho, E.J., de Carvalho, A.Ú., Silva, M.X., Lage, A.P. & Heinemann, M.B. (2014) Longitudinal study of Salmonella spp., diarrheagenic Escherichia coli, Rotavirus, and Coronavirus isolated from healthy and diarrheic calves in a Brazilian dairy herd. *Tropical Animal Health and Production*, 47, 3–11.
- Cross, M.L. (2002) Microbes versus microbes : immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. 34.
- Croxen, M.A. & Finlay, B.B. (2010) Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*. .
- Croxen, M.A., Law, R.J., Scholz, R., Keeney, K.M., Wlodarska, M. & Finlay, B.B. (2013) Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli. *Clinical Microbiology Reviews*. .
- Daneshvar, D., Khorvash, M., Ghasemi, E. & Mahdavi, A.H. (2017) Combination effects of milk feeding methods and starter crude protein concentration: Evaluation on performance and health of Holstein male calves. *Animal Feed Science and Technology*.
- Davis, C.L. & Drackley, J.K. (1998) *The development, nutrition, and management of the young calf*. P. in.: Iowa State University Press.
- Deelen, S.M., Ollivett, T.L., Haines, D.M. & Leslie, K.E. (2014) Evaluation of a Brix refractometer to estimate serum immunoglobulin G concentration in neonatal dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 97, 3838–44.
- Delcenserie, V., Martel, D., Lamoureux, M., Amiot, J., Boutin, Y. & Roy, D. (2008) Immunomodulatory Effects of Probiotics in the Intestinal Tract. *Current issues in molecular biology*, 10, 37–54.
- Dellaglio, F. & Felis, G.E. (2005) Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. P. in: *Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects* (G. Tannock, editor). Caister Academic Press.
- Delucchi, L., Fraga, M., Perelmuter, K., Cella, C. Della & Zunino, P. (2014) Effect of native lactobacillus murinus LbP2 administration on total fecal IgA in healthy dogs. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 78, 153–155.
- Denman, S.E. & McSweeney, C.S. (2006) Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. 58, 572–582.
- Denou, E., Pridmore, R.D., Berger, B., Panoff, J.M., Arigoni, F. & Brüssow, H. (2008) Identification of genes associated with the long-gut-persistence phenotype of the probiotic Lactobacillus johnsonii strain NCC533 using a combination of genomics and transcriptome analysis. *Journal of Bacteriology*, 190, 3161–3168.
- Dias, J., Marcondes, M.I., Noronha, M.F., Resende, R.T., Machado, F.S., Mantovani, H.C., Dill-McFarland, K.A. & Suen, G. (2017) Effect of pre-weaning diet on the ruminal archaeal, bacterial, and fungal communities of dairy calves. *Frontiers in Microbiology*.
- DIEA/MGAP. (2017) Anuario Estadístico Agropecuario. <<http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/diea-anuario2017web01a.pdf>>.
- Diez-Gonzalez, F. (2007) Applications of bacteriocins in livestock. *Current issues in intestinal microbiology*, 8, 15–23.
- Dill-McFarland, K.A., Breaker, J.D. & Suen, G. (2017) Microbial succession in the gastrointestinal tract of dairy cows from 2 weeks to first lactation. *Scientific Reports*.
- Dobson, A., Cotter, P.D., Paul Ross, R. & Hill, C. (2012) Bacteriocin production: A probiotic trait? *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 1–6.
- Dommels, Y., Kemperman, R., Zebregs, Y., Draaisma, R., Jol, A., Wolvers, D., Vaughan, E. & Albers, R. (2009) Survival of Lactobacillus reuteri DSM 17938 and Lactobacillus rhamnosus GG in the Human Gastrointestinal Tract with Daily Consumption of a Low-Fat Probiotic Spread. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 6198–6204.
- Donovan, D.C., Franklin, S.T., Chase, C.C.L. & Hippen, a R. (2002) Growth and health of Holstein calves fed milk replacers supplemented with antibiotics or Enteroguard. *Journal of Dairy Science*, 85, 947–950.
- Douillard, F.P., Ribbera, A., Kant, R., Pietilä, T.E., Järvinen, H.M., Messing, M., Randazzo, C.L., Paulin, L., Laine, P., Ritari, J., Caggia, C., Lähteinen, T., Brouns, S.J.J., Satokari, R., von Ossowski, I., Reunanen, J., Palva, A. & de Vos, W.M. (2013) Comparative Genomic and Functional Analysis of 100 Lactobacillus rhamnosus Strains and Their Comparison with Strain GG. *PLoS Genetics*.
- Drackley, J.K. (2008) Calf Nutrition from Birth to Breeding. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 24, 55–86.

- Dridi, B., Henry, M., El Khéchine, A., Raoult, D. & Drancourt, M. (2009) High prevalence of *Methanobrevibacter smithii* and *Methanosphaera stadtmanae* detected in the human gut using an improved DNA detection protocol. *PLoS ONE*.
- Du, R., Jiao, S., Dai, Y., Lv, J., Yan, X., Wang, J., An, J. & Han, B. (2018) Probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* C-1 Improves Growth Performance, Stimulates GH/IGF-1, and Regulates the Gut Microbiota of Growth-Retarded Beef Calves. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–12.
- Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., Quigley, E.M., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F. & Collins, J.K. (1999) Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie Van Leeuwenhoek*.
- Dunne, C., Mahony, L.O., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., Halloran, S.O., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., Sullivan, G.C.O., Shanahan, F. & Collins, J.K. (2001) In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin : correlation with in vivo findings. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 386–392.
- Egualé, T., Engidawork, E., Gebreyes, W.A., Asrat, D., Alemayehu, H., Medhin, G., Johnson, R.P. & Gunn, J.S. (2016) Fecal prevalence, serotype distribution and antimicrobial resistance of *Salmonellae* in dairy cattle in central Ethiopia. *BMC Microbiology*.
- Ehrmann, M.A., Kurzak, P., Bauer, J. & Vogel, R.F. (2002) Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 966–975.
- Ekwemalor, K., Asiamah, E., Osei, B., Ismail, H. & Worku, M. (2017) Evaluation of the effect of probiotic administration on gene expression in goat blood. *ournal of Molecular Biology Research*, 7, 88–98.
- El-Seedy, F.R., Abed, A.H., Yanni, H.A. & Abd El-Rahman, S.A.A. (2016) Prevalence of *Salmonella* and *E. coli* in neonatal diarrheic calves. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*.
- Elkins, C.A., Moser, S.A. & Savage, D.C. (2001) Genes encoding bile salt hydrolases and conjugated bile salt transporters in *Lactobacillus johnsonii* 100-100 and other *Lactobacillus* species. *Microbiology*.
- Enemark, H.L., Bille-Hansen, V., Lind, P., Heegaard, P.M.H., Vigre, H., Ahrens, P. & Thamsborg, S.M. (2003) Pathogenicity of *Cryptosporidium parvum* - Evaluation of an animal infection model. *Veterinary Parasitology*.
- Erickson, K.L. & Hubbard, N.E. (2000) Probiotic immunomodulation in health and disease. *The Journal of nutrition*, 130, 403–409.
- Erkkilä, S. & Petäjä, E. (2000) Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science*, 55, 297–300.
- Esvaran, M. & Conway, P.L. (2012) Strain dependent protection conferred by *Lactobacillus* spp. administered orally with a *Salmonella* Typhimurium vaccine in a murine challenge model. *Vaccine*.
- FAO/WHO. (2002) Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a Joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. <<ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>>.
- FAOSTAT. (2007) Annual Agricultural data. <<http://www.apps.fao.org/>>.
- Faraway, J.J. (2006) *Extending the Linear Model with R*. P. in: *Extending the Linear Model with R*.
- Fava, F., Lovegrove, J.A., Gitau, R., Jackson, K.G. & Tuohy, K.M. (2006) The Gut Microbiota and Lipid Metabolism: Implications for Human Health and Coronary Heart Disease. *Current Medicinal Chemistry*.
- Fayer, R., Gasbarre, L., Pasquali, P., Canals, A., Almeria, S. & Zarlenga, D. (1998) *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: Dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. P. in: *International Journal for Parasitology*.
- Felis, G.E. & Dellaglio, F. (2007) Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Current issues in intestinal microbiology*, 8, 44–61.
- Ferber, D. (2003) WHO advises kicking the livestock antibiotic habit. *Science*. .
- Fernández, M.F., Boris, S. & Barbés, C. (2003) Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 449–455.
- Fleckenstein, J.M., Hardwidge, P.R., Munson, G.P., Rasko, D.A., Sommerfelt, H. & Steinsland, H. (2010) Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microbes and Infection*. .
- Fleige, S., Preissinger, W., Meyer, H.H. & Pfaffl, M.W. (2009) The immunomodulatory effect of lactulose on *Enterococcus faecium* fed preruminant calves. *Journal of animal science*, 87, 1731–1738.

- Foditsch, C., Pereira, R.V.V., Ganda, E.K., Gomez, M.S., Marques, E.C., Santin, T. & Bicalho, R.C. (2015) Oral Administration of *Faecalibacterium prausnitzii* Decreased the Incidence of Severe Diarrhea and Related Mortality Rate and Increased Weight Gain in Preweaned Dairy Heifers. *Plos One*, 10, e0145485.
- Fomenky, B.E., Do, D.N., Talbot, G., Chiquette, J., Bissonnette, N., Chouinard, Y.P., Lessard, M. & Ibeagha-Awemu, E.M. (2018) Direct-fed microbial supplementation influences the bacteria community composition of the gastrointestinal tract of pre- and post-weaned calves. *Scientific Reports*, 8, 1–21.
- Foster, D.M. & Smith, G.W. (2009) Pathophysiology of Diarrhea in Calves. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 25, 13–36.
- Fraga, M., Perelmuter, K., Valencia, M.J., Martínez, M., Abin-Carriquiry, A., Cajarville, C. & Zunino, P. (2014) Evaluation of native potential probiotic bacteria using an in vitro ruminal fermentation system. *Annals of Microbiology*.
- Freitas, M., Tavan, E., Cayuela, C., Diop, L., Catherine, S. & Trugnan, G. (2003) Host-pathogens cross-talk. Indigenous bacteria and probiotics also play the game. *Biology of the Cell*.
- Frese, S.A., Benson, A.K., Tannock, G.W., Loach, D.M., Kim, J., Oh, P.L., Heng, N.C.K., Patil, P.B., Juge, N., Mackenzie, D.A., Pearson, B.M., Lapidus, A., Dalin, E., Tice, H., Goltsman, E., Land, M., Ivanova, N., Kyrpides, N.C. & Walter, J. (2011) The Evolution of Host Specialization in the Vertebrate Gut Symbiont *Lactobacillus reuteri*. *PLoS Genetics*, 7.
- Frizzo, L.S., Soto, L.P., Zbrun, M. V., Bertozzi, E., Sequeira, G., Armesto, R.R. & Rosmini, M.R. (2010a) Lactic acid bacteria to improve growth performance in young calves fed milk replacer and spray-dried whey powder. *Animal Feed Science and Technology*, 157, 159–167.
- Frizzo, L.S., Bertozzi, E., Soto, L.P., Sequeira, G.J., Rodriguez Armesto, R. & Rosmini, M.R. (2010b) Studies on translocation, acute oral toxicity and intestinal colonization of potentially probiotic lactic acid bacteria administered during calf rearing. *Livestock Science*, 128, 28–35.
- Fulde, M., Willenborg, J., Huber, C., Hitzmann, A., Willms, D., Seitz, M., Eisenreich, W., Valentin-Weigand, P. & Goethe, R. (2014) The arginine-ornithine antiporter ArcD contributes to biological fitness of *Streptococcus suis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*.
- Furet, J., Tailliez, P. & Que, P. (2004) Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 97, 197–207.
- Gaggia, F., Mattarelli, P. & Biavati, B. (2010) Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, 141, S15–S28.
- Galvão, K.N., Santos, J.E.P., Coscioni, A., Villaseñor, M., Sisecho, W.M. & Anna Catharina B. Berge. (2005) Effect of feeding live yeast products to calves with failure of passive transfer on performance and patterns of antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli*. *Reproduction Nutrition Development*.
- Genovese, K.J., Anderson, R.C., Harvey, R.B. & Nisbet, D.J. (2000) Competitive exclusion treatment reduces the mortality and fecal shedding associated with enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in nursery-raised neonatal pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 64, 204.
- Gerritsen, J., Smidt, H., Rijkers, G.T. & de Vos, W.M. (2011) Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes & nutrition*.
- Gilliland, M.G., Erb-Downward, J.R., Bassis, C.M., Shen, M.C., Toews, G.B., Young, V.B. & Huffnagle, G.B. (2012) Ecological Succession of Bacterial Communities during Conventionalization of Germ-Free Mice. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Godden, S. (2008) Colostrum Management for Dairy Calves. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*.
- Gomez, D.E., Arroyo, L.G., Costa, M.C., Viel, L. & Weese, J.S. (2017) Characterization of the Fecal Bacterial Microbiota of Healthy and Diarrheic Dairy Calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31, 928–939.
- Goulet, O. (2015) Potential role of the intestinal microbiota in programming health and disease. *Nutrition Reviews*.
- De Graaf, D.C., Vanopdenbosch, E., Ortega-Mora, L.M., Abbassi, H. & Peeters, J.E. (1999) A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *International Journal for Parasitology*.
- Guan, Y., Yang, H., Han, S., Feng, L., Wang, T. & Ge, J. (2017) Comparison of the gut microbiota composition between wild and captive sika deer (*Cervus nippon hortulorum*) from feces by high-throughput sequencing. *AMB Express*.

- Gutzeit, C., Magri, G. & Cerutti, A. (2014) Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction. *Immunological Reviews*. .
- Guy, R.A., Payment, P., Krull, U.J. & Horgen, P.A. (2003) Real-Time PCR for Quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Environmental Water Samples and Sewage. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 5178–5185.
- Guzman, C.E., Bereza-Malcolm, L.T., De Groef, B. & Franks, A.E. (2015) Presence of selected methanogens, fibrolytic bacteria, and proteobacteria in the gastrointestinal tract of neonatal dairy calves from birth to 72 hours. *PLoS ONE*.
- Hänninen, L., Hepola, H., Raussi, S. & Saloniemi, H. (2008) Effect of colostrum feeding method and presence of dam on the sleep, rest and sucking behaviour of newborn calves. *Applied Animal Behaviour Science*.
- Harp, J.A., Woodmansee, D.B. & Moon, H.W. (1990) Resistance of calves to *Cryptosporidium parvum*: Effects of age and previous exposure. *Infection and Immunity*.
- He, J., Hai, L., Orgoldol, K., Yi, L., Ming, L., Guo, F., Li, G. & Ji, R. (2019) High-Throughput Sequencing Reveals the Gut Microbiome of the Bactrian Camel in Different Ages. *Current Microbiology*.
- Heenan, C.N., Adams, M.C., Hosken, R.W. & Fleet, G.H. (2002) Growth medium for culturing probiotic bacteria for applications in vegetarian food products. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology*, 35, 171–176.
- Heinrichs, A.J., Jones, C.M. & Terrill, S.J. (2009) Effects of a prebiotic supplement on health of neonatal dairy calves. *Livestock Science*, 125, 149–154.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C. & Sanders, M.E. (2014) Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11, 506–514.
- Hill, M.J. (1997) Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. P. in: *European Journal of Cancer Prevention*.
- Hofmann, A.F. (1994) Bile acids. Pp. 677–718 in: *The Liver: Biology and Pathobiology* (I.M. Arias, J.L. Boyer, N. Fausto, D.A. Jackoby, D.A. Schachter & D. Shafritz, editors). 1st edition. New York: Raven Press Ltd.
- Hooper, L. V., Littman, D.R. & Macpherson, A.J. (2012) Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*. .
- Hötzel, M.J., Longo, C., Balcão, L.F., Cardoso, C.S. & Costa, J.H.C. (2014) A survey of management practices that influence performance and welfare of dairy calves reared in southern Brazil. *PLoS ONE*, 9, e114995.
- INALE. (2014) Primeros resultados de la Encuesta Lechera. <<http://www.inale.org/innovaportal/v/4086/4/innova.front/primeros-resultados-de-la-encuesta-lechera-inale-2014.html>>.
- Islam, K.B.M.S., Fukiya, S., Hagio, M., Fujii, N., Ishizuka, S., Ooka, T., Ogura, Y., Hayashi, T. & Yokota, A. (2011) Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. *Gastroenterology*.
- Isolauri, E., Arvilommi, H. & Salminen, S. (2001) Probiotics: effects on immunity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 444–450.
- Izquierdo, E., Medina, M., Ennahar, S., Marchioni, E. & Sanz, Y. (2008) Resistance to simulated gastrointestinal conditions and adhesion to mucus as probiotic criteria for *Bifidobacterium longum* strains. *Current Microbiology*, 56, 613–618.
- Jacobsen, C.N., Nielsen, V.R., Hayford, A.E. & Møller, P.L. (1999) Screening of Probiotic Activities of Forty-Seven Strains of *Lactobacillus* spp. by In Vitro Techniques and Evaluation of the Colonization Ability of Five Selected Strains in Humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4949–4956.
- Jami, E., Israel, A., Kotser, A. & Mizrahi, I. (2013) Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *The ISME Journal*, 7, 1069–1079. Nature Publishing Group.
- Janssen, P.H. & Kirs, M. (2008) Structure of the archaeal community of the rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. .
- Jatkauskas, J. & Vrotniakienė, V. (2014) Effects of Encapsulated Probiotic *Enterococcus Faecium* Strain on Diarrhoea Patterns and Performance of Early Weaned Calves. *Veterinari Medicina*, 67, 494–503.
- Jensen, H., Grimmer, S., Naterstad, K. & Axelsson, L. (2012) In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 216–222.

- Jothikumar, N. & Griffiths, M.W. (2002) Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 with multiplex real-time PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Juge, N. (2012) Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends in Microbiology*, 20, 30–39.
- Kaetzel, C.S. (2014) Cooperativity among secretory IgA, the polymeric immunoglobulin receptor, and the gut microbiota promotes host-microbial mutualism. *Immunology Letters*, 162, 10–21. Elsevier B.V.
- Kant, R., Paulin, L., Alatalo, E., De Vos, W.M. & Palva, A. (2011) Genome sequence of *Lactobacillus amylovorus* GRL1112. *Journal of Bacteriology*, 193, 789–790.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P. & Mobley, H.L. (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 357–361.
- Al Kassaa, I., Hober, D., Hamze, M., Chihib, N.E. & Drider, D. (2014) Antiviral Potential of Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*.
- Kertz, A.F., Hill, T.M., Quigley, J.D., Heinrichs, A.J., Linn, J.G. & Drackley, J.K. (2017) A 100-Year Review: Calf nutrition and management. *Journal of Dairy Science*.
- Khan, A. & Khan, M.Z. (1991) Aetiopathology of Neonatal Calf Mortality. *Veterinary Pathology*, 4, 159–165.
- Khan, M.A., Lee, H.J., Lee, W.S., Kim, H.S., Ki, K.S., Hur, T.Y., Suh, G.H., Kang, S.J. & Choi, Y.J. (2007) Structural Growth, Rumen Development, and Metabolic and Immune Responses of Holstein Male Calves Fed Milk Through Step-Down and Conventional Methods. *Journal of Dairy Science*.
- Khan, M.A., Weary, D.M. & von Keyserlingk, M.A.G. (2011) Invited review: Effects of milk ration on solid feed intake, weaning, and performance in dairy heifers. *Journal of Dairy Science*.
- Kim, M.K., Lee, H.G., Park, J.A., Kang, S.K. & Choi, Y.J. (2011) Effect of feeding direct-fed microbial as an alternative to antibiotics for the prophylaxis of calf diarrhea in holstein calves. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24, 643–649.
- Kirjavainen, P. V., Ouwehand, A.C., Isolauri, E. & Salminen, S.J. (1998) The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiology Letters*, 167, 185–189.
- Kleerebezem, M., Hols, P., Bernard, E., Rolain, T., Zhou, M., Siezen, R.J. & Bron, P.A. (2010) The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiology Reviews*.
- Kleessen, B. & Blaut, M. (2005) Modulation of gut mucosal biofilms. *British Journal of Nutrition*, 93, S35–S40.
- Klein-jöbstl, D., Schornsteiner, E., Mann, E., Wagner, M. & Drillich, M. (2014) Pyrosequencing reveals diverse fecal microbiota in Simmental calves during early development. 5, 1–8.
- Klein-Jöbstl, D., Iwersen, M. & Drillich, M. (2014) Farm characteristics and calf management practices on dairy farms with and without diarrhea: A case-control study to investigate risk factors for calf diarrhea. *Journal of Dairy Science*.
- Kneifel, W. & Salminen, S. (2010) *Probiotics and Health Claims*. P. in.: 1st edition. John Wiley & Sons,.
- Kolenda, R., Burdukiewicz, M. & Schierack, P. (2015) A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 5, 23.
- Kolter, R. & Greenberg, E.P. (2006) Microbial sciences: the superficial life of microbes. *Nature*, 441, 300–302.
- Konstantinov, S.R., Smidt, H. & Vos, W.M. De. (2005) Representational Difference Analysis and Real-Time PCR for Strain-Specific Quantification of *Lactobacillus sobrius* sp. nov. 71, 7578–7581.
- Konstantinov, S.R., Smidt, H., Akkermans, A.D.L., Casini, L., Trevisi, P., Filippi, S. De, Bosi, P. & Vos, W.M. De. (2008) Feeding of *Lactobacillus sobrius* reduces *Escherichia coli* F4 levels in the gut and promotes growth of infected piglets. *FEMS Microbiology Ecology*, 66, 599–607.
- Kowalski, Z.M., Górka, P., Schlagheck, A., Jagusiak, W. & Micek, P. (2009) Performance of Holstein calves fed milk-replacer and starter mixture supplemented with probiotic feed additive. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 18, 399–411.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547–1549.
- Kurdi, P., Kawanishi, K., Mizutani, K. & Yokota, A. (2006) Mechanism of growth inhibition by free bile acids in lactobacilli and bifidobacteria. *Journal of bacteriology*.
- Lähteinen, T., Malinen, E., Koort, J.M.K., Mertaniemi-Hannus, U., Hankimo, T., Karikoski, N., Pakkanen, S., Laine, H., Sillanpää, H., Söderholm, H. & Palva, A. (2010) Probiotic properties of *Lactobacillus* isolates originating from

- porcine intestine and feces. *Anaerobe*, 16, 293–300.
- Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. Pp. 115–175 in: *Stackebrandt E, Goodfellow M, Editors. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*.
- Lebeer, S., Verhoeven, T.L.A., Vélez, M.P., Vanderleyden, J. & De Keersmaecker, S.C.J. (2007) Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 6768–6775.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J. & De Keersmaecker, S.C.J. (2008) Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiology and Molecular Biology Reviewseviews*, 72, 728–764.
- Lebeer, S., Verhoeven, T.L.A., Claes, I.J.J., De Hertogh, G., Vermeire, S., Buyse, J., Van Immerseel, F., Vanderleyden, J. & De Keersmaecker, S.C.J. (2011) FISH analysis of *Lactobacillus* biofilms in the gastrointestinal tract of different hosts. *Letters in Applied Microbiology*, 52, 220–226.
- Lee, K.B., Lee, H.G. & Choi, Y.J. (2008) Proteomic analysis of the effect of bile salts on the intestinal and probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Biotechnology*.
- Lee, Y.K., Puong, K.Y., Ouwehand, A.C. & Salminen, S. (2003) Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *Journal of Medical Microbiology*, 52, 925–930.
- Liang, G., Malmuthuge, N., Bao, H., Stothard, P., Griebel, P.J. & Guan, L.L. (2016) Transcriptome analysis reveals regional and temporal differences in mucosal immune system development in the small intestine of neonatal calves. *BMC Genomics*, 17, 602.
- Liévin-Le Moal, V. & Servin, A.L. (2014) Anti-infective activities of lactobacillus strains in the human intestinal microbiota: from probiotics to gastrointestinal anti-infectious biotherapeutic agents. *Clinical microbiology reviews*, 27, 167–199.
- Lorenz, I., Fagan, J. & More, S.J. (2011) Calf health from birth to weaning. II. Management of diarrhoea in pre-weaned calves. *Irish Veterinary Journal*, 64, 9.
- Love, M.I., Huber, W. & Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*.
- Macfarlane, S. & Dillon, J.F. (2007) Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. P. in: *Journal of Applied Microbiology*.
- MacKenzie, D.A., Jeffers, F., Parker, M.L., Vibert-Vallet, A., Bongaerts, R.J., Roos, S., Walter, J. & Juge, N. (2010) Strain-specific diversity of mucus-binding proteins in the adhesion and aggregation properties of *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology*, 156, 3368–3378.
- Macpherson, A.J., Geuking, M.B., Slack, E., Hapfelmeier, S. & McCoy, K.D. (2012) The habitat, double life, citizenship, and forgetfulness of IgA. *Immunological Reviews*. .
- Magalhães, V.J.A., Susca, F., Lima, F.S., Branco, A.F., Yoon, I. & Santos, J.E.P. (2008) Effect of Feeding Yeast Culture on Performance, Health, and Immunocompetence of Dairy Calves. *Journal of Dairy Science*, 91, 1497–1509.
- Mainil, J. (2013) *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*.
- Maldonado, N.C., de Ruiz, C.S., Otero, M.C., Sesma, F. & Nader-Macías, M.E. (2012) Lactic acid bacteria isolated from young calves - Characterization and potential as probiotics. *Research in Veterinary Science*, 92, 342–349.
- Malmuthuge, N. & Guan, L.L. (2017) Understanding the gut microbiome of dairy calves: Opportunities to improve early-life gut health. *Journal of Dairy Science*, 100, 5996–6005. American Dairy Science Association.
- Malmuthuge, N., Li, M., Goonewardene, L.A., Oba, M. & Guan, L.L. (2013) Effect of calf starter feeding on gut microbial diversity and expression of genes involved in host immune responses and tight junctions in dairy calves during weaning transition. *Journal of dairy science*, 96, 3189–200. Elsevier.
- Malmuthuge, N., Chen, Y., Liang, G., Goonewardene, L.A. & Guan, L.L. (2015a) Heat-treated colostrum feeding promotes beneficial bacteria colonization in the small intestine of neonatal calves. *Journal of Dairy Science*.
- Malmuthuge, N., Griebel, P.J. & Guan, L.L. (2015b) The gut microbiome and its potential role in the development and function of newborn calf gastrointestinal tract. *Frontiers in Veterinary Science*, 2, 1–10.
- Malorny, B., Hoorfar, J., Bunge, C. & Helmuth, R. (2003) Multicenter validation of the analytical accuracy of salmonella PCR: Towards an international standard. *Applied and Environmental Microbiology*.
- De Man, J., Rogosa, D. & Sharpe, M. (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 1, 130–135.

- Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. & Tsakalidou, E. (2006) Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16, 189–199.
- Marco, M.L., Pavan, S. & Kleerebezem, M. (2006) Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Current Opinion in Biotechnology*, 17, 204–210.
- Marranzino, G., Villena, J., Salva, S. & Alvarez, S. (2012) Stimulation of macrophages by immunobiotic Lactobacillus strains: Influence beyond the intestinal tract. *Microbiology and Immunology*, 56, 771–781.
- Martín, R., Soberón, N., Vanechoutte, M., Flórez, A.B., Vázquez, F. & Suárez, J.E. (2008) Characterization of indigenous vaginal lactobacilli from healthy women as probiotic candidates. *International Microbiology*, 11, 261–266.
- Matsuzaki, T. & Chin, J. (2000) Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunology and Cell Biology*, 78, 67–73.
- Al Mawly, J., Grinberg, A., Prattley, D., Moffat, J. & French, N. (2015) Prevalence of endemic enteropathogens of calves in New Zealand dairy farms. *New Zealand Veterinary Journal*, 63, 147–152.
- McAuliffe, O., Ross, R.P. & Hill, C. (2001) Lantibiotics: Structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*. .
- Meale, S.J., Li, S., Azevedo, P., Derakhshani, H., Plaizier, J.C., Khafipour, E. & Steele, M.A. (2016) Development of ruminal and fecal microbiomes are affected by weaning but not weaning strategy in dairy calves. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–16.
- Meale, S.J., Chaucheyras-Durand, F., Berends, H., Guan, L.L. & Steele, M.A. (2017) From pre- to postweaning: Transformation of the young calf's gastrointestinal tract. *Journal of Dairy Science*, 100, 5984–5995. American Dairy Science Association.
- Meganck, V., Hoflack, G. & Opsomer, G. (2014) Advances in prevention and therapy of neonatal dairy calf diarrhoea: A systematic review with emphasis on colostrum management and fluid therapy. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56, 75.
- Meganck, V., Hoflack, G., Piepers, S. & Opsomer, G. (2015) Evaluation of a protocol to reduce the incidence of neonatal calf diarrhoea on dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*.
- Meireles, M. V., De Oliveira, F.P., Teixeira, W.F.P., Coelho, W.M.D. & Mendes, L.C.N. (2011) Molecular characterization of Cryptosporidium spp. in dairy calves from the state of São Paulo, Brazil. *Parasitology Research*.
- Meng, X.C., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Daly, C. & Ross, R.P. (2008) Anhydrotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry*.
- Mercado, E.C., Rodríguez, S.M., D'Antuono, A.L., Cipolla, A.L., Elizondo, A.M., Rossetti, C.A., Malena, R. & Méndez, M.A. (2003) Occurrence and characteristics of CS31A antigen-producing Escherichia coli in calves with diarrhoea and septicaemia in Argentina. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*.
- Michelland, R.J., Monteils, V., Zened, A., Combes, S., Cauquil, L., Gidenne, T., Hamelin, J. & Fortun-Lamothe, L. (2009) Spatial and temporal variations of the bacterial community in the bovine digestive tract. *Journal of Applied Microbiology*.
- Miettinen, M., Matikainen, S., Vuopio-Varkila, J., Pirhonen, J., Varkila, K., Kurimoto, M. & Julkunen, I. (1998) Lactobacilli and streptococci induce interleukin-12 (IL-12), IL-18, and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells. *Infection and Immunity*.
- Minuti, A., Palladino, A., Khan, M.J., Alqarni, S., Agrawal, A., Piccioli-Capelli, F., Hidalgo, F., Cardoso, F.C., Trevisi, E. & Loor, J.J. (2015) Abundance of ruminal bacteria, epithelial gene expression, and systemic biomarkers of metabolism and inflammation are altered during the periparturition period in dairy cows. *Journal of Dairy Science*.
- Miyauchi, E., Morita, H. & Tanabe, S. (2009) Lactobacillus rhamnosus alleviates intestinal barrier dysfunction in part by increasing expression of zonula occludens-1 and myosin light-chain kinase in vivo. *Journal of Dairy Science*.
- Mohler, V.L., Izzo, M.M. & House, J.K. (2009) Salmonella in Calves. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 25, 37–54. Elsevier Inc.
- Monteagudo-Mera, A., Rodríguez-Aparicio, L., Rúa, J., Martínez-Blanco, H., Navasa, N., García-Armesto, M.R. & Ferrero, M. ángel. (2012) In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *Journal of Functional Foods*, 4, 531–541.
- Morelli, L. (2000) In Vitro Selection of Probiotic Lactobacilli: A Critical Appraisal. *Current Issues in Intestinal*

- Microbiology*, 1, 59–67.
- Morelli, L. (2007) In vitro assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality. *International Dairy Journal*, 17, 1278–1283.
- Morrill, K.M., Polo, J., Lago, A., Campbell, J., Quigley, J. & Tyler, H. (2013) Estimate of serum immunoglobulin G concentration using refractometry with or without caprylic acid fractionation. *Journal of Dairy Science*, 96, 4535–41.
- Muktar, Y., Mamo, G., Tesfaye, B. & Belina, D. (2015) A review on major bacterial causes of calf diarrhea and its diagnostic method. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*. .
- Muller, L.D. & Ellinger, D.K. (1981) Colostral Immunoglobulin Concentrations Among Breeds of Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 64.
- Musa, H.H., Wu, S.L., Zhu, C.H., Seri, H.I. & Zhu, G.Q. (2009) The potential benefits of probiotics in animal production and health. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8, 313–321.
- Nagy, B. & Fekete, P.Z. (2005) Enterotoxigenic Escherichia coli in veterinary medicine. *International Journal of Medical Microbiology*. .
- Nielsen, L.R. (2013) Review of pathogenesis and diagnostic methods of immediate relevance for epidemiology and control of Salmonella Dublin in cattle. *Veterinary Microbiology*. .
- Nourmohammadzadeh, F., Davoudi, Y., Abdollahpour, G. & Nouri, A. (2012) The prevalence of rotavirus in neonatal calf diarrhoea, using electron microscopic examination. *Comparative Clinical Pathology*, 21, 1231–1234.
- O’Handley, R.M., Cockwill, C., McAllister, T.A., Jelinski, M., Morck, D.W. & Olson, M.E. (1999) Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. *Journal of the American Veterinary Medical Association*.
- O’Hara, A.M., O’Regan, P., Fanning, Á., O’Mahony, C., MacSharry, J., Lyons, A., Bienenstock, J., O’Mahony, L. & Shanahan, F. (2006) Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by Bifidobacterium infantis and Lactobacillus salivarius. *Immunology*.
- O’Shea, E.F., Cotter, P.D., Stanton, C., Ross, R.P. & Hill, C. (2012) Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: Bacteriocins and conjugated linoleic acid. *International Journal of Food Microbiology*, 152, 189–205.
- O’Toole, P.W. & Claesson, M.J. (2010) Gut microbiota: Changes throughout the lifespan from infancy to elderly. *International Dairy Journal*. .
- O’Toole, P.W. & Cooney, J.C. (2008) Probiotic Bacteria Influence the Composition and Function of the Intestinal Microbiota. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*.
- Ocaña, V.S. & Nader-Macías, M.. (2002) Vaginal lactobacilli: self-and co-aggregating ability. *British Journal of Biomedical Science*, 59, 183–190.
- Ogawa, M., Shimizu, K., Nomoto, K., Takahashi, M., Watanuki, M., Tanaka, R., Tanaka, T., Hamabata, T., Yamasaki, S. & Takeda, Y. (2001) Protective Effect of Lactobacillus casei Strain Shirota on Shiga Toxin-Producing Escherichia coli O157: H7 Infection in Infant Rabbits. *Infection and Immunity*, 69, 1101–1108.
- Oh, K.H., Kim, S.B., Park, M.S. & Cho, S.H. (2014) Development of a one-step PCR assay with nine primer pairs for the detection of five diarrheagenic escherichia coli types. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 862–868.
- Oikonomou, G., Gustavo, A., Teixeira, V., Foditsch, C., Bicalho, M.L., Machado, S. & Bicalho, R.C. (2013) Fecal Microbial Diversity in Pre-Weaned Dairy Calves as Described by Pyrosequencing of Metagenomic 16S rDNA . Associations of Faecalibacterium Species with Health and Growth. 8.
- Ok, M., Güler, L., Turgut, K., Ok, Ü., Şen, I., Gündüz, I.K., Birdane, M.F. & Güzelbekteş, H. (2009) The studies on the aetiology of diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of Escherichia coli strains by multiplex PCR. *Zoonoses and Public Health*, 56, 94–101.
- Oksanen, J., Blanchet, F., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P.R., O’Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E. & Wagner, H. (2019) vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-4.
- Omidi-Mirzaei, H., Khorvash, M., Ghorbani, G.R., Moshiri, B., Mirzaei, M., Pezeshki, A. & Ghaffari, M.H. (2015) Effects of the step-up/step-down and step-down milk feeding procedures on the performance, structural growth, and blood metabolites of Holstein dairy calves. *Journal of Dairy Science*.
- Oscáriz, J.C. & Pisabarro, A.G. (2001) Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by

- gram-positive bacteria. *International Microbiology*.
- Östblom, A., Adlerberth, I., Wold, A.E. & Nowrouzian, F.L. (2011) Pathogenicity Island Markers, Virulence Determinants malX and usp, and the Capacity of Escherichia coli To Persist in Infants' Commensal Microbiotas. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Ouwehand, A.C. (1998) Antimicrobial components from lactic acid bacteria. P. in: *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects* (S. Salminen & A. von Wright, editors). 2nd edition. New York: Marcel Dekker Inc.
- Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P. V., Grönlund, M.M., Isolauri, E. & Salminen, S.J. (1999) Adhesion of probiotic microorganisms to intestinal mucus. *International Dairy Journal*, 9, 623–630.
- Ouwehand, A.C., Tuomola, E.M., Tölkö, S. & Salminen, S. (2001) Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 119–126.
- Van Overtvelt, L., Moussu, H., Horiot, S., Samson, S., Lombardi, V., Mascarell, L., van de Moer, A., Bourdet-Sicard, R. & Moingeon, P. (2010) Lactic acid bacteria as adjuvants for sublingual allergy vaccines. *Vaccine*.
- Owen, J.L., Sahay, B. & Mohamadzadeh, M. (2013) New generation of oral mucosal vaccines targeting dendritic cells. *Current Opinion in Chemical Biology*.
- Papadimitriou, K., Zoumpopoulou, G., Foligné, B., Alexandraki, V., Kazou, M., Pot, B. & Tsakalidou, E. (2015) Discovering probiotic microorganisms: In vitro, in vivo, genetic and omics approaches. *Frontiers in Microbiology*.
- Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P.A., de Angelis, M., Gobetti, M., Kleerebezem, M., Lemos, J.A., Linares, D.M., Ross, P., Stanton, C., Turrone, F., van Sinderen, D., Varmanen, P., Ventura, M., Zúñiga, M., Tsakalidou, E. & Kok, J. (2016) Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*.
- Patel, M.M., Pitzer, V.E., Alonso, W.J., Vera, D., Lopman, B., Tate, J., Viboud, C. & Parashar, U.D. (2013) Global seasonality of rotavirus disease. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 32, e134.
- Pathak, M. & Martirosyan, D. (2012) Optimization of an effective growth medium for culturing probiotic bacteria for applications in strict vegetarian food products. *Research Article: Functional Food in Health and Disease*, 2, 369–378.
- de Paula, M.R., Oltramari, C.E., Silva, J.T., Gallo, M.P.C., Mourão, G.B. & Bittar, C.M.M. (2017) Intensive liquid feeding of dairy calves with a medium crude protein milk replacer: Effects on performance, rumen, and blood parameters. *Journal of Dairy Science*.
- Perelmuter, K., Fraga, M. & Zunino, P. (2008) In vitro activity of potential probiotic Lactobacillus murinus isolated from the dog. *Journal of Applied Microbiology*, 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 Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 1725–1730.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29, e45.
- Pompilio, A., Piccolomini, R., Picciani, C., D'Antonio, D., Savini, V. & Di Bonaventura, G. (2008) Factors associated with adherence to and biofilm formation on polystyrene by Stenotrophomonas maltophilia: The role of cell surface hydrophobicity and motility. *FEMS Microbiology Letters*, 287, 41–47.
- Pompilio, A., Crocetta, V., Confalone, P., Nicoletti, M., Petrucca, A., Guarneri, S., Fiscarelli, E., Savini, V., Piccolomini, R. & Di Bonaventura, G. (2010) Adhesion to and biofilm formation on IB3-1 bronchial cells by Stenotrophomonas maltophilia isolates from cystic fibrosis patients. *BMC Microbiology*, 10, 102.
- Pridmore, R.D., Berger, B., Desiere, F., Vilanova, D., Barretto, C., Pittet, A.-C., Zwahlen, M.-C., Rouvet, M., Altermann, E., Barrangou, R., Mollet, B., Mercenier, A., Klaenhammer, T., Arigoni, F. & Schell, M.A. (2004) The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium Lactobacillus johnsonii NCC 533. *PNAS*, 101, 2512–7.
- Pritchett, L.C., Gay, C.C., Besser, T.E. & Hancock, D.D. (1991) Management and Production Factors Influencing Immunoglobulin G1 Concentration in Colostrum from Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*, 74.
- Proudfoot, K. & Habing, G. (2015) Social stress as a cause of diseases in farm animals: Current knowledge and future directions. *The Veterinary Journal*.
- Puech, C., Dedieu, L., Chantal, I. & Rodrigues, V. (2015) Design and evaluation of a unique SYBR Green real-time RT-PCR assay for quantification of five major cytokines in cattle, sheep and goats. *BMC Veterinary Research*, 11, 1–14.
- Qadis, A.Q., Goya, S., Yatsu, M., Yoshida, Y. & Ichijo, T. (2013) Effects of a Bacteria-Based Probiotic on Subpopulations of Peripheral Leukocytes and Their Cytokine mRNA Expression in Calves.

- Qiao, H., Duffy, L., Griffiths, E., Dryja, D., Leavens, A., Rossman, J., Rich, G., Riepenhoff-Talty, M. & Locniskar, M. (2002) Immune responses in rhesus rotavirus-challenged BALB/c mice treated with bifidobacteria and prebiotic supplements. *Pediatric research*, 6, 750.
- Quigley, J.D., Wolfe, T.A. & Elsasser, T.H. (2010) Effects of Additional Milk Replacer Feeding on Calf Health, Growth, and Selected Blood Metabolites in Calves. *Journal of Dairy Science*.
- Raboisson, D., Delor, F., Cahuzac, E., Gendre, C., Sans, P. & Allaire, G. (2013) Perinatal, neonatal, and rearing period mortality of dairy calves and replacement heifers in France. *Journal of Dairy Science*, 96, 2913–2924.
- Rai, V., Yadav, B. & Lakhani, G. (2013) Application of probiotic and prebiotic in animals production: a review. *Environment and Ecology*, 31, 873–876.
- Rainey, F.A. (2015) Ruminococcaceae fam. nov. . P. in: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*.
- Rajaram, S. & Oono, Y. (2010) NeatMap - non-clustering heat map alternatives in R. *BMC Bioinformatics*.
- Raveh-Sadka, T., Firek, B., Sharon, I., Baker, R., Brown, C.T., Thomas, B.C., Morowitz, M.J. & Banfield, J.F. (2016) Evidence for persistent and shared bacterial strains against a background of largely unique gut colonization in hospitalized premature infants. *ISME Journal*.
- Reid, G., Younes, J.A., Van der Mei, H.C., Gloor, G.B., Knight, R. & Busscher, H.J. (2011) Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nature reviews. Microbiology*, 9, 27–38. Nature Publishing Group.
- Reséndiz-Albor, A.A., Reina-Garfias, H., Rojas-Hernández, S., Jarillo-Luna, A., Rivera-Aguilar, V., Miliar-García, A. & Campos-Rodríguez, R. (2010) Regionalization of pIgR expression in the mucosa of mouse small intestine. *Immunology Letters*, 128, 59–67.
- Riddell, J.B., Mcleod, K.R. & Cv, S.A. De. (2010) Addition of a Bacillus based probiotic to the diet of preruminant calves: Influence on growth, health, and blood parameters. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 8, 78–85.
- Ripamonti, B., Agazzi, A., Bersani, C., De Dea, P., Pecorini, C., Pirani, S., Rebucci, R., Savoini, G., Stella, S., Stenico, A., Tirloni, E. & Domeneghini, C. (2011) Screening of species-specific lactic acid bacteria for veal calves multi-strain probiotic adjuncts. *Anaerobe*, 17, 97–105. Elsevier Ltd.
- Ripley, B., Venables, B., Bates, D.M., Hornik, K., Gebhardt, A., Firth, D. & Ripley, M.B. (2013) Package “mass.” Cran R.
- Rodríguez-Palacios, A., Staempfli, H.R., Duffield, T. & Weese, J.S. (2009) Isolation of bovine intestinal *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici* with inhibitory activity against *Escherichia coli* O157 and F5. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 393–401.
- Rooks, M.G. & Garrett, W.S. (2016) Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nature reviews. Immunology*, 16, 341–52. Nature Publishing Group.
- Round, J.L. & Mazmanian, S.K. (2009) The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature reviews. Immunology*.
- Ruiz, L., Margolles, A. & Sánchez, B. (2013) Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Frontiers in Microbiology*.
- Ryan, U., Fayer, R. & Xiao, L. (2014) *Cryptosporidium* species in humans and animals: Current understanding and research needs. *Parasitology*.
- Sánchez, B., Bressollier, P. & Urdaci, M.C. (2008) Exported proteins in probiotic bacteria: Adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular cross-talking with the host. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 54, 1–17.
- Sandes, S., Alvim, L., Silva, B., Acurcio, L., Santos, C., Campos, M., Santos, C., Nicoli, J., Neumann, E. & Nunes, Á. (2017) Selection of new lactic acid bacteria strains bearing probiotic features from mucosal microbiota of healthy calves: Looking for immunobiotics through in vitro and in vivo approaches for immunoprophylaxis applications. *Microbiological Research*, 200, 1–13. Elsevier GmbH.
- Santín, M., Trout, J.M., Xiao, L., Zhou, L., Greiner, E. & Fayer, R. (2004) Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Veterinary Parasitology*.
- Sarker, M.S.K., Ko, S.Y., Lee, S.M., Kim, G.M., Choi, J.K. & Yang, C.J. (2010) Effect of Different Feed Additives on Growth Performance and Blood Profiles of Korean Hanwoo Calves \*. 23, 52–60.
- Sartor, R.B. & Mazmanian, S.K. (2012) Intestinal Microbes in Inflammatory Bowel Diseases. *The American Journal of*

*Gastroenterology Supplements.*

- Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T. & De Vos, W.M. (2005) Probiotic and other functional microbes: From markets to mechanisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 204–211.
- Schild, C. (2017) Caracterización de los sistemas de crianza y parto y estimación de las tasas de mortalidad de terneros y abortos vistos en establecimientos lecheros de Uruguay. Universidad de la República.
- Schliep, K.P. (2011) phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*, 27, 592–593.
- Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C.M. & Finlay, B.B. (2010) Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*, 90.
- Servin, A.L. (2004) Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. 28, 405–440.
- Servin, A.L. & Coconnier, M.H. (2003) Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology*, 17, 741–754.
- Shin, J., Noh, J.-R., Chang, D.-H., Kim, Y.-H., Kim, M.H., Lee, E.S., Cho, S., Ku, B.J., Rhee, M.-S., Kim, B.-C., Lee, C.-H. & Cho, B.-K. (2019) Elucidation of Akkermansia muciniphila Probiotic Traits Driven by Mucin Depletion. *Frontiers in Microbiology*.
- Signorini, M.L., Soto, L.P., Zbrun, M. V., Sequeira, G.J., Rosmini, M.R. & Frizzo, L.S. (2012) Impact of probiotic administration on the health and fecal microbiota of young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials of lactic acid bacteria. *Research in Veterinary Science*, 93, 250–258.
- Silverlås, C., De Verdier, K., Emanuelson, U., Mattsson, J.G. & Björkman, C. (2010) Cryptosporidium infection in herds with and without calf diarrhoeal problems. *Parasitology Research*.
- Simon, O. (2005) Micro-organisms as feed additives-probiotics. *Advances in Pork Production*.
- Smillie, C.S., Sauk, J., Gevers, D., Friedman, J., Sung, J., Youngster, I., Hohmann, E.L., Staley, C., Khoruts, A., Sadowsky, M.J., Allegretti, J.R., Smith, M.B., Xavier, R.J. & Alm, E.J. (2018) Strain Tracking Reveals the Determinants of Bacterial Engraftment in the Human Gut Following Fecal Microbiota Transplantation. *Cell Host and Microbe*.
- Smith, D.R. (2012) Field Disease Diagnostic Investigation of Neonatal Calf Diarrhea. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 28, 465–481. Elsevier Inc.
- Smith, G. (2015) Antimicrobial decision making for enteric diseases of cattle. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*.
- Soberon, F., Raffrenato, E., Everett, R.W. & Van Amburgh, M.E. (2012) Prewaning milk replacer intake and effects on long-term productivity of dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 95, 783–793.
- Sommer, F. & Bäckhed, F. (2013) The gut microbiota-masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*.
- Sommer, F., Anderson, J.M., Bharti, R., Raes, J. & Rosenstiel, P. (2017) The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 15, 630–638. Nature Publishing Group.
- Soto, L.P., Zbrun, M. V., Frizzo, L.S., Signorini, M.L., Sequeira, G.J. & Rosmini, M.R. (2014) Effects of bacterial inoculants in milk on the performance of intensively reared calves. *Animal Feed Science and Technology*, 189, 117–122.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B. & Švabić-Vlahović, M. (2000) A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40, 175–179.
- Stott, G.H., Marx, D.B., Menefee, B.E. & Nightengale, G.T. (1979a) Colostral Immunoglobulin Transfer in Calves I. Period of Absorption. *Journal of Dairy Science*, 62.
- Stott, G.H., Marx, D.B., Menefee, B.E. & Nightengale, G.T. (1979b) Colostral Immunoglobulin Transfer in Calves II. The Rate of Absorption. *Journal of Dairy Science*, 62.
- Su, J., Li, J., Zheng, H., You, Y., Luo, X., Li, Y., Li, X., Xusheng, M., Li, J., Dou, Y. & Cai, X. (2014) Adjuvant effects of *L. acidophilus* LW1 on immune responses to the foot-and-mouth disease virus DNA vaccine in mice. *PLoS ONE*.
- Swiatek, D.L., Palombo, E.A., Lee, A., Coventry, M.J., Britz, M.L. & Kirkwood, C.D. (2010) Detection and analysis of bovine rotavirus strains circulating in Australian calves during 2004 and 2005. *Veterinary Microbiology*.
- Tarahomjoo, S. (2012) Development of vaccine delivery vehicles based on lactic acid bacteria. *Molecular Biotechnology*.
- Taschuk, R. & Griebel, P. (2012) Commensal microbiome effects on mucosal immune system development in the

- ruminant gastrointestinal tract. *Animal health research reviews*, 1.
- Thornhill, J.B., Krebs, G.L. & Petzel, C.E. (2015) Evaluation of the Brix refractometer as an on-farm tool for the detection of passive transfer of immunity in dairy calves. *Australian Veterinary Journal*, 93, 26–30.
- Timmerman, H.M., Mulder, L., Everts, H., Espen, D.C. Van, Wal, E. Van Der, Klaassen, G., Rouwers, S.M.G., Hartemink, R., Rombouts, F.M. & Beynen, A.C. (2005) Health and Growth of Veal Calves Fed Milk Replacers With or Without Probiotics. *Journal of Dairy Science*, 88, 2154–2165. Elsevier.
- Tokura, M., Chagan, I., Ushida, K. & Kojima, Y. (1999) Phylogenetic study of methanogens associated with rumen ciliates. *Current Microbiology*.
- Tokura, M., Tajima, K. & Ushida, K. (2005) Isolation of *Methanobrevibacter* sp. as a ciliate-associated ruminal methanogen. *The Journal of General and Applied Microbiology*.
- Tomkins, T. & Jaster, E.H. (1991) Preruminant calf nutrition. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*.
- Tsai, Y.T., Cheng, P.C., Fan, C.K. & Pan, T.M. (2008) Time-dependent persistence of enhanced immune response by a potential probiotic strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101. *International Journal of Food Microbiology*.
- Tsai, Y.T., Cheng, P.C. & Pan, T.M. (2012) The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Tyler, J.W., Hancock, D.D., Wiksie, S.E., Holler, S.L., Gay, J.M. & Gay, C.C. (1998) Use of serum protein concentration to predict mortality in mixed-source dairy replacement heifers. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*.
- Tzipori, S. & Ward, H. (2002) Cryptosporidiosis: Biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection*.
- Ubeda, C., Djukovic, A. & Isaac, S. (2017) Roles of the intestinal microbiota in pathogen protection. *Clinical & Translational Immunology*.
- Uetake, K. (2013) Newborn calf welfare: A review focusing on mortality rates. *Animal Science Journal*.
- Umpiérrez, A., Acquistapace, S., Fernández, S., Oliver, M., Acuña, P., Reolón, E. & Zunino, P. (2016) Prevalence of *Escherichia coli* adhesion-related genes in neonatal calf diarrhea in Uruguay. *Journal of Infection in Developing Countries*, 10, 472–477.
- USDA. (2010) Heifer Calf Health and Management Practices on US Dairy Operations. *USDA, Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services, Center for Epidemiology and Animal Health, Fort Collins, CO*.
- Uyeno, Y., Sekiguchi, Y. & Kamagata, Y. (2010) rRNA-based analysis to monitor succession of faecal bacterial communities in Holstein calves. *Letters in Applied Microbiology*, 51, 570–577.
- Uyeno, Y., Shigemori, S. & Shimosato, T. (2015) Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity. *Microbes and environments* *Microbes and Environments*, 30, 126–132.
- Vandenbergh, P. (1993) Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 221–237.
- Varankovich, N. V., Nickerson, M.T. & Korber, D.R. (2015) Probiotic-based strategies for therapeutic and prophylactic use against multiple gastrointestinal diseases. *Frontiers in Microbiology*.
- Vasseur, E., Pellerin, D., De Passillé, A.M., Winckler, C., Lensink, B.J., Knierim, U. & Rushen, J. (2012) Assessing the welfare of dairy calves: Outcome-based measures of calf health versus input-based measures of the use of risky management practices. *Animal Welfare*, 21, 77–86.
- Vaughan, E.E., De Vries, M.C., Zoetendal, E.G., Ben-Amor, K., Akkermans, A.D.L. & De Vos, W.M. (2002) The intestinal LABs. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*.
- Vélez, M.P., De Keersmaecker, S.C.J. & Vanderleyden, J. (2007) Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiology Letters*, 276, 140–148.
- Vélez, M.P., Petrova, M.I., Lebeer, S., Verhoeven, T.L.A., Claes, I., Lambrichts, I., Tynkkynen, S., Vanderleyden, J. & De Keersmaecker, S.C.J. (2010) Characterization of MabA, a modulator of *Lactobacillus rhamnosus* GG adhesion and biofilm formation. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 59, 386–398.
- Ventura, B. a, von Keyserlingk, M. a G., Schuppli, C. a & Weary, D.M. (2013) Views on contentious practices in dairy farming: the case of early cow-calf separation. *Journal of Dairy Science*, 96, 6105–16.
- Ventura, M., O’Flaherty, S., Claesson, M.J., Turrone, F., Klaenhammer, T.R., van Sinderen, D. & O’Toole, P.W. (2009) Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: Probiogenomics. *Nature Reviews Microbiology*.

- Victoria, M., Tort, L.F.L., García, M., Lizasoain, A., Maya, L., Leite, J.P.G., Miagostovich, M.P., Cristina, J. & Colina, R. (2014) Assessment of Gastroenteric Viruses from Wastewater Directly Discharged into Uruguay River, Uruguay. *Food and Environmental Virology*, 6, 116–124.
- Villena, J., Oliveira, M.L.S., Ferreira, P.C.D., Salva, S. & Alvarez, S. (2011) Lactic acid bacteria in the prevention of pneumococcal respiratory infection: Future opportunities and challenges. *International Immunopharmacology*. .
- Vinderola, C.G. & Reinheimer, J.A. (2003) Lactic acid starter and probiotic bacteria: A comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36, 895–904.
- Vinderola, G., Matar, C. & Perdígón, G. (2007) Milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 and its non-bacterial fraction confer enhanced protection against *Salmonella enteritidis* serovar Typhimurium infection in mice. *Immunobiology*, 212, 107–118.
- Vinderola, G., Gueimonde, M., Gomez-Gallego, C., Delfederico, L. & Salminen, S. (2017) Correlation between in vitro and in vivo assays in selection of probiotics from traditional species of bacteria. *Trends in Food Science and Technology*, 68, 83–90. Elsevier Ltd.
- De Waele, V., Berzano, M., Berkvens, D., Speybroeck, N., Lowery, C., Mulcahy, G.M. & Murphy, T.M. (2011) Age-stratified Bayesian analysis to estimate sensitivity and specificity of four diagnostic tests for detection of *Cryptosporidium* oocysts in neonatal calves. *Journal of Clinical Microbiology*, 49, 76–84.
- Walter, J. (2008) Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: Implications for fundamental and biomedical research. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 4985–4996.
- Walter, J., Schwab, C., Loach, D.M., Gänzle, M.G. & Tannock, G.W. (2008) Glucosyltransferase A (GtfA) and inulosucrase (Inu) of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 contribute to cell aggregation, in vitro biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Microbiology*, 154, 72–80.
- Waltner-Toews, D., Martin, S.W. & Meek, A.H. (1986a) Dairy calf management, morbidity and mortality in Ontario Holstein herds. II. Age and seasonal patterns. *Preventive Veterinary Medicine*, 4, 125–135.
- Waltner-Toews, D., Martin, S.W. & Meek, A.H. (1986b) Dairy calf management, morbidity and mortality in Ontario Holstein herds. III. Association of management with morbidity. *Preventive Veterinary Medicine*, 4, 137–158.
- Wang, A., Yu, H., Gao, X., Li, X. & Qiao, S. (2009) Influence of *Lactobacillus fermentum* I5007 on the intestinal and systemic immune responses of healthy and *E. coli* challenged piglets. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 96, 89–98.
- Wang, C.Y., Lin, P.R., Ng, C.C. & Shyu, Y.T. (2010) Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe*, 16, 578–585.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. & Cole, J.R. (2007) Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences.pdf. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Wang, X., Ren, H., Liu, D., Wang, B., Zhu, W. & Wang, W. (2013) H<sup>+</sup>-ATPase-Defective Variants of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Contribute to Inhibition of Postacidification of Yogurt during Chilled Storage. *Journal of Food Science*.
- Wang, Y., Zhang, H., LinZhu, L.Z., Xu, Y., Liu, N., Sun, X., Hu, L., Huang, H., Wei, K. & Zhu, R. (2018) Dynamic distribution of gut microbiota in goats at different ages and health states. *Frontiers in Microbiology*.
- Wang, Z., Elekwachi, C., Jiao, J., Wang, M., Tang, S., Zhou, C., Tan, Z. & Forster, R.J. (2017) Changes in metabolically active bacterial community during rumen development, and their alteration by rhubarb root powder revealed by 16s rRNA amplicon sequencing. *Frontiers in Microbiology*.
- Wegmann, U., MacKenzie, D.A., Zheng, J., Goesmann, A., Roos, S., Swarbreck, D., Walter, J., Crossman, L.C. & Juge, N. (2015) The pan-genome of *Lactobacillus reuteri* strains originating from the pig gastrointestinal tract. *BMC genomics*, 16, 1023.
- Wehnes, C.A., Novak, K.N., Patskevich, V., Shields, D.R., Coalson, J.A., Smith, A.H., Davis, M.E. & Rehberger, T.G. (2009) Benefits of Supplementation of an Electrolyte Scour Treatment with a Bacillus-Based Direct-Fed Microbial for Calves. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1, 36–44.
- von der Weid, T., Bulliard, C. & Schiffrin, E.J. (2002) Induction by a Lactic Acid Bacterium of a Population of CD4<sup>+</sup> T Cells with Low Proliferative Capacity That Produce Transforming Growth Factor and Interleukin-10. *Clinical and Vaccine Immunology*.
- Wells, J. (2011) Mucosal Vaccination and Therapy with Genetically Modified Lactic Acid Bacteria. *Annual Review of Food Science and Technology*.

- Whitehead, K., Versalovic, J., Roos, S. & Britton, R.A. (2008) Genomic and genetic characterization of the bile stress response of probiotic *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Wilson, R.A., Zolnai, A., Rudas, P. & Frenyo, L. V. (1996) T-cell subsets in blood and lymphoid tissues obtained from fetal calves, maturing calve, and adult bovine. *Veterinary Immunology and Immunopathology*.
- Windeyer, M.C., Leslie, K.E., Godden, S.M., Hodgins, D.C., Lissemore, K.D. & LeBlanc, S.J. (2014) Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. *Preventive Veterinary Medicine*, 113, 231–240.
- Wright, E.S. (2015) DECIPHER: Harnessing local sequence context to improve protein multiple sequence alignment. *BMC Bioinformatics*.
- Wyszyńska, A., Kobierecka, P., Bardowski, J. & Jagusztyn-Krynicka, E.K. (2015) Lactic acid bacteria—20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Xiao, L. & Herd, R.P. (1994) Infection patterns of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. *Veterinary Parasitology*.
- Yang, H. ying, Liu, S. ling, Ibrahim, S.A., Zhao, L., Jiang, J. li, Sun, W. feng & Ren, F. zheng. (2009) Oral administration of live *Bifidobacterium* substrains isolated from healthy centenarians enhanced immune function in BALB/c mice. *Nutrition Research*, 29, 281–289.
- Younts-Dahl, S.M., Galyean, M.L., Loneragan, G.H., Elam, N. a & Brashears, M.M. (2004) Dietary supplementation with *Lactobacillus*- and *Propionibacterium*-based direct-fed microbials and prevalence of *Escherichia coli* O157 in beef feedlot cattle and on hides at harvest. *Journal of Food Protection*, 67, 889–893.
- Zahran, R. & El-Behiry, A. (2014) Prevalence, molecular identification and virulence attributes of *Salmonella* serovars isolated from feces of diarrheic cow and buffalo-calves. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*.
- Zeng, S.Q., Halkosalo, A., Salminen, M., Szakal, E.D., Puustinen, L. & Vesikari, T. (2008) One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *Journal of Virological Methods*.
- Zhai, Q., Feng, S., Arjan, N. & Chen, W. (2018) A next generation probiotic, *Akkermansia muciniphila*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.
- Zhang, C., Derrien, M., Levenez, F., Brazeilles, R., Ballal, S.A., Kim, J., Degivry, M.C., Quéré, G., Garault, P., Van Hylckama Vlieg, J.E.T., Garrett, W.S., Doré, J. & Veiga, P. (2016) Ecological robustness of the gut microbiota in response to ingestion of transient food-borne microbes. *ISME Journal*.
- Zhang, L., Jiang, X., Liu, X., Zhao, X., Liu, S., Li, Y. & Zhang, Y. (2019) Growth, health, rumen fermentation, and bacterial community of Holstein calves fed *Lactobacillus rhamnosus* GG during the preweaning stage1. *Journal of Animal Science*, 97, 2598–608.
- Zhang, R., Zhou, M., Tu, Y., Zhang, N.F., Deng, K.D., Ma, T., Diao, Q.Y., Vinderola, G., Gueimonde, M., Gomez-Gallego, C., Delfederico, L., Salminen, S., Suzuki, K., Maruya, M., Kawamoto, S., Sitnik, K., Kitamura, H., Agace, W.W., Fagarasan, S., Selle, K., Klaenhammer, T.R., Sanders, M.E., Preidis, G.A., Saulnier, D.M., Blutt, S.E., Mistretta, T.-A., Riehle, K.P., Major, A.M., Venable, S.F., Finegold, M.J., Petrosino, J.F., Conner, M.E., Versalovic, J., Maldonado, N.C., Chiaraviglio, J., Bru, E., de Chazal, L., Santos, V., Nader-Macías, M.E.F., Kawakami, S.I., Yamada, T., Nakanishi, N., Cai, Y., Hug, L.A., Baker, B.J., Anantharaman, K., Brown, C.T., Probst, A.J., Castelle, C.J., Butterfield, C.N., HERNSDORF, A.W., Amano, Y., Ise, K., Suzuki, Y., Dudek, N., Relman, D.A., Finstad, K.M., Amundson, R., Thomas, B.C., Banfield, J.F., Fomenky, B.E., Chiquette, J., Bissonnette, N., Talbot, G., Chouinard, P.Y., Ibeagha-Awemu, E.M., Ambalam, P., Kondepudi, K.K., Nilsson, I., Wadström, T., Ljungh, Å., Roselli, M., Pieper, R., Rogel-Gaillard, C., de Vries, H., Bailey, M., Smidt, H., Lauridsen, C., Wohlgemuth, S., Loh, G., Blaut, M., Kumar, A., Kumar, D., Bunešová, V., Vlková, E., Geigerová, M., Rada, V., Ushakova, N.A., Nekrasov, R. V., Pravdin, I. V., Sverchkova, N. V., Kolomiyets, E.I., Pavlov, D.S., Z??bransk??, L., ??och, M., Brou??ek, J., Nov??k, P., Tejml, P., et al. (2015) Oral Administration of *Faecalibacterium prausnitzii* Decreased the Incidence of Severe Diarrhea and Related Mortality Rate and Increased Weight Gain in Preweaned Dairy Heifers. *Livestock Science*, 33, 1–9. Elsevier.
- Zhou, M., Chen, Y., Griebel, P.J. & Guan, L.L. (2015) Methanogen prevalence throughout the gastrointestinal tract of pre-weaned dairy calves. *Gut Microbes*.
- Zoetendal, E.G., Rajilić-Stojanović, M. & De Vos, W.M. (2008) High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut*.

# APÉNDICE 1:

## METODOLOGÍAS ESPECÍFICAS

### A) EXTRACCIÓN DE MUCUS (Ouwehand *et al.*, 1999)

- 1) Diluir 1:4 la materia fecal en PBS (0,5 g/l de  $\text{NaN}_3$ , 1mM PMSF y 10 mM EDTA pH=8). Homogeneizar en Stomacher por 30s en velocidad “LOW”.
- 2) Agitar suavemente a 4 °C por 1 h.
- 3) Centrifugar por 30 min a 15.000  $xg$  (4 °C).
- 4) Recoger sobrenadante y agregar etanol absoluto de forma de obtener una concentración final de 70%. PESAR EL TUBO EN EL QUE SE VA A HACER LA CENTRIFUGACIÓN FINAL.
- 5) Centrifugar por 30 min a 10.000  $xg$  (4 °C). Tirar el sobrenadante.
- 6) Resuspender el pellet con agua miliQ y volver a precipitar con etanol.
- 7) Centrifugar por 30 min a 10.000  $xg$  (4 °C). Tirar el sobrenadante, dejar secar el pellet (pesar para saber cuántos mg hay) y agregar miliQ de forma de obtener una concentración de 10 mg/ml.

### B) ADHESIÓN A MUCUS (Izquierdo *et al.* 2008)

**Día 1:** Descongelar las cepas en placas de MRS.

**Día 2:** Repicar las cepas en caldo de MRS. De tarde- noche preparar la placa: 200  $\mu\text{L}$  de mucus (1mg/ml) y 200  $\mu\text{L}$  de BSA (1mg/ml) y dejar a 4°C. En los blancos agregar lo mismo

- Día 3:** 1) Centrifugar 3ml o más de cultivo bacteriano crecido y lavar x2 con (1 ml) PBS. Por último, resuspender en 1ml de 100  $\mu$ M de CFDA. Incubar en oscuridad 1 h a 37°C.  
(esperar media hora antes de pasar al paso 2, para que den bien los tiempos)
- 2) Retirar de los pocillos que tienen mucus y colocar 200  $\mu$ l de BSA (1mg/ml) para dejar bloqueando 1h a 37°C
- 3) Lavar las bacterias marcadas x2 (1 ml de PBS) y llevar a 3ml en tubos Falcon con PBS
- 4) Lavar x2 todos los pocillos con 200  $\mu$ l de PBS. Colocar 200  $\mu$ l de las bacterias marcadas en los pocillos correspondientes. Dejar 200  $\mu$ l de PBS en los blancos para que no se sequen. Incubar en oscuridad 1 h a 37°C (también incubar los tubos con la suspensión de bacterias que sobró, también en oscuridad).
- 5) Mientras incuba sembrar los recuentos iniciales (-7, -6, y -5)
- 6) Retirar suspensión y lavar x2 con PBS. Agregar 200  $\mu$ l de solución de lisis (0,1M NaOH + 1% SDS) e incubar 1 h a 60 °C. También agregarle a los pocillos de los blancos. Centrifugar 700  $\mu$ l de la suspensión de bacterias y resuspender en 700  $\mu$ l de solución de lisis, incubar a 60 °C.
- 7) Pasar el contenido de los pocillos a una placa blanca. Medir en Varioskan ( $\lambda_{ex}$  = 495nm y  $\lambda_{em}$ =512nm) o en el lector FLUOstar Optima ( $\lambda_{ex}$ = 480 nm y  $\lambda_{em}$ = 520 nm).

### **C) ADHESIÓN A CACO-2** (Jensen *et al.* 2012)

#### **Día 1:**

- 1) A un botella de cultivo con confluencia 90% agregarle Tripsina 1X y dejar 15 minutos en la estufa de cultivo.

- 2) Centrifugar 3 min a 1200  $xg$ , retirar medio y resuspender en (5ml) medio DMEM 10% suero sin antibióticos.
- 3) Contar células en cámara de Neubaer y se diluir para que quede a una concentración final de  $5 \times 10^5$  cel/ml.
- 4) Agregar 100  $\mu$ l por pocillo (placa x96) e incubar hasta que el cultivo llegue a una confluencia de 95-100% (aprox. dos días).
- 5) Lo que sobra de esa dilución (2-3 ml) llevar a 5 ml y pasar a botella nueva. Al otro día cambiar el medio de la botella
- 6) Descongelar cepas bacterianas en placa

**Día 2:** Chequear células. Pasar a caldo las bacterias

**Día 3:**

- 1) Centrifugar aprox. 100  $\mu$ l de cultivo de bacterias crecido por 15 min a 10.000  $xg$ ; lavar con PBS, centrifugar nuevamente y resuspender en 1ml de DMEM con 10% suero.
- 2) Retirar el medio de cultivo de las células Caco-2 y agregar 100  $\mu$ l de la suspensión de bacterias (cada cepa por triplicado más sin bacterias).
- 3) Incubar 3 h en estufa de cultivo. Mientras incuba realizar los recuentos del inóculo inicial (debería haber entre  $10^6$ - $10^7$ ).
- 4) Retirar bacterias y lavar X2 con 100  $\mu$ l de PBS.
- 5) Agregar 100  $\mu$ l de 0,1% de Tritón X-100 y homogeneizar. Incubar en estufa por 15 minutos. Al retirar hacer las diluciones correspondientes para los recuentos.

Realizar experimentos en triplicado y en por lo menos tres oportunidades distintas. Realizar los recuentos de cada pocillo por duplicado.

## **D) CLONADO DE GENES *TARGET* PARA qPCR**

**→ GENERACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES**

- 1) Inocular caldo LB (50 ml) con una colonia de *E. coli* (TOP10) e incubar en agitación a 37 °C hasta que alcance una OD<sub>600</sub>=0,4 (aprox 3 h).
- 2) Centrifugar a 6000 *xg* por 8 minutos a 4 °C y descartar el sobrenadante.
- 3) Resuspender cuidadosamente el *pellet* en 25 ml de CaCl<sub>2</sub> (50 mM) frío.
- 4) Centrifugar a 6000 *xg* por 8 minutos a 4 °C y descartar el sobrenadante.
- 5) Resuspender (cuidadosamente) el *pellet* en 20 ml de CaCl<sub>2</sub> (50 mM) frío.
- 6) Incubar 30 min en hielo.
- 7) Centrifugar a 6000 *xg* por 8 minutos a 4 °C y resuspender el *pellet* en 2 ml de CaCl<sub>2</sub> (50 mM) frío.
- 8) Congelar a -80 °C con 10% de glicerol en alícuotas de 200 µl.

#### → LIGACIÓN DEL PLÁSMIDO Y EL *TARGET*

- 1) Amplificar el fragmento *target* y extraer banda de un gel de agarosa (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN)
- 2) Realizar la ligación con el plásmido de acuerdo con las instrucciones del kit de clonado (TOPO® TA Cloning® Kit)

#### → TRANSFORMACIÓN

- 1) Mezclar 200 µl de células competentes con 8-10 µl de plásmido ligado
- 2) Dejar la mezcla en hielo 30 a 40 min
- 3) Realizar un proceso de *shock* térmico a 42 °C por 1 min
- 4) Colocar el hielo 1 min
- 5) Agregar 1 ml de LB e incubar 1:30 h a 37 °C con agitación (suave)
- 6) Sembrar en superficie sobre placa de LA/Amp/IPTG/X-Gal.
- 7) Realizar controles de viabilidad (LA solo) y control de transformación con plásmido PUC19 (LA/Amp).
- 8) Incubar a 37 °C por 24 h y seleccionar la colonias blancas.

#### → CONFIRMACIÓN

- 1) Realizar PCR directo de las colonias blancas con *primers* dirigidos a la región M13

- 2) Repicar las colonias positivas y congelarlas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- 3) Extraer el plásmido (sección E) y enviar a secuenciar (*primers* para M13).

## E) PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDOS

- 1) Centrifugar 2 ml de un cultivo líquido de la cepa de interés (LB/Amp), 5 min a 12.000 *xg*.
- 2) Remover el sobrenadante por aspiración y resuspender el pellet en 100  $\mu\text{l}$  de SOLUCIÓN 1 + 1  $\mu\text{l}$  de RNAsa (10 mg/ml). Agitar con vortex.
- 3) Agregar 200  $\mu\text{l}$  de la SOLUCIÓN 2. Mezclar por inversión 15 veces. Dejar 5 min a temperatura ambiente.
- 4) Agregar 150  $\mu\text{l}$  de la SOLUCIÓN 3. Mezclar por inversión 15 veces. Dejar 5 min a temperatura ambiente.
- 5) Centrifugar a 12.000 *xg* por 5 min
- 6) Transferir 400  $\mu\text{l}$  del sobrenadante a un tubo nuevo y agregar 800  $\mu\text{l}$  de etanol 100%. Mezclar por inversión.
- 7) Centrifugar a 12.000 *xg* por 5 min. Remover el sobrenadante con pipeta.
- 8) Lavar el pellet con 500  $\mu\text{l}$  de etanol 75%. Centrifugar brevemente. Retirar el sobrenadante con pipeta.
- 9) Dejar secar bien y resuspender en 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura. Incubar 30 min a temperatura ambiente o toda la noche a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### SOLUCIÓN 1:

50 mM glucosa

25 mM Tris-HCl (pH 8)

10 mM EDTA (pH 8)

Preparar en recipientes de aproximadamente 100 ml y autoclavar por 15 min. Guardar a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### SOLUCIÓN 2:

0,2 N NaOH

1 % SDS

SOLUCIÓN 3:

60 ml acetato de potasio 5 M

11,5 ml ácido acético glacial

28,5 ml de agua destilada

# APÉNDICE 2:

## SCRIPTS DE R

### MODELO DE PROBABILIDADES PROPORCIONALES

```
library(MASS)
# Cargar tabla
Todojunto <- read_excel("C:/Users/Sofia/Todojunto.xlsx", col_types =
c("text", "text", "numeric", "numeric", "text"))
Todojunto<- as.data.frame(Todojunto)
Todojunto$Score<- as.factor(Todojunto$Score)
Todojunto$Week<- as.integer(Todojunto$Week)
Todojunto$Year<- as.factor(Todojunto$Year)
# Modelo:
m <- polr(Score ~ Treatment + Week + Year, data = Todojunto, Hess=TRUE)
summary(m)
ctable <- coef(summary(m))
p <- pnorm(abs(ctable[, "t value"]), lower.tail = FALSE) * 2
ctable <- cbind(ctable, "p value" = p)
m1.or=exp(coef(m)) # Elevar los coeficientes para calcular las "odd ratio"
ci <- confint(m) # Intervalos de confianza
OR_CI<-exp(cbind(OR = coef(m), ci)) # OR y 95% interval
ctable2<- ctable[c(1,2,3,4),]
ctable2<-cbind(ctable2, OR_CI)

write.table(ctable2, file="logit_todo.txt", sep="\t", col.names = TRUE,
row.names = TRUE, dec = ",")
```

### PROCESAMIENTO DE DATOS DE SECUENCIACIÓN MASIVA CON DADA2 Y PHYLOSEQ.

```
# # Instalar
# if (!requireNamespace("BiocManager", quietly = TRUE))
#   install.packages("BiocManager")
# BiocManager::install("dada2", version = "3.8")
# Tutoriales:
# https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial.html
```

```

# Callahan et al.(2016)
library (dada2)
# crear la variable "path" con el camino donde estén los fastq
originales
path <- "C:/Users/Sofia/Secuenciacion_masiva_FPTA_325_RawData"
list.files(path)
# Forward y reverse fastq filenames tienen el formato:
SAMPLENAME_R1_001.fastq and SAMPLENAME_R2_001.fastq
fnFs <- sort(list.files(path,pattern="_R1_001.fastq", full.names = TRUE))
fnRs <- sort(list.files(path,pattern="_R2_001.fastq", full.names = TRUE))
# Extraer nombre de muestras asumiendo que tienen el formato:
SAMPLENAME_XXX.fastq
sample.names <- sapply(strsplit(basename(fnFs), "_"), `[`, 1)
View(sample.names)
# 1.....VER LA CALIDAD.....#
plotQualityProfile(fnFs[1:12])
#2.....FILTRAR.....#
# crear subdirectorio "filtered"
filtFs <- file.path(path, "filtered", paste0(sample.names,
"_F_filt.fastq.gz"))
filtRs <- file.path(path, "filtered", paste0(sample.names,
"_R_filt.fastq.gz"))
# parámetros de filtrado estandar: maxN=0, truncQ=2, rm.phix=TRUE, maxEE=2
out <- filterAndTrim(fnFs, filtFs, fnRs, filtRs, truncLen=c(240,240),
trimLeft=10, maxN=0, maxEE=c(2,2), truncQ=2, rm.phix=TRUE,
compress=FALSE, multithread=FALSE)
# elimino 10 nucleótidos de adelante y 10 de atrás de cada secuencia.
#3..... APRENDIZAJE DE TASA DE ERRORES.....#
errF <- learnErrors(filtFs, multithread=FALSE)
errR <- learnErrors(filtRs, multithread=FALSE)
plotErrors(errF, nominalQ=TRUE)
#4.....DERREPLICAR.....#
derepFs <- derepFastq(filtFs, verbose=TRUE)
derepRs <- derepFastq(filtRs, verbose=TRUE)
# Name the derep-class objects by the sample names
names(derepFs) <- sample.names
names(derepRs) <- sample.names
#5.....ALGORITMO BASE DE DADA2, inferencia de ASV.....#
dadaFs <- dada(derepFs, err=errF, multithread=TRUE)
dadaRs <- dada(derepRs, err=errR, multithread=TRUE)
#6.....JUNTAR READS PAREADOS.....#
mergers <- mergePairs(dadaFs, derepFs, dadaRs, derepRs, verbose=TRUE)
head(mergers[[1]])
#7....CONSTRUIR TABLA DE ASV.....#
seqtab <- makeSequenceTable(mergers)
dim(seqtab)
table(nchar(getSequences(seqtab)))
#8....REMOVER QUIMERAS.....#

```

```

seqtab.nochim <- removeBimeraDenovo(seqtab, method="consensus",
multithread=FALSE, verbose=TRUE)
dim(seqtab.nochim)
sum(seqtab.nochim)/sum(seqtab)
#9.....EXTRAER DATOS PARA OBSERVAR LOS NÚMEROS DE CADA PASO.....#
getN <- function(x) sum(getUniques(x))
track <- cbind(out, sapply(dadaFs, getN), sapply(dadaRs, getN),
sapply(mergers, getN), rowSums(seqtab.nochim))
colnames(track) <- c("input", "filtered", "denoisedF", "denoisedR", "merged",
"nonchim")
rownames(track) <- sample.names
head(track)
write.xlsx(track, file="track.xlsx", sheetName="Sheet1",
col.names=TRUE, row.names=TRUE, append=FALSE)
#10...ASIGNAR TAXONOMÍA.....#
# bajar el training_set de la pagina de dada2:
https://benjjneb.github.io/dada2/training.html
taxa <- assignTaxonomy(seqtab.nochim,
"C:/Users/Sofia/silva_nr_v132_train_set.fa.gz", multithread=FALSE,
tryRC=TRUE)
#tryRC: the reverse-complement of each sequences
# taxa <- addSpecies(taxa,
"C:/Users/Sofia/silva_species_assignment_v132.fa.gz")
#inspeccionar las asignaciones taxonomicas
taxa.print <- taxa # Remover nombres solo para el display de taxas
rownames(taxa.print) <- NULL
head(taxa.print)
#11....ARBOL FILOGENETICO.....# Callahan et al. 2016
if (!requireNamespace("BiocManager", quietly = TRUE))
install.packages("BiocManager")
BiocManager::install("DECIPHER", version = "3.8")
install.packages("phangorn")
BiocManager::install("Rsamtools", version = "3.8")

library(DECIPHER)
seqs <- getSequences(seqtab.nochim)
names(seqs) <- seqs # This propagates to the tip labels of the tree
alignment <- AlignSeqs(DNAStringSet(seqs), anchor=NA)

library(phangorn)
phang.align <- phyDat(as(alignment, "matrix"), type="DNA")
dm <- dist.ml(phang.align)
treeNJ <- NJ(dm) # Note, tip order != sequence order
fit = pml(treeNJ, data=phang.align)

fitGTR <- update(fit, k=4, inv=0.2)
fitGTR <- optim.pml(fitGTR, model="GTR", optInv=TRUE, optGamma=TRUE,
rearrangement = "stochastic", control = pml.control(trace
= 0))
detach("package:phangorn", unload=TRUE)

```

```

#.....#
# 12.....CREAR UN PHYLOSEQ.....#
#.....#
library(readxl)
library(phyloseq)
library(ggplot2)
# 12a) cargar la dataframe con los datos experimentales
data_sample <- read_excel("C:/Users/Sofia/sample-data.xlsx", sheet =
'ordenados_dada')
data_sample <- as.data.frame(data_sample)
# ponerle estos nombres a las rows para que quede igual a lo que se hizo con
dada2
samples.out <- rownames(seqtab.nochim)
str(samples.out)
row.names(data_sample) <- samples.out
# 12b) crear el objeto phyloseq
ps<- phyloseq(otu_table(seqtab.nochim, taxa_are_rows=FALSE),
              sample_data(data_sample),tax_table(taxa),
              phy_tree(fitGTR$tree))

ps
saveRDS(ps, "Objetos/ps.rds") #guardarlo
#NOMBRES (cambiar de los nombres de las ASVs porque son las secuencias
y es muy largo para verlo en gráficas, guardar igualmente porque son
necesarios)
taxa_table_nombres<-as(tax_table(ps), "matrix") #sacar la tax table como
matriz
taxa_names(ps) <- paste0("Seq", seq(ntaxa(ps)))#cambiar los nombres de las
ASVs a Seq1, Seq2...
otu_names<-taxa_names(ps) #Sacar los nuevos nombres en un vector
taxa_table_nombres<-cbind(otu_names,taxa_table_nombres) # Agregarlos a la
matriz de taxas
#.....Filtrar.....#
# Mostrar los niveles taxonómicos disponibles
rank_names(ps)
## [1] "Kingdom" "Phylum" "Class" "Order" "Family" "Genus"
# Crear tabla con número de lecturas por filo
table(tax_table(ps)[, "Phylum"], exclude = NULL)
ps0 <- subset_taxa(ps, !is.na(Phylum) & !Phylum %in% c("",
"uncharacterized"))
# Calcular la prevalencia de cada uno
prevdf = apply(X = otu_table(ps0),
              MARGIN = ifelse(taxa_are_rows(ps0), yes = 1, no = 2),
              FUN = function(x){sum(x > 0)})
# Agregar taxonomía y recuentos
prevdf = data.frame(Prevalence = prevdf,
                  TotalAbundance = taxa_sums(ps0),
                  tax_table(ps0))
plyr::ddply(prevdf, "Phylum",
function(df1){cbind(mean(df1$Prevalence),sum(df1$Prevalence))})

```

```

# Observar la tabla y definir los filios para filtrar (baja prevalencia y
recuentos totales)
filterPhyla = c("Fibrobacteres", "Kiritimatiellaeota", "Patescibacteria",
"Planctomycetes", "Spirochaetes","Synergistetes")
# Filtrar filios indeterminados.
ps1 = subset_taxa(ps0, !Phylum %in% filterPhyla)
ps1
#Eliminar las ASVs que tienen menos de 10 conteos en total
ps2 <- prune_taxa(taxa_sums(ps1) > 10, ps1)
# normalizar con frecuencias
ps3ra = transform_sample_counts(ps2, function(x){x / sum(x)})
sample_sums(ps3ra)
# abundancia relativa
ps3ra_100 = transform_sample_counts(ps2, function(x){(x / sum(x))*100})
sample_sums(ps3ra_100)

# abundancia relativa de géneros
ps2_genus<- tax_glom(ps2, "Genus")
ps3ra_100_genus = transform_sample_counts(ps2_genus, function(x){(x /
sum(x))*100})

```

---

## PERMANOVA

```

library(vegan)
library(phyloseq)
set.seed(1)
matriz <- phyloseq::distance(ObjetoPhyloseq, method = "bray")
Experimental_data <- data.frame(sample_data(ObjetoPhyloseq))
PERMANOVA<-adonis(matriz ~ Tratamiento, data = Experimental_data)
dispersion <- betadisper(matriz, Experimental_data$Tratamiento)
permu <-permutest(dispersion, pairwise=TRUE, permutations=1000)

```

---

## DESEQ2

```

ps_genus<- tax_glom(ps_prueba, "Genus")
dds <- phyloseq_to_deseq2(ps_genus, ~Treatment)
gm_mean = function(x, na.rm=TRUE){
  exp(sum(log(x[x > 0])), na.rm=na.rm) / length(x)}
geoMeans<- apply(counts(dds), 1, gm_mean)
dds<- estimateSizeFactors(dds,geoMeans=geoMeans)
dds<- DESeq(dds, test="Wald", fitType="local")
res<- results(dds)
taxa_DF_table<- as(tax_table(ps_genus), 'matrix')
res1<-as.data.frame(res)
res1<-cbind(res1,taxa_DF_table)
specialdf = res1[(res1$pvalue < alfa), ]
specialdf$OTU <- row.names(specialdf)

```

---

## PICRUST2

```

#Generar los objetos que necesita el PICRUST2 (se corre en Linux)

```

```

# The input files should be a FASTA of amplicon sequences variants (ASVs; i.e.
#your representative sequences, not your raw reads, which is study_seqs.fna
#below) and a BIOM table of the abundance of each ASV across each sample
#(study_seqs.biom below). Note that a tab-delimited table with ASV ids as the
#first column and sample abundances as all subsequent columns will also work.

library(dada2)
library(phyloseq)
# cargar la ASV table original para hacer la asignación taxonómica de nuevo
con Green Genes
seqtab.nochim<- readRDS('C:/Users/Sofia/seqtab.nochim.rds') #OTU table
taxa_green<- assignTaxonomy(seqtab.nochim,
"C:/Users/Sofia/gg_13_8_train_set_97.fa.gz", multithread=FALSE, tryRC=TRUE)
ps<- readRDS('C:/Users/Sofia/ps.rds')
data_sample<- as.data.frame(as(sample_data(ps), "matrix"))

ps_green<- phyloseq(otu_table(seqtab.nochim,
taxa_are_rows=FALSE),sample_data(data_sample),tax_table(taxa_green))
saveRDS(ps_green, 'Objetos/ps_green.rds')
taxa_table_nombres_green<-as(tax_table(ps_green), "matrix") #sacar la tax
table como matriz
saveRDS(taxa_table_nombres_green,"C:/Users/Sofia/taxa_table_nombres_green.rd"
)

#### PRIMERO FILTRO ####
# Create table, number of features for each phyla
table(tax_table(ps_green)[, "Phylum"], exclude = NULL)
ps_green0 <- subset_taxa(ps_green, !is.na(Phylum) & !Phylum %in% c("",
"uncharacterized"))
# Compute prevalence of each feature, store as data.frame
prevdf = apply(X = otu_table(ps_green0),
               MARGIN = ifelse(taxa_are_rows(ps_green0), yes = 1, no = 2),
               FUN = function(x){sum(x > 0)})
# Add taxonomy and total read counts to this data.frame
prevdf = data.frame(Prevalence = prevdf,
                   TotalAbundance = taxa_sums(ps_green0),
                   tax_table(ps_green0))
plyr::ddply(prevdf, "Phylum",
function(df1){cbind(mean(df1$Prevalence),sum(df1$Prevalence))})
# Define phyla to filter
filterPhyla = c("p__Fibrobacteres", "p__Spirochaetes", "p__Synergistetes",
"p__TM7", "p__Planctomycetes")
# Filter entries with unidentified Phylum.
ps_green1 = subset_taxa(ps_green0, !Phylum %in% filterPhyla)
ps_green1
ps_green2 <- prune_taxa(taxa_sums(ps_green1) > 10, ps_green1)

#TABLA CON ASV y secuencias
taxa_table_nombres_green<-as(tax_table(ps_green2), "matrix")

```

```

taxa_names(ps_green2) <- paste0("Seq", seq(ntaxa(ps_green2)))#cambiar los
nombres de las OTUS a Seq1, Seq2...
otu_names_green<-taxa_names(ps_green2) #Sacar los nuevos nombres en un vector
taxa_table_nombres_green<-cbind(otu_names_green,taxa_table_nombres_green)

#crear vector
seqs_study <- rownames(taxa_table_nombres_green)
is.vector(seqs_study)
taxa_table_nombres_green<-as.data.frame(taxa_table_nombres_green)
names_green<-as.character(taxa_table_nombres_green$otu_names_green)
names(seqs_study)<-names_green
is.vector(seqs_study)
#[1] TRUE

#Crear el fasta con las secuencias de las ASVs y su nombre library(tigger)
writeFasta(seqs_study, file= "C:/Users/sofia/ASV_seqs.fa", width = 60)
# BIOM table
OTU_biom<- t(as(otu_table(ps_green2), "matrix"))
colnames(OTU_biom)<- data_sample$Sample_name
OTU_biom<- biomformat::make_biom(data=OTU_biom)
biomformat::write_biom(OTU_biom, biom_file = "C:/Users/sofia/OTU_biom2.biom")

# SE CORRE EN LINUX:
# picrust2_pipeline.py -s ASV_seqs.fa -i OTU_biom.biom -o
picrust2_out_pipeline

#PARA LEER ALGUNA DE LAS TABLAS
weighted_nsti<-
read.table(file="C:/Users/sofia/picrust2_out_pipeline/EC_metagenome_out/weigh
ted_nsti.tsv", sep = '\\t', header = TRUE)

```

---

## ANÁLISIS DE DATOS DE SALIDA DEL PICRUST2

---

```

#crear un objeto phyloseq
ps3ra_100<- readRDS(file="C:/Users/sofia/ps3ra_100.rds")
path_abun_unstrat<-
read.table(file="C:/Users/sofia/pathways_out/path_abun_unstrat.tsv",
           sep = '\\t', header = TRUE)
data_sample<-as.data.frame(as(sample_data(ps3ra_100), "matrix"))
nombres<- as.character(path_abun_unstrat[,1])
rownames(path_abun_unstrat)<-nombres
path_abun_unstrat<-path_abun_unstrat[,-1]
colnames(path_abun_unstrat)<-rownames(data_sample)
picrust<- phyloseq(otu_table(path_abun_unstrat, taxa_are_rows=T),
                 sample_data(data_sample))
set.seed(1)
picrust_rare<- rarefy_even_depth(picrust)
picrust_ra100 = transform_sample_counts(picrust, function(x){(x /
sum(x))*100})
# con estos objetos se hace el análisis de diversidad y PERMANOVA.

```

---