

PROBIÓTICOS CONTRA PATÓGENOS INTESTINALES: MECANISMOS RELEVANTES Y PERSPECTIVAS

5 Jessica Minnaard^{1,3}, Ayelén A. Hugo^{2,3}, Martín A. Humen², Fernando M. Trejo², Silvia M. Racedo^{2,3}, Ivanna S. Rolny^{2,3} y Pablo F. Pérez^{*2,3}

¹ CIDEFI. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata.

² CIDCA – CCT La Plata – CONICET

³ Cátedra de Microbiología. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP

¹⁰ *Autor Responsable: pfp@biol.unlp.edu.ar

Resumen

El tracto digestivo constituye un lugar importantísimo para la interacción con diversos microorganismos. En este contexto, se ponen en juego diversas relaciones que pueden traer aparejados efectos adversos o benéficos para el hospedador. A la capacidad de ciertos microorganismos de dar lugar a patologías, se oponen diferentes mecanismos de defensa entre los que la microbiota comensal se destaca especialmente.

Es entonces razonable, suponer que la administración de microorganismos benéficos (probióticos) a través de intervenciones nutricionales, puede resultar una estrategia valiosa para la prevención y tratamiento de infecciones intestinales.

En el presente capítulo, se describen sistemas en los que se ha demostrado la capacidad de ciertas cepas seleccionadas de microorganismos potencialmente probióticos sobre los factores de virulencia de patógenos intestinales relevantes en el contexto de la infección intestinal.

²⁵ **Palabras clave:** probióticos, patógenos intestinales, factores de virulencia

LOS MICROORGANISMOS Y EL HOMBRE: UNA ASOCIACIÓN NECESARIA

A lo largo de la evolución, el hombre y otros animales han establecido importantes interacciones con diversos microorganismos. Estas interacciones, se establecen preferentemente en ciertas regiones del cuerpo que poseen sistemas de detección y defensa contra los microorganismos patógenos y una compleja comunicación con los miembros de la microbiota normal.

El tracto digestivo constituye sin duda, un sitio clave para la relación con el mundo microbiano ya que a la extraordinaria amplitud de la superficie de contacto, se agrega la presencia de regiones especializadas pertenecientes al sistema inmune de mucosas (Lievin Le Moal and Servin, 2006). La compleja arquitectura y elaborada funcionalidad



de la mucosa digestiva hace que la supervivencia del hospedador dependa, en gran medida, del permanente diálogo molecular entre los participantes.

Desde el momento del nacimiento e incluso antes, el sistema inmune entra en
40 contacto con patrones moleculares propios de los microorganismos lo cual instruye y
modela las respuestas frente a distintos microorganismos (Pérez et al, 2007). Diferentes
regiones del organismo presentan una distribución característica de poblaciones
celulares, por lo tanto la presencia de los mismos patrones moleculares (lipopolisacárido,
ácido lipoteicoico, flagelina, etc) da lugar a respuestas que pueden ser diametralmente
45 disímiles. Por ejemplo, la presencia de lipopolisacárido en la luz intestinal no da lugar a
inconvenientes mientras que una mínima cantidad intradérmica puede desencadenar una
importante respuesta inflamatoria (Biswas and Lopez-Collazo, 2009).

La enorme cantidad de microorganismos que habitan el tracto digestivo, ejerce un
efecto altamente relevante para la homeostasis intestinal así como también, extiende su
50 influencia a lugares distantes (Lievin Le Moal and Servin, 2006).

En esta compleja interacción, la capacidad de ciertos microorganismos de
desencadenar efectos nocivos a través de diferentes factores de virulencia, agrega una
nueva dimensión, la de la patogénesis, que lleva a estados de desequilibrio de gravedad
variable.

55 Son varias las estrategias de los microorganismos patógenos para subvertir el
normal funcionamiento del hospedador. Sin embargo, en todos los casos, los mecanismos
pueden ser incluidos dentro de las siguientes categorías: adhesión/invasión y producción
de toxinas.

Queda claro que no debe interpretarse la patogénesis desde un punto de vista
60 teleológico; los mecanismos arriba mencionados constituyen vías evolutivas que han
dado lugar a la supervivencia de diferentes especies microbianas. Estas vías implican un
daño para el hospedador, pero vistas desde la perspectiva evolutiva garantizan la
permanencia de diversas especies aunque algunos de los actores involucrados sufran
graves perjuicios.

65 La microbiota intestinal constituye un elemento clave para la defensa frente a
infecciones. En efecto, a través de mecanismos tales como la interferencia en la
adhesión/invasión, la inhibición del crecimiento y/o actividad biológica o la modulación
de la respuesta inmune, la microbiota comensal, un fundamental componente de las

defensas, redimensiona la interacción entre los patógenos y el hospedador (Pérez et al,
70 2005).

La importancia de la microbiota intestinal como elemento clave para la supervivencia del hospedador fue advertida hace mucho tiempo. En los albores del siglo XX, Elie Metchnikoff, en una obra que pone las bases de la probiótica (Metchnikoff, 1908), enfatiza la importancia de la ingestión de lactobacilos para lograr un balance
75 adecuado de la actividad metabólica intestinal y así evitar los efectos nocivos de la microbiota putrefactiva. Aunque muchos conceptos vertidos en el trabajo de Metchnikoff pueden resultar inaceptables a la luz de los conocimientos actuales, la idea de la microbiota intestinal como participante clave en el bienestar del hospedador pone en evidencia una visión claramente innovadora para esa época y que dio lugar a
80 proyecciones altamente relevantes.

Como consecuencia de las ideas arriba mencionadas, la administración de bacterias benéficas (probióticas) por medio de alimentos o medicamentos ha constituido una aproximación que ha despertado un notable interés en el mundo científico.

En el presente capítulo, se considerarán los efectos y mecanismos puestos en juego
85 por diferentes microorganismos potencialmente probióticos sobre la capacidad de patógenos intestinales de producir procesos nocivos para el hospedador. Se han elegido para este propósito, microorganismos relevantes en el contexto de las infecciones intestinales y que presentan diferentes factores de virulencia. Se dará una breve descripción de cada uno de ellos para luego proveer evidencias experimentales de su
90 potencialidad como probiótico en cada una de las patologías.

ESCHERICHIA COLI

E. coli es el microorganismo anaerobio facultativo predominante de la microbiota colónica humana. Esta bacteria coloniza el tracto gastrointestinal a las pocas horas de
95 vida estableciéndose de corriente una relación de beneficio mutuo entre el hospedador y el comensal. *E. coli* normalmente permanece en el lumen intestinal sin provocar daño alguno, sin embargo cuando el hospedador se encuentra inmunosuprimido o la barrera gastrointestinal está alterada, aún las cepas no patógenas pueden ocasionar una infección. Por otra parte incluso la actividad metabólica normal de *E. coli* y de otros
100 microorganismos intestinales comensales puede llevar a la producción de sustancias

dañinas tales como los N-nitroso compuestos, moléculas potencialmente carcinogénicas (Goldin, 1986). Existen además cepas patógenas de esta bacteria altamente adaptadas para la generación de infecciones, reconociéndose tres síndromes: infecciones urinarias, sepsis/meningitis y diarreas (Nataro y Kaper, 1998).

105 Las diarreas constituyen un problema de salud de importancia mundial, especialmente en la población infantil de los países en vías de desarrollo. En el tercer mundo, la diarrea es una de las principales causas de enfermedad y muerte en niños menores de 5 años, donde ocurren aproximadamente 1300 millones de episodios y 3,2 millones de muertes por año. La causa principal de muerte asociada a la diarrea es la
110 deshidratación, luego siguen la disentería, desnutrición y otras infecciones asociadas (Documento OPS, 1995). Las fuentes más relevantes de transmisión de los agentes etiológicos de diarrea son el agua y los alimentos contaminados con materia fecal. *E coli* representa el segundo agente causal, detrás de rotavirus, de las diarreas infecciosas agudas (Documento OPS, 1995).

115 El manejo de las diarreas presenta dos fases: la prevención y el tratamiento. La prevención se asocia fundamentalmente con buenas prácticas de manufactura, distribución y uso de los alimentos así como la provisión de agua potable. El tratamiento en general se basa en la terapia de sostén con sales de rehidratación oral y eventualmente el uso de antibióticos (Servin, 2004). La administración de antimicrobianos, sin
120 embargo, no deja de generar controversias; ya que por un lado puede favorecer la selección de cepas resistentes a la vez que ocasionan un desbalance en la microbiota intestinal que podría permitir el crecimiento de microorganismos oportunistas y/o patógenos (Servin, 2004).

En este contexto adquiere relevancia el empleo de microorganismos probióticos,
125 los cuales pueden ser utilizados tanto en una etapa de profilaxis como de tratamiento de las diarreas junto con la rehidratación oral.

Efecto de los probióticos frente a cepas patógenas de E. coli

Existen seis categorías de *E. coli* productoras de diarreas: *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli*
130 difusamente adherente (DAEC); *E. coli* enteropatógena (EPEC) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Estos microorganismos desarrollan básicamente tres

estrategias de patogénesis: a) producción de enterotoxinas (ETEC y EAEC), b) invasión (EIEC) y c) adhesión y disfunción celular (EPEC-EHEC-DAEC) (Nataro y Kaper, 1998).

ETEC, EPEC y EHEC son los patogrupos que revisten mayor importancia epidemiológica. ETEC se asocia con dos síndromes clínicos humanos, la diarrea de los niños al destete y la diarrea del viajero. Según las áreas geográficas, entre el 10 y 30% de los casos de diarrea en niños que dejaron la lactancia materna son provocados por *E. coli* ETEC, mientras que constituye el agente etiológico predominante en la diarrea del viajero. También coloniza la superficie del intestino delgado con ayuda de sus diferentes fimbrias o factores antigénicos de colonización (CFAs), produciendo allí dos tipos de toxinas: la toxina termolábil (LT) y la toxina termoestable (ST), las cuales provocan una diarrea secretoria (Nataro y Kaper, 1998).

Lactobacilos y bifidobacterias probióticas han demostrado su capacidad *in vitro* de disminuir la asociación de *E. coli* ETEC a enterocitos humanos en cultivo, descendiendo a su vez los niveles de producción de citoquinas proinflamatorias como IL-8 (Forestier et al, 2001; Roselli et al, 2006). *In vivo*, distintas preparaciones probióticas fueron eficaces en la reducción de la mortalidad en cerdos afectados por ETEC, en parte debido a mayores niveles de producción de IgA intestinal junto con una disminución de la traslocación bacteriana (Kyriakis et al, 1999; Lessard et al, 2009). Sin embargo la evidencia clínica en humanos en cuanto a la prevención y la duración de la diarrea del viajero no es concluyente (Hilton et al, 1997; Dupont, 1999; Oksanen, 1990).

EPEC es miembro de una familia de patógenos relacionados que inducen una lesión característica en el epitelio intestinal denominada adhesión/efacelación o attaching/effacing (A/E). Los otros miembros de la familia son: *E. coli* EHEC, *E. coli* enteropatógena de conejo (REPEC) y *Citrobacter rodentium* (patógeno del ratón). Estos enteropatógenos comparten una región cromosomal denominada LEE (locus of enterocyte effacement), la cual contiene los genes asociados a la lesión A/E. El conjunto de agentes etiológicos LEE positivos se denominan colectivamente Patógenos A/E. El locus LEE constituye un conjunto de genes próximos que codifican las moléculas efectoras responsables del daño celular junto con el sistema de secreción tipo 3 (Type Three Secretion System, TTSS) que inyecta estas moléculas directamente en el citosol donde interactúan con las proteínas del citoesqueleto y modifican vías de señalización intracelular (Vallance et al, 2002).

EHEC es un conjunto de serotipos asociado a la producción de colitis hemorrágica (CH) y eventualmente síndrome urémico hemolítico (SUH) en humanos. Pertenece a un grupo más amplio de cepas que se caracteriza por la producción de potentes citotoxinas muy semejantes a las de *Shigella dysenteriae* por lo que reciben el nombre de *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC). Estas cepas pueden encontrarse también en distintas especies animales tanto domésticas como salvajes, aunque su patogenia sólo se demostró en terneros, cerdos jóvenes y perros. STEC/EHEC es el único grupo de *E. coli* patógenas zoonóticas. El ganado bovino es reconocido como el principal reservorio de la infección humana. La transmisión de EHEC se realiza principalmente a través de alimentos contaminados con materia fecal de origen bovino (Caprioli et al, 2005). *E. coli* O157:H7 es el prototipo de las cepas de EHEC y es el más aislado en los casos de infección en el hombre aunque no el más frecuente en la microbiota fecal bovina (Nataro y Kaper, 1998).

EHEC es la responsable de brotes y casos esporádicos de CH y SUH en todo el mundo. El SUH complica aproximadamente el 10% de los casos de infección por *E. coli* O157, con una tasa de mortalidad entre el 2 al 10%, siendo los niños menores de 5 años especialmente susceptibles (Law, 2000). En Argentina el SUH es endémico. La tasa de notificación para el año 2006 fue de 13,9 casos por cada 100.000 niños menores de 5 años (Rivas et al, 2006).

Actualmente, la interacción entre cepas probióticas y *E. coli* EPEC/EHEC está siendo intensamente investigada. En el caso de *E. coli* EPEC se ha visto que cepas de lactobacilos son capaces de disminuir la respuesta secretoria y la permeabilidad paracelular en células en cultivo (Michail y Albertany, 2002; Parassol et al, 2005).

En *E. coli* EHEC se ha demostrado que cepas de lactobacilos son capaces de disminuir el daño biológico en células Hep-2 (modelo de lesión A/E), evitando el desprendimiento y la desorganización de la red de actina de células (Hugo et al, 2008). En este caso el efecto no se debió a una menor asociación del patógeno a las células por desplazamiento del lactobacilo. Es posible entonces que en concordancia con otros trabajos se verifique una menor expresión de los genes de virulencia de EHEC. En efecto, se ha comprobado la inhibición de la expresión de genes de virulencia de EHEC a través de quorum sensing, por parte de sobrenadantes de lactobacilos (Medellín-Peña et al, 2007).

Otros autores han observado que la presencia de lactobacilos o sus proteínas de capa S son capaces de disminuir la asociación de *E. coli* O157 a las monocapas celulares (Kim et al, 2008; Johnson-Henry et al, 2008). Incluso, Dalmasso y colaboradores reportaron que *Saccharomyces boulardii* es capaz de prevenir la inducción de apoptosis en células T84, provocada por la infección de EHEC (Dalmasso et al, 2006).

In vivo la evidencia es difícil de obtener ya que EHEC/EPEC son patógenos específicos humanos. Si bien es posible lograr en determinadas condiciones infecciones en diferentes especies animales, no se reproducen con fidelidad todas las características de la enfermedad observadas en el hombre. Los avances más importantes en el estudio de la patogénesis de EHEC y EPEC se han desarrollado utilizando *Citrobacter rodentium* en ratón (Vallance et al, 2004).

Aún así distintos autores han demostrado, en modelos murinos de infección con EHEC, la protección por parte de microorganismos probióticos. En general para lograr la infección deben emplearse animales gnotobióticos, realizar un pretratamiento con antibióticos o incrementar la virulencia del patógeno artificialmente. En estos modelos de infección letal, la administración preventiva de probióticos, determinó una supervivencia del 100 %. El efecto protector de los probióticos ha sido atribuido a distintos factores entre ellos: la menor concentración del patógeno alcanzada en el intestino de los animales tratados, la disminución de los niveles de citoquinas proinflamatorias y la inhibición de la producción de toxina Shiga (Ashara et al, 2004; Takahashi et al, 2004; Hugo 2007).

C. rodentium constituye una buena alternativa para modelar la infección de los patógenos A/E *in vivo*. Siendo un patógeno natural de ratón, se establece en el epitelio colónico donde produce la lesión A/E y genera una fuerte respuesta TH1. *C. rodentium* desencadena una amplia respuesta inflamatoria con una diarrea leve en animales adultos que puede llegar a ser grave en ratones jóvenes (Wiles et al, 2004). Se ha demostrado que la administración profiláctica de lactobacilos a ratones disminuye los principales signos de la infección incluyendo la diarrea, la inflamación y la hiperplasia colónica (Varcoe et al, 2003; Chen et al, 2005; Johnson-Henry et al, 2005). Los mecanismos propuestos de protección incluyen el desplazamiento del patógeno, el aumento de la producción de IgA, la menor expresión de citoquinas proinflamatorias y la disminución de la expresión de los factores de virulencia (Chen et al, 2005; Wu et al, 2008). Incluso

en ratones neonatos donde la infección es letal, la administración de probióticos en ratones transgénicos deficientes en linfocitos T o B permitieron la supervivencia de los animales que no eran deficientes en células T, evidenciando la importancia de estas células para el control de la enfermedad (Gareau et al, 2010). Se ha demostrado asimismo el rol esencial que cumplen las células dendríticas (DC) en el curso de la patogénesis, ya que la transferencia adoptiva de las DC de animales infectados y tratados con lactobacilos a ratones infectados, atenuó la severidad de la enfermedad (Chen et al, 2008).

Otra dimensión relevante en el uso de probióticos es su empleo en animales reservorio a fin de disminuir la presencia de potenciales patógenos en la microbiota intestinal. Tal es el caso de la utilización de cepas de *E. coli* probióticas que mediante exclusión competitiva reducen la presencia de EHEC O157 en ganado (Tkalcic et al, 2003; Zhao et al, 2003). Por otra parte cepas de *Lactobacillus acidophilus* fueron capaces de reducir en un 50% los aislamientos de *E. coli* O157 de materia fecal de bovinos feedlot (Brashears et al, 2003).

Efecto de los probióticos frente a las E. coli comensales

Los compuestos cancerígenos que afectan el tracto gastrointestinal pueden provenir de la dieta o de la actividad metabólica de los microorganismos intestinales. Durante la respiración anaeróbica *E. coli* y otras muchas bacterias utilizan el nitrato y el nitrito como último aceptor de electrones. El metabolismo del nitrato y/o nitrito generan óxidos reactivos de nitrógeno como el ácido nitroso (HNO₂) y el óxido nítrico (NO) con capacidad mutagénica (Weiss, 2006).

Algunos cultivos probióticos pueden disminuir el efecto o la concentración de los agentes mutágenos a nivel intestinal. Los mecanismos propuestos involucran en general la detoxificación o adsorción de los carcinógenos ingeridos (Nowak y Libudzisz, 2009) o la disminución de las poblaciones de bacterias cuyo metabolismo genera compuestos genotóxicos (Ling et al, 1992 y 1994; Ballongue et al, 1997). Además se ha demostrado que una cepa de *Lactobacillus* es capaz de disminuir específicamente la actividad nitrato reductasa de *E. coli* responsable de la generación de compuestos potencialmente cancerígenos (Hugo et al, 2006)

CLOSTRIDIUM DIFFICILE

²⁶⁰ *Clostridium difficile* es un bacilo Gram positivo formador de esporos que se encuentra ampliamente distribuido en centros nosocomiales. Dicha capacidad esporulante hace difícil su eliminación dada la alta resistencia a los agentes desinfectantes comunes. Entre los principales grupos de riesgo susceptibles a infecciones por *C. difficile* se destacan pacientes sometidos a tratamientos con antibióticos o agentes
²⁶⁵ antineoplásicos que sufren un desbalance en su microbiota intestinal normal. Este desbalance permite la colonización del tracto gastrointestinal por este microorganismo. Una vez instalado en el intestino, produce distintos factores de virulencia, entre los que se destacan dos toxinas: toxina A y toxina B. Dichas toxinas presentan actividad glucosilante, dirigida exclusivamente hacia pequeñas proteínas con actividad GTP-asa
²⁷⁰ (subfamilia Ras y Rho: Rho A, B y C, Rac 1-3 y Cdc42). Esto compromete fundamentalmente la transducción de señales y la polimerización de actina (Chaves-Olarte et al, 2003).

Las infecciones causadas por *C. difficile* conducen a cuadros variados tales como leve diarrea, colitis, colitis pseudomembranosa fulminante (CPM), megacolon tóxico y
²⁷⁵ en casos severos puede conducir a la muerte del paciente (Elmer et al, 1996, Dallal et al, 2002). Las diarreas asociadas a *C. difficile* comprenden entre el 20 y el 50 % de las diarreas asociadas a antibióticos y el 10 % de las diarreas nosocomiales (Mylonakis et al, 2001). El tratamiento de la infección, normalmente implica la suspensión del agente desencadenante de la diarrea (generalmente antibiótico), siempre que sea posible, lo cual
²⁸⁰ limita espontáneamente la infección. En caso de no poder suprimir la administración del antibiótico, se continua con la administración del mismo junto con metranidazol o vancomicina (Poutanen y Simor, 2004).

Respecto a la prevención de las infecciones causadas por *C. difficile*, se han empleado eficazmente terapias alternativas tales como la administración de preparados a
²⁸⁵ base de probióticos. Dentro de los microorganismos empleados, podemos mencionar a *S. boulardii* que administrado en forma de cápsulas demostró disminuir los episodios de diarreas asociados a este patógeno (McFarland et al, 1994). Asimismo *Lactobacillus rhamnosus* GG mostró ser eficiente en la prevención de la diarrea asociada a *C. difficile* (Young et al, 1998). Estudios realizados por Graul y colaboradores respaldaron la

290 utilización de combinaciones de cepas de lactobacilos y bifidobacterias para la
prevención de enfermedades asociadas a *C. difficile* (Graul et al, 2009).

El estudio de la interacción entre cepas de *Bifidobacterium* y un patógeno intestinal como *C. difficile* es relevante ya que ambos microorganismos localizan en el intestino grueso.

295 **Antagonismo de factores de virulencia de *Clostridium difficile* por *Bifidobacterium*.**

Durante su crecimiento, *Bifidobacterium* es capaz de producir sustancias con actividad antimicrobiana frente a *C. difficile*. Ensayos de difusión en agar empleando sobrenadantes de *B. longum* y *B. breve* produjeron halos de inhibición sobre el crecimiento de *C. difficile* y los sobrenadantes de *B. longum* disminuyeron la capacidad
300 de esta bacteria de adherirse a células Caco-2 en cultivo. Este efecto inhibitorio, estaría asociado con factores de origen proteico, liberados al medio durante el crecimiento de las bifidobacterias (Trejo et al, 2006).

En relación a la adhesión de *C. difficile* a células epiteliales en cultivo, se han logrado identificar diversas estructuras involucradas en dicha interacción que son de
305 origen proteico, e incluyen adhesinas tales como proteínas de capa S (Takumi et al, 1991), proteínas flagelares (FliC y FliD) (Tasteyre et al, 2001) o proteínas asociadas a pared celular (Cwp66, Waligora et al, 2001); también se han descrito proteasas como Cwp84 (Janoir et al, 2007).

Se ha demostrado que los cultivos mixtos de *Bifidobacterium* con *C. difficile* han
310 disminuído la actividad biológica de los sobrenadantes sobre células Vero respecto a cultivos puros de *C. difficile* (Trejo et al, 2010). Se encontró una relación dosis respuesta entre la actividad citotóxica (medida en función del desprendimiento celular) y la concentración de sobrenadantes. Durante el crecimiento conjunto los niveles de toxinas en los sobrenadantes se ven disminuidos lo que permite explicar parcialmente la menor
315 actividad biológica observada. El estado fisiológico de las bifidobacterias mostró ser un factor de importancia sobre la acción inhibitoria dado que necesariamente *Bifidobacterium* debe estar viable. Este efecto no está asociado con una inhibición en el crecimiento de *C. difficile* o con una capacidad de las cepas de *Bifidobacterium* estudiadas para adsorber toxinas o interferir en su síntesis y/o funcionamiento (Trejo,
320 2009).

Karlsson y col. (Karlsson et al, 2008) demostraron que durante la máxima producción de toxinas en el crecimiento de *C. difficile* existe un aumento en la síntesis de un gran número de enzimas asociadas a rutas metabólicas tales como la del ácido succínico, CO/folato y butirato. De esta manera, la expresión de las toxinas de *C. difficile* podría estar relacionada con vías metabólicas alternativas asociadas a la obtención de energía y durante el co-cultivo, ciertas cepas de *Bifidobacterium* podrían interferir en esas rutas metabólicas modificando la producción de las toxinas de *C. difficile*. Esto es consistente con la necesidad que *Bifidobacterium* se encuentre metabólicamente activo para inducir la inhibición en la producción de toxinas.

Para la realización de estudios *in vivo* el modelo animal más sensible a la infección por *C. difficile* es el hámster sirio (*Mesocricetus auratus*) el cual es capaz de desarrollar la enfermedad con la sola exposición a un ambiente contaminado por este microorganismo (Rheg y Lu, 1982).

En hámster, el ciego es la región donde se verifica el mayor daño causado por la infección y también es donde se produce la mayor colonización por *C. difficile* (Borriello et al., 1988). Sin embargo en jejunio, ileum, ciego y colon se encuentra una similar distribución de receptores de TcdA (Keel y Songer, 2007), principal factor de virulencia de este patógeno. Esto estaría indicando que la localización de la bacteria en el tracto digestivo más que la sola presencia de receptores de toxina A, es un factor determinante en la generación de las lesiones producidas por *C. difficile*.

En el modelo de enterocolitis en hámster inducida por la administración de clindamicina y posterior infección con el patógeno, los animales comienzan a desarrollar colitis, letargia y finalmente un cuadro de colitis fulminante que desencadena la muerte del animal a los pocos días post infección. Este cuadro no sólo depende de la dosis de infección, sino también de la toxigenicidad de la cepa de clostridio utilizada (Bartlett et al, 1978). Cuando los animales son tratados con cepas altamente virulentas, la muerte puede ocurrir incluso sin manifestaciones de diarrea (Razaq et al, 2007). La infección por *C. difficile* provoca una coloración rosada característica de las paredes del ciego con contenido gaseoso y pérdida de espesor en el tejido permitiendo ver su interior (Trejo, 2009). Antibióticos tales como ampicilina y cefalosporinas también han mostrado capacidad de inducir el desarrollo de enterocolitis en hámster luego de la infección por *C. difficile* (Larson y Borriello, 1990).

Numerosos estudios han demostrado la efectividad en la utilización de productos fermentados por bacterias (*Bifidobacterium* y *Lactobacillus*) y levaduras (*S. boulardii*) en la prevención de infecciones asociadas a *C. difficile* (Boyle et al, 2006; Katz, 2006). En especial se ha comprobado que la administración preventiva de cepas de *Bifidobacterium*, disminuye notablemente la tasa de mortalidad y la cantidad de animales con diarrea o enterocolitis, presentando una morfología cecal sin signos de inflamación (Trejo, 2009).

A pesar de que muchos de los estudios llevados adelante carecen de un diseño experimental adecuado o presentan bajo número de casos estudiados (Plummer et al, 2004; Orrhage et al, 2000), ofrecen resultados prometedores en la utilización de preparados probióticos en la prevención de diarreas asociadas a antibióticos y particularmente a infecciones por *C. difficile*. Estos agentes bioterapéuticos y en especial *Bifidobacterium*, presentan diversas propiedades entre las que se pueden destacar: estimulación del tránsito intestinal (Bouveir et al, 2001), producción de sustancias inhibitorias (Mortensen y Clausen, 1996) y efecto barrera del tracto gastrointestinal (Gill, 2003). Sin embargo, la totalidad de los mecanismos mediante los cuales dichos probióticos ejercen su acción antagónica frente a la virulencia de *C. difficile* no ha sido esclarecida aún.

Las evidencias mostradas permiten pensar en estudios futuros, orientados a la utilización de cepas seleccionadas de *Bifidobacterium*, para ser empleadas como agentes bioterapéuticos en la lucha contra las infecciones causadas por *C. difficile*.

BACILLUS CEREUS

Este microorganismo constituye un grave problema para la industria alimentaria ya que los esporos, además de la resistencia que ofrecen al calor y a las radiaciones ionizantes, tienen propiedades hidrofóbicas que les permiten adherirse a distintas superficies inanimadas, muy comunes en las líneas de producción (Husmark and Rönnér, 1990; Wiencek et al, 1991). Además la formación de biofilm protege a los esporos y formas vegetativas de la acción de agentes desinfectantes (Stenfors Arnesen et al, 2008).

La bibliografía da cuenta de la participación de *B. cereus* en patologías intestinales (cuadro emético y diarreico), y extraintestinales, como endoftalmitis (Beecher and Lee

Wong, 1994), endocarditis, osteomielitis, infecciones en la cavidad oral (Kotiranta et al,
385 1998), septicemias, peritonitis y meningitis (Rowan et al, 2001). En las infecciones
oculares (endoftalmitis) este microorganismo es capaz de producir desprendimiento de la
retina y necrosis, provocando una pérdida de la visión permanente (Beecher et.al., 1995).
Si bien las infecciones no intestinales se han producido también en pacientes sanos,
mayormente han sido afectados los pacientes inmunocomprometidos, adictos o pacientes
390 en convalecencia de una cirugía (Rasko et.al, 2005; Schoeni y Lee Wong, 2005; Slamti y
Lereclus, 2005).

En lo que respecta a los toxoinfecciones intestinales, el síndrome emético es
producido por una toxina preformada, dodecadepsipéptido cíclico de un peso molecular
de 1.2 kDa que se denomina cereulide y que está estrechamente relacionado a la
395 valinomicina (Agata et al, 1995a). Es una mitocondriotoxina (Hägglom et al, 2002)
producida durante la fase estacionaria de crecimiento por un complejo multienzimático
no ribosomal (NRPS según sus siglas en inglés: nonribosomal peptide synthetase) que en
el género *Bacillus* también sintetiza otros péptidos como gramicidina, bacitracina y
surfactina (Horwood et al, 2004). Esta toxina es resistente a inactivación por calor,
400 tripsina, pepsina o pH extremos y de baja solubilidad en soluciones acuosas (Kramer y
Gilbert, 1992; Notermans y Batt, 1998). También es capaz de inhibir las células NK del
sistema inmune (Paananen et al, 2002).

La maquinaria enzimática que se requiere para la síntesis de cereulide es
codificada por el gen *ces* cuya secuenciación permitió comprobar que incluye los genes
405 para la síntesis de NRPS además de genes que codifican enzimas para la activación e
incorporación de monómeros a la cadena peptídica, y genes que codifican otras enzimas
(Ehling-Schulz et al, 2005). Este gen se encuentra sobre un megaplásmido, similar a
pXO1 de *B. anthracis* (Ehling-Schulz et al, 2006).

El síndrome diarreico asociado a *B. cereus* se produce por la ingestión de
410 microorganismos con los alimentos y la posterior producción de factores exocelulares en
el intestino delgado durante la fase exponencial de crecimiento (Kramer y Gilbert, 1992).

Hasta el momento no se ha descrito un único factor responsable de este síndrome,
sino que por el contrario, este sería la consecuencia de la acción conjunta de varios
factores extracelulares entre los que podemos mencionar fosfolipasa C (fosfatidilinositol,

415 fosfatidilcolina y esfingomielinasa) (Beecher y Wong, 2000), hemolisina BL (Beecher y
Wong, 2000), cereolisina O (Alouf, 2000; Henderson et al, 1999d), enterotoxina no
hemolítica, enterotoxina FM (Asano, 1997), enterotoxina S (Ghelardi et al, 2002),
enterotoxina T (Agata et al, 1995b), citolisina K (Fagerlund et al, 2004), hemolisina II
(HLyII), hemolisina III (Baida and Kuzmin,1995), hemolisina IV (Beecher and Wong,
420 2000) y proteasas (Kotiranta et al, 2000).

El estudio integral de los factores de virulencia de este microorganismo es
importante ya que los esporos ingeridos con los alimentos germinan en el intestino donde
producen las enterotoxinas causantes del síndrome diarreico (Kramer y Gilbert, 1992).
Además investigaciones recientes han demostrado que las células vegetativas de *B.*
425 *cereus* son capaces de resistir las condiciones ácidas del estómago (Wijnands et al,
2009), aumentando las probabilidades de ingreso de estos microorganismos al intestino.

Los factores exocelulares de *B. cereus*, estudiados en su conjunto en los
sobrenadantes estériles son capaces de desprender las monocapas de las células Caco-2
(Minnaard et al, 2001). Además producen la desaparición del ribete en cepillo, cambios
430 profundos en la superficie de los enterocitos y la necrosis de los mismos (Minnaard et al,
2001; Minnaard, 2008). Este efecto sería producto de la acción conjunta de varios
factores, ya que la actividad citotóxica se mantiene parcialmente cuando las muestras son
coincubadas con suero fetal bovino y cuando los sobrenadantes se someten a tratamiento
térmico. Estos resultados tendrían relación con la coexistencia en los sobrenadantes de
435 una gran cantidad de factores de virulencia, lo cual explicaría la dificultad para
identificar los responsables etiológicos del síndrome diarreico que sería de carácter
multifactorial (Stenfors Arnesen et al, 2008).

El efecto biológico observado sería compatible con la acción concomitante de varios
factores, que involucrarían aquellos con actividad enzimática, toxinas formadoras de
440 poro y eventualmente, toxinas tipo AB como el complejo NHE. Estos factores podrían
coexistir con otros aún no conocidos, produciendo profundos cambios en los enterocitos
humanos en cultivo. Las diferencias evidenciadas entre la actividad biológica de distintas
cepas, hacen suponer que la virulencia de las mismas depende de la naturaleza y del
balance de los factores producidos.

445 Existen además estudios que han demostrado que el contacto directo de los bacilos con las células epiteliales produce el desprendimiento de la monocapa en función de la cepa, de la fase de crecimiento, del tiempo de infección y de la dosis de infección y algunas cepas invaden los enterocitos (Minnaard et al, 2004). Este aspecto de la virulencia de *B. cereus* más allá de los factores exocelulares, tendría alta relevancia en la
450 capacidad patogénica de este microorganismo.

Las adhesinas implicadas en la unión a enterocitos humanos en cultivo son moléculas unidas débilmente por uniones no covalentes, pero no existe una única estructura funcional relacionada con la asociación de todas las cepas, sino que por el contrario, para una misma cepa existirían varios tipos de ligandos involucrados
455 (Minnaard, 2008). Un común denominador es la dependencia de la interacción con la viabilidad de las bacterias y la no dependencia con componentes de superficie termolábiles (Minnaard, 2008).

Utilizando una aproximación farmacológica con distintos inhibidores, se pudo determinar que para la interacción bacteria-enterocito, las vías de lípidos fosforilados
460 son de fundamental importancia,. Además, los resultados mostraron que la fosfolipasa C (PLC) y la fosfoinositido 3-quinasa (Pi3K) estuvieron implicadas en el proceso de adhesión; en cambio la invasión sólo estuvo relacionada con la enzima PLC (Minnaard, 2008).

Los resultados encontrados constituyen un indicio de que la internalización de las
465 bacterias está relacionada con la zona basolateral de los enterocitos y que los microorganismos tendrían un tropismo hacia las criptas de las vellosidades donde las células no están diferenciadas (Wu et al, 1992), ya que además las cepas de *B. cereus* estudiadas presentaron valores de invasión más altos cuando las células epiteliales no estaban diferenciadas (Minnaard, 2008).

470 Las cepas ensayadas también producen una alteración en la estructura de la membrana plasmática, aumentando la permeabilidad de la misma, cuya consecuencia final es la necrosis celular. Este efecto podría estar relacionado con la formación de poros por citolisinas tiol activadas que constituirían la puerta de entrada de efectores al citosol de los enterocitos.

475 Dada la complejidad de los factores de virulencia, un análisis conjunto de las características fenotípicas y genotípicas permitió una mejor caracterización de las cepas de *B. cereus*, encontrándose mediante un análisis multivariado, una asociación entre los patrones de ribotipificación, la presencia de secuencias específicas de ADN y la actividad biológica involucrada en la virulencia de este microorganismo (Minnaard, 2008).

480 Estudios realizados con células fagocíticas *in vitro* demostraron que los macrófagos son capaces de eliminar *B. cereus* luego de distintos tiempos de infección dependiendo de la cepa estudiada. Estos resultados agregan una nueva dimensión al conocimiento de los factores de virulencia de *B. cereus* y muestran que la variabilidad de los efectos biológicos asociados a este microorganismo, podría estar relacionada no solo con los
485 factores de virulencia descritos anteriormente, sino también con la habilidad de sobrevivir a lo largo de la ruta endocítica de las células fagocíticas profesionales.

Antagonismo de la virulencia de Bacillus cereus.

En el contexto de la prevención y tratamiento de patologías asociadas con *B. cereus*, se tienen evidencias *in vitro* de la capacidad del polisacárido proveniente del
490 kefir (kefiran) de antagonizar los efectos biológicos de este patógeno (Medrano et al, 2008; 2009). Más información sobre estos resultados pueden encontrarse en otro capítulo de este libro (Abraham et al, 2010).

GIARDIA INTESTINALIS

495 El parásito protozoario *Giardia intestinalis*, también conocido como *Giardia lamblia* o *Giardia duodenalis*, es un microorganismo eucariótico unicelular flagelado que habita en el intestino delgado de humanos y otros mamíferos, y es el agente etiológico responsable de la giardiasis (Ankarklev et al, 2010). Es el mayor responsable de diarreas no bacterianas en todo el mundo con 280 millones de casos diagnosticados
500 cada año (Minvielle et al, 2008). La giardiasis se caracteriza por diarreas acuosas, dolor epigástrico, náuseas, vómitos y pérdida de peso (Ankarklev et al, 2010), pudiendo llegar a causar síndrome de malabsorción alimentaria. El impacto clínico con sintomatología marcada es mayor en niños e individuos malnutridos e inmunodeprimidos. Son frecuentes las infecciones crónicas, y aproximadamente el 50 % de los individuos

505 infectados cursan en forma asintomática (Farthing, 1997), con la posibilidad de eliminar quistes infectivos para nuevos hospedadores.

Los factores de virulencia implicados en la giardiasis son varios y no están totalmente aclarados (Buret, 2008). Luego de la desenquistación en el intestino delgado proximal, la adhesión de los trofozoitos a las células del epitelio intestinal representa el
510 primer paso en la patogénesis de la enfermedad (Rodríguez-Fuentes et al, 2006) y es considerada un prerrequisito para la colonización (Katelaris, 1995). El análisis histológico de la mucosa intestinal colonizada por *Giardia* es muy variable, ya que puede ir de la normalidad a la atrofia total de las vellosidades. La microscopía electrónica, por el contrario, revela siempre cambios ultraestructurales que involucran acortamiento y
515 desorganización de microvellosidades (Chavez, 1995), con reducción de las actividades enzimáticas en la zona apical del enterocito dando lugar a malabsorción de nutrientes (Roberts-Thomson, 1976; Buret, 1992).

El hospedador utiliza una serie de mecanismos para hacer frente a la infección que incluyen la respuesta inmune innata y adaptativa, y la presencia de barreras naturales
520 (Roxström-Lindquist, 2006).

Entre los efectores de la respuesta innata frente al parásito se encuentran: el óxido nítrico producido por las células epiteliales y macrófagos (Eckmann et al, 2000; Eckmann, 2003); la liberación de defensinas y lactoferrina (Aley et al, 1994); las especies reactivas del oxígeno (Roxström-Lindquist, 2006); y la actividad de macrófagos
525 (Hill, 1987). Además, los mastocitos juegan un rol crítico en la respuesta inmune innata y adaptativa frente al parásito (Rao y Brown, 2008).

El hospedador es capaz de montar una respuesta humoral con liberación de IgA secretoria en intestino, jugando un rol central en la eliminación del parásito (Langford et al, 2002). Asimismo puede detectarse IgG en circulación y en menor medida IgM
530 (Kaplan et al, 1985; Swiatkowska, 1990).

La giardiasis está asociada a un incremento de linfocitos en el epitelio y en la *lamina propria* (Farthing, 1997) y la activación de los linfocitos T podría inducir un daño en las microvellosidades, con aumento de la permeabilidad intestinal y pérdida de la función barrera.

535 Entre las barreras naturales cabe mencionar las altas concentraciones de sales biliares y enzimas digestivas, el constante recambio celular en el intestino y la capa de mucus (Roxström-Lindquist, 2006).

Probióticos como alternativa a la prevención y el tratamiento de la giardiasis.

El tratamiento de la giardiasis se lleva a cabo con antibióticos, generalmente
540 nitroimidazoles y nitrofuranos (Tracy et al, 1996). Estos medicamentos son utilizados en todo el mundo. Sin embargo, sus principios activos no son totalmente eficaces y pueden presentar un gran número de efectos secundarios (Lujan, 2006).

Numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la microbiota intestinal normal es una barrera extremadamente efectiva contra microorganismos patógenos y
545 oportunistas (Fuller, 1991). Algunos autores han sugerido que la composición de la microbiota intestinal puede influenciar en alguna medida el grado de infección por *Giardia* (Torres et al, 1992; Singer and Nash, 2000; Torres et al, 2000). Por consiguiente, una alternativa natural para la prevención y/o el tratamiento de la infección por *G. intestinalis* podría ser el uso de bacterias lácticas, ya que estos microorganismos
550 han demostrado ejercer efectos probióticos y antagonizar diversos patógenos bacterianos intestinales (Hugo et al, 2006; de Moreno de LeBlanc, 2008; Hugo et al, 2008; Trejo et al, 2010). Sin embargo, poco se conoce hasta el momento de la acción que ejercen los microorganismos probióticos en la interacción parásito-hospedador.

Las primeras evidencias de la capacidad antagónica de microorganismos
555 probióticos frente a *G. intestinalis* provienen del trabajo de Pérez y col. (Pérez et al, 2001), donde se describe una inhibición en el crecimiento *in vitro* de trofozoitos de *Giardia*, al ser incubados con sobrenadantes de cultivos de *Lactobacillus johnsonii* La1. El mismo efecto se observa cuando se co-incuban sobrenadantes de una combinación de microorganismos aislados de kefir (*L. plantarum*, *L. kefir* y *S. lipolytica*), con
560 trofozoitos de *Giardia* (Humen, 2009). Este efecto inhibitorio no parece ser una característica general de todos los probióticos, ya que por ejemplo sobrenadantes de la cepa SF68 de *Enterococcus faecium* no son capaces de inhibir la proliferación de trofozoitos del parásito (Benyacoub et al, 2005).

Utilizando el modelo merión (*Meriones unguiculatus*) para determinar el efecto
565 protector de los probióticos pudo ponerse de manifiesto que *L. johnsonii* La1 reduce

drásticamente la proporción de animales con trofozoitos activos en intestino, mostrando una resolución rápida de la infección (Humen et al, 2005). Asimismo, la administración del microorganismo probiótico produce una menor liberación de antígenos del parásito (proteína GSA-65) en materia fecal, no detectándose quistes. Además no se observan
570 infiltrados celulares en *lamina propria*, ni acortamiento de vellosidades intestinales en los animales tratados. *L. johnsonii* La1 protege eficientemente el estado fisiológico del intestino, evitando el deterioro en la actividad disacaridasa intestinal (Humen et al, 2005). Respecto a la respuesta inmune específica para estos mismos animales, se observó un aumento en la capacidad proliferativa de linfocitos T y linfocitos B de bazo, en
575 presencia de mitógenos específicos, y un mayor índice de proliferación frente a antígenos específicos de *Giardia* (Humen et al, 2005).

Todos estos hallazgos avalan la idea de un efecto protector *in vivo* derivado de la presencia del probiótico, el cual ha sido atribuido a muchos factores. La evidencia acumulada indica el posible rol de factores extracelulares (Coconnier et al, 1997; Lievin-
580 Le Moal et al, 2002), la interferencia en la interacción patógeno-enterocito (Bibiloni et al, 1999) y la capacidad moduladora sobre el sistema inmune (Benyacoub et al, 2003). Además de la inmunidad innata, tanto la respuesta inmune humoral como la mediada por células participan en la defensa contra la infección por *Giardia* (Langford et al, 2002; Singer and Nash, 2000).

585 La concentración de productos metabólicos en las suspensiones bacterianas administradas a los meriones resulta demasiado baja como para atribuir los efectos al transporte de sustancias preformadas (Humen et al, 2005). De esta manera, el efecto anti $giardi$ ásico *in vivo* podría ser atribuido a la producción de sustancias inhibitorias *in situ* y a la capacidad de modular la respuesta inmune del hospedador. Esto está en
590 concordancia con los resultados publicados donde se muestra que *L. johnsonii* La1 produce factores extracelulares anti-*Giardia* (Pérez et al, 2001), y que es capaz de modular la respuesta inmune (Schiffrin et al, 1997; Blum et al, 1999).

Con el fin de evaluar nuevos aspectos en la interacción *in vivo* parásito-hospedador, con la intervención de microorganismos probióticos, resulta más adecuado
595 la utilización del modelo murino, ya que para el modelo merión se carece de herramientas inmunológicas.

En un estudio con distintas cepas potencialmente probióticas se han encontrado diferentes efectos entre los que pudo observarse una disminución e intensidad de la tasa de infección, una disminución en la liberación de antígenos del parásito en heces y un
600 aumento en la producción de anticuerpos IgA e IgG específicos anti-*Giardia* (Humen, 2009). Esto demostraría que cada cepa probiótica tiene un patrón de acción específico y que los resultados encontrados en una cepa no puede ser extrapolado a otros microorganismo relacionados.

Un estudio del balance de poblaciones celulares relevantes en la respuesta del
605 hospedador frente a *G. intestinalis* en presencia del *L. johnsonii* La1, mostró que la efectividad del tratamiento estaría relacionada con el aumento de la capacidad de presentación antigénica en placas de Peyer, donde se llevaría a cabo la activación de efectores inmunes. No ocurre lo mismo en ganglios linfáticos mesentéricos, lo que indicaría que no existe traslocación bacteriana asociada a la infección en los animales
610 tratados. Estos resultados podrían explicar, al menos en parte, la disminución en la tasa e intensidad de infección y la protección del estado fisiológico previamente observado en este modelo animal.

Estas evidencias abren el camino para la exploración de alternativas naturales a los tratamientos tradicionales, y muestran el potencial de ciertos microorganismos
615 probióticos para proteger al hospedador ante una infección por *Giardia*, sentando las bases para una nueva dimensión en el estudio y la aplicación de estos microorganismos en la prevención de este tipo de enteropatógenos.

CONCLUSIONES GENERALES

620 Este breve recorrido por los factores de virulencia de diferentes patógenos intestinales y los posibles mecanismos involucrados en la protección mediante microorganismos probióticos muestran la potencialidad de esta aproximación preventiva/terapéutica para el control de patologías infecciosas que constituyen problemas recurrentes para la salud del hombre y de los animales.

625

REFERENCIAS



- [1] A. G. Abraham, M. Medrano, P. Mobili, F. Hamet, M. Serradel, D. E. Romanin, G. Diosma, G. L. De Antoni, G. L. Garrote. In A. Gomez Zavaglia, ed. *Aspectos Probióticos y Tecnológicos de las Bacterias Lácticas*. La Plata: UNLP. (2010)
- 630 [2] N. Agata, M. Ohta, M. Mori, M. Isobe, *FEMS Microbiol. Lett.* 129 (1995a) 17.
- [3] N. Agata, M. Ohta, M. Mori, M. Isobe, *Microbiology*. 141 (1995b) 983.
- [4] S. B. Aley, M. Zimmerman, M. Hetsko, M. E. Selsted, F. D. Gillin, *Infect. Immun.* 6 (1994) 5397
- [5] J. E. Alouf. In: Otto Holst, eds. *Bacterial Toxins. Methods and Protocols*. New York, NY: Springer (2000) pp: 1-26.
- 635 [6] J. Ankarklev, J. Jerlström-Hultqvist, E. Ringqvist, K. Troell, S.G. Svärd, *Nat. Rev. Microbiol.* 8 (2010) 413.
- [7] S. I. Asano, Y. Nukumizu, H. Bando, T. Ilzuka, T. Yamamoto. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 1054.
- 640 [8] T. Ashara, K. Shimizu, K. Nomoto, T. Hamabata, A. Ozawa, Y. Takeda, *Infect. Immun.* 72 (2004) 2240.
- [9] G. E. Baida, N. P. Kuzmin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1284 (1995) 122.
- [10] J. Ballongue, C. Schumann, P. Quignon, *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 222 (1997) 41.
- [11] J.G. Bartlett, T.W. Chang, N. Moon, A.B. Onderdonk. *Am. J. Vet. Res.* 39 (1978) 1525.
- 645 [12] D. J. Beecher, A. C. Lee Wong, *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1994) 1646.
- [13] D. J. Beecher, A. C. Lee Wong, *Microbiology*. 146 (2000) 3033.
- [14] D. J. Beecher, J. S. Pulido, N. P. Barney, A. C. Lee Wong, *Infect. Immun.* 63 (1995) 632.
- [15] J. Benyacoub, G.L. Czarnecki-Maulden, C. Cavadini, T. Sauthier, R.E. Anderson, E. J. Schiffrin, T. von der Weid, *J. Nutr.* 133 (2003) 1158.
- 650 [16] J. Benyacoub, P.F. Perez, F. Rochat, K.Y. Saudan, G. Reuteler, N. Antille, M. Humen, G. L. De Antoni, C. Cavadini, S. Blum, E.J. Schiffrin, *J. Nutr.* 135 (2005) 1171.
- [17] R. Bibiloni, P. F. Pérez, G. L. De Antoni, *Anaerobe* 5 (1999) 519.
- [18] S. K. Biswas, E. Lopez-Collazo, *Trends Immunol.* 30 (2009) 475.
- [19] S. Blum, S. Alvarez, D. Haller, P. Perez, E.J. Schiffrin, *Antonie Van Leeuwenhoek* 76 (1999) 199.
- 655 [20] S. P. Borriello, *J Antimicrob Chemother.* 41 Suppl (1998) 13

- [21] M. Bouvier, S. Meance, C. Bouley, J.L. Berta, J.C. Grimaud, *Biosci. Microflora*. 20 (2001) 43.
- [22] R.J. Boyle, R.M. Robins-Browne, M.L. Tang, *Am. J. Clin. Nutr.* 83 (2006)1256.
- 660 [23] M. M. Brashears, M. L. Galyean, G. H. Loneragan, J. E. Mann, K. Killinger-Mann, *J Food Prot.* 66 (2003) 748.
- [24] A. Buret, J. A. Hardin, M. E. Olson, D. G. Gall, *Gastroenterology*. 103 (1992) 506.
- [25] A. Caprioli, S. Morabito, H. Brugère, E. Oswald, *Vet. Res.* 36 (2005) 289.
- [26] E. Chaves-Olarte, E. Freer, A. Parra, C. Guzman-Verri, E. Moreno, M. Thelestam, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 7956.
- 665 [27] B. Chavez, A Martinez-Palomo, *J. Eukaryotic Microbiol.* 42(1995) 136.
- [28] C. C. Chen, C. H. Chiu, T. Y. Lin, H. Ning Shi, W. A. Walker, *Pediatr Res.*65 (2008) 169.
- [29] C. C. Chen, S. Louie, H. N. Shi, W. A. Walker, *Pediatr. Res.* 58 (2005) 1185.
- 670 [30] M. H. Coconnier, V. Lievin, M. F. Bernet-Camard, S. Hudault, A. L. Servin, *Antimicrob. Agents Chemother.* 41 (1997) 1046.
- [31] R.M. Dallal, B. G. Harbrecht, A. J. Boujoukas, C. A. Sirio, L. M. Farkas, K. K. Lee, R. L. Simmons, *Ann. Surg.* 235 (2002) 363.
- [32] G. Dalmasso, A. Loubat, S. Dahan, G. Calle, P. Rampal, D. Czerucka, *Res. Microbiol.* 157 (2006) 456.
- 675 [33] A. De Moreno de LeBlanc, S. Chaves, E. Carmuega, R. Weill, J. Antoine, G. Perdigon, *Immunobiology*. 213 (2008) 97.
- [34] Documento la epidemiología y la etiología de la diarrea. OPS. *Rev.Soc.Bol.Ped.* 34 (1995) 27.
- 680 [35] H. L. DuPont, *J. Pediatr.* 134 (1999) 1.
- [36] L. Eckmann, *Parasite Immunol.* 25 (2003) 259.
- [37] L. Eckmann, F. Laurent, T. D. Langford, M. L. Hetsko, J. R. Smith, M. F. Kagnoff, F. D. Gillin, *J. Immunol.* 164 (2000) 1478.
- [38] M. Ehling-Schulz, M. Fricker, H. Grallert, P. Rieck, M. Wagner, S. Scherer, *BMC Microbiol.* 6 (2006) 20.
- 685 [39] M. Ehling-Schulz, N. Vukov, A. Schulz, R. Shaheen, M. Andersson, E. Märtlbauer, S. Scherer, *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 105 .

- [40] G. W. Elmer, C. M. Surawicz, L. V. McFarland, *JAMA*. 275 (1996) 870.
- [41] A. Fagerlund, O. Ween, T. Lund, S. P. Hardy, P. E. Granum, *Microbiology*. 150 (2004) 2689.
- [42] M. J. G. Farthing, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 24 (1997) 79.
- [43] C. Forestier, C. De Champs, C. Vatoux, B. Joly, *Res Microbiol.* 152 (2001) 167.
- [44] R. Fuller, *Gut*. 32 (1991) 439.
- [45] M. G. Gareau, E. Wine, C. Reardon, P. M. Sherman, *J. Infect. Dis.* 201 (2010) 81.
- [46] E. Ghelardi, F. Celandroni, S. Salvetti, C. Barsotti, A. Baggiani, S. Senesi, *FEMS Microbiol. Lett.* 208 (2002) 129.
- [47] H. S. Gill, *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17 (2003) 755.
- [48] B. R. Goldin, *Annu. Rev. Microbiol.* 40 (1986) 367.
- [49] T. Graul, A. M. Cain, K. D. Karpa, *Med. Hypotheses*. 73 (2009) 194.
- [50] M. M. Häggblom, C. Apetroaie, M. A. Andersson, M. S. Salkinoja-Salonen, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 2479.
- [51] B. Henderson, M. Wilson, R. McNab, A Lax. In *Cellular Microbiology. Bacteria-Host Interactions in Health and Disease*. UK: John Wiley & Sons (1999) pp: 191-221.
- [52] D. Hill, R. D. Pearson, *Infect. Immun.* 55 (1987) 3155.
- [53] E. Hilton, P. Kolakowski, C. Singer, M. Smith, *J. Travel Med.* 4 (1997) 41.
- [54] P. F. Horwood, G. W. Burgess, H. J. Oakey, *FEMS Microbiology Letters*. 236 (2004) 319.
- [55] A. A. Hugo, G. L. De Antoni, P.F. Pérez, *Int. J. Food Microbiol.* 111 (2006) 191.
- [56] A. A. Hugo, E. J. Kakisu, G. L De Antoni, P.F. Pérez, *Lett. Appl. Microbiol.* 46 (2008) 613.
- [57] A. A. Hugo. Tesis Doctoral: *Capacidad probiótica de la cepa CIDCA 133 (Lactobacillus delbrueckii subsp lactis): un recorrido desde modelos in vitro a in vivo*. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP. 2007
- [58] M. A. Humen. Tesis doctoral: *Interacción de Giardia intestinalis con el hospedador. Efecto antagónico de probióticos intestinales*. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP. (2009).
- [59] M. A. Humen, G. L. De Antoni, J. Benyacoub, M. E. Costas, M. I. Cardozo, L. Kozubsky, K. Y. Saudan, A. Boenzli-Bruand, S. Blum, E. J. Schiffrin, P. F. Perez, *Infect Immun.* 73 (2005) 1265.

- [60] U. Husmark, U. Rönner, *J. Appl. Bacteriol.* 69 (1990) 557.
- 720 [61] C. Janoir, S. Péchiné, C. Grosdidier, A. Collignon, *J. Bacteriol.* 189 (2007) 7174.
- [62] K. C. Johnson-Henry, K. A. Donato, G. Shen-Tu, M. Gordanpour, P. M. Sherman, *Infect. Immun.* 76 (2008) 1340.
- [63] K. C. Johnson-Henry, M. Nadjafi, Y. Avitzur, D. J. Mitchell, B. Y. Ngan, E. Galindo-Mata, N. L. Jones, P. M. Sherman, *J. Infect. Dis.* 191 (2005) 2106.
- 725 [64] B. Kaplan, S. Uni, M. Aikawa, A. Mahmoud, *J. Immunol.* 134 (1985) 1975.
- [65] S. Karlsson, L. G. Burman, T. Akerlund, *Microbiology.* 154 (2008) 3430.
- [66] P. Katelaris, A. Naeem, M. J. Farthing, *Gut.* 37 (1995) 512.
- [67] J. A. Katz, *J. Clin. Gastroenterol.* 40 (2006) 249.
- [68] L. M. Keel, J. G. Songer, *Vet. Pathol.* 44 (2007) 814.
- 730 [69] Y. Kim, S. H. Kim, K. Y. Whang, Y. J. Kim, S. Oh, *J. Microbiol Biotechnol.* 18 (2008) 1278.
- [70] A. Kotiranta, M. Haapasalo, K. Kirsti, E. Kerosuo, I. Olsen, T. Sorsa, J. Meurman, K. Lounatmaa, *Infect. Immun.* 66 (1998) 4895.
- [71] A. Kotiranta, K. Lounatmaa, M. Haapasalo, *Microbes Infect.* 2 (2000) 189.
- 735 [72] J. M. Kramer, R. J. Gilbert. In: A. T. Tu. eds. *Food Poisoning. Handbook of Natural Toxins.* New York, NY: Marcel Dekker, Inc. (1992) pp: 119-153.
- [73] S. C. Kyriakis, V. K. Tsiloyiannis, J. Vlemmas, K. Sarris, A. C. Tsinas, C. Alexopoulos, L. Jansegers, *Res. Vet. Sci.* 67 (1999) 223.
- [74] T. D. Langford, M. P. Housley, M. Boes, J. Chen, M. F. Kagnoff, F. D. Gillin, L. Eckmann, *Infect. Immun.* 70 (2002) 11.
- 740 [75] H. E. Larson, S. P. Borriello, *Antimicrob. Agents Chemother.* 7 (1990) 1348.
- [76] D. Law, *J. Appl. Microbiol.* 88 (2000) 729.
- [77] M. Lessard, M. Dupuis, N. Gagnon, E. Nadeau, J. J. Matte, J. Goulet, J. M. Fairbrother, *J. Anim. Sci.* 87 (2009) 922.
- 745 [78] V. Lievin-Le Moal, A. L. Servin, *Clin. Microbiol. Rev.* 19 (2006) 315
- [79] V. Lievin-Le Moal, R. Amsellem, A. L. Servin, M. H. Coconnier, *Gut.* 50 (2002) 803.
- [80] W. H. Ling, O. Hänninen, H. Mykkänen, M. Hiekura, S. Salminen, A. Von Wright, *Ann. Nutr. Metab.* 36 (1992) 162.

- [81] W. H. Ling, R. Korpela, H. Mykkänen, S. Salminen, O. Hänninen, *J. Nutr.* 124 (1994) 18.
- 750 [82] H. Luján, *Medicina (Buenos Aires)*. 66 (2006) 70.
- [83] L. V. McFarland, C. M. Surawicz, R. N. Greenberg, R. Fekety, G. W. Elmer, K. A. Moyer, S. A. Melcher, K. E. Bowen, J. L. Cox, Z. Noorani, G. Harrington, M. Rubin, D. Greenwald, *JAMA*. 271 (1994) 1913.
- [84] M. J. Medellín-Peña, H. Wang, R. Johnson, S. Anand, M. W. Griffiths, *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (2007) 4259.
- 755 [85] M. Medrano, M. F. Hamet, A. G. Abraham, P. F. Pérez, *Antonie Van Leeuwenhoek*. 96 (2009) 505.
- [86] M. Medrano, P. F. Pérez, A. G. Abraham, *Int.. J. Food Microbiol.* 122 (2008) 1.
- [87] E. Metchnikoff. Kastenbaum R, ed. *The prolongation of life. Optimistic studies*. New York, NY: Arno Press. 1977.
- 760 [88] S. Michail, F. Abernathy, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 35 (2002) 350.
- [89] J. Minnaard. Tesis doctoral: *Bacillus cereus*: estudios *in vitro* de factores de virulencia relevantes en el contexto de infecciones intestinales. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP. (2008).
- 765 [90] J. Minnaard, V. Lievin-Le Moal, M. H. Coconnier, A. L. Servin, P. F. Perez, *Infect. Immun.* 72 (2004) 3106.
- [91] J. Minnaard, M. Humen, P. F. Pérez, *J. Food Prot.* 64 (2001) 1535.
- [92] M. C. Minvielle, N. B. Molina, D. Polverino, J. A. Basualdo, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103 (2008) 98.
- 770 [93] P. B. Mortensen, M. R. Clausen, *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 216 (1996) 132.
- [94] E. Mylonakis, E. T. Ryan, S. B. Calderwood, *Arch. Intern. Med.* 161 (2001) 525.
- [95] J. P. Nataro, J. B. Kaper, *Clin. Microbiol. Rev.* 11 (1998) 142.
- [96] S. Notermans, C. A. Batt, *J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.* 84 (1998) 51S.
- [97] A. Nowak, Z. Libudzisz, *Eur. J. Nutr.* 48 (2009) 419.
- 775 [98] P. J. Oksanen, S. Salminen, M. Saxelin, P. Hamalainen, A. Ihantola-Vormisto, L. Muurasniemi-Isoviita, S. Nikkari, T. Oksanen, I. Porsti, E. Salminen, *Ann.Med.* 22 (1990) 53.
- [99] K. Orrhage, S. Sjostedt, C. E. Nord, *J.Antimicrob..Chemother.* 46 (2000) 603.

- [100] A. Paananen, R. Mikkola, T. Sareneva, S. Matikainen, M. Hess, M. Andersson, I. Julkunen, M. S. Salkinoja-Salonen, T. Timonen, *Clin. Exp. Immunol.* 129 (2002) 420.
- [101] N. Parassol, M. Freitas, K. Thoreux, G. Dalmaso, R. Bourdet-Sicard, P. Rampal, *Res. Microbiol.* 156 (2005) 256.
- [102] P. F. Pérez, J. Doré, M. Leclerc, F. Levenez, J. Benyacoub, P. Serrant, I. Segura-Roggero, E. J. Schiffrin, A. Donnet-Hughes, *Pediatrics* 119 (2007) 724.
- [103] P. F. Perez, J. Minnaard, M. Rouvet, C. Knabenhans, D. Brassart, G. L. De Antoni, E. J. Schiffrin, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 5037.
- [104] P. F. Pérez, E. J. Schiffrin, D. Brassart. In Schiavi C, eds. *Microorganisms as Health Supporters N°4. Probiotics, Biotherapeutics & Health*. Novara, Italy: Mofin Alce (2005) pp: 86-110
- [105] S. Plummer, M. A. Weaver, J. C. Harris, P. Dee, J. Hunter, *Int. Microbiol.* 7 (2004) 59.
- [106] S. M. Poutanen, A. E. Simor. *CMAJ.* 171 (2004) 51.
- [107] K. Rao, M. Brown, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1143 (2008) 83.
- [108] D. Rasko, M. Altherr, C. Han, J. Ravel, *FEMS Microbiol. Rev.* 29 (2005) 303.
- [109] N. Razaq, S. Sambol, N. Nagaro, W. Zukowski, W. Cheknis, S. Johnson, D. N. Gerding, *J. Infect. Dis.* 196 (2007) 1813.
- [110] J. E. Rehg, Y. S. Lu, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181 (1982) 1422.
- [111] M. Rivas, E. Miliwebsky, I. Chinen, N. Deza, G. A. Leotta, *Medicina (Buenos Aires)*. 66 (2006) 27.
- [112] I. Roberts-Thomson, D. P. Stevens, A. A. Mahmoud, K. S. Warren, *Gastroenterology*. 71 (1976) 57.
- [113] G. B. Rodríguez-Fuentes, R. Cedillo-Rivera, R. Fonseca-Liñán, R. Argüello-García, O. Muñoz, G. Ortega-Pierres, L. Yépez-Mulia, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 101 (2006) 693.
- [114] M. Roselli, A. Finamore, M. S. Britti, E. Mengheri, *Br. J. Nutr.* 95 (2006) 1177.
- [115] N. Rowan, K. Deans, J. Anderson, C. Gemmell, I. Hunter, T. Chaithong, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 3873.
- [116] K. Roxström-Lindquist, D. Palm, D. Reiner, E. Ringqvist, S. G. Svärd, *Trends Parasitol.* 22 (2006) 26.
- [117] E. Schiffrin, D. Brassart, A. Servin, F. Rochat, A. Donnet-Hughes, *Am. J. Clin. Nutr.* 66 (1997) 515S.

- 810 [118] J. L. Schoeni, A. C. Lee Wong, *J. Food Prot.* 68 (2005) 636.
- [119] A. L. Servin, *FEMS Microbiol. Rev.* 28 (2004) 405.
- [120] S. Singer, T. E. Nash, *J. Infect. Dis.* 181 (2000) 1510.
- [121] L. Slamti, D. Lereclus, *J. of Bacteriology.* 187 (2005) 1182.
- [122] L. P. Stenfors Arnesen, A. Fagerlund, P. E. Granum, *FEMS Microbiol. Rev.* 32 (2008)
815 579.
- [123] E. Swiatkowska, J. Socha, E. Sinski, P. Kluge, B. Oralewska, K. Kozlowski, *Pol. Tyg. Lek.* 45 (1990) 167.
- [124] M. Takahashi, H. Taguchi, H. Yamaguchi, T. Osaki, A. Komatsu, S. Kamiya, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 41 (2004) 219.
- 820 [125] K. Takumi, T. Koga, T. Oka, Y. Endo, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 37 (1991) 455.
- [126] A. Tasteyre, T. Karjalainen, V. Avesani, M. Delmé'e, A. Collignon, P. Bourlioux, M.-C. Barc, *J. Clin. Microbiol.* 39 (2001) 1178.
- [127] S. Tkalcic, T. Zhao, B. G. Harmon, M. P. Doyle, C. A. Brown, P. Zhao, *J. Food Prot.* 66 (2003) 1184.
- 825 [128] M. Torres, M. E. Silva, E. C. Vieira, E. A. Bambirra, M. I. Sogayar, F. J. Pena, J. R. Nicoli, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 25 (1992) 349.
- [129] M. Torres, A. Uetanabaro, A. Costa, C. Alves, L. Farias, E. Bambirra, F. Penna, E. Vieira, J. Nicoli, *J. Med. Microbiol.* 49 (2000) 209.
- [130] J. Tracy, L. T. Webster. In: AG Gilman and F. Murad, eds. *The pharmacological basis of therapeutics*, New York, NY: Mc Graw Hill Book Co. (1996) pp: 987-1008.
830
- [131] F. M. Trejo, J. Minnaard, P. F. Pérez, G. L. De Antoni, *Anaerobe.* 12 (2006) 186.
- [132] F. Trejo, P. F. Pérez, G. L. De Antoni, *Antonie Van Leeuwenhoek.* 98 (2010) 19.
- [133] F. M. Trejo. Tesis Doctoral: *Interacción entre Clostridium difficile, Lactobacilos y Bifidobacterias*. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP. (2009).
- 835 [134] B. A. Vallance, M. A. Khan, W. Deng, S. Gruenheid, B. B. Finlay, *Drug Dis. Today.* 1(2004) 73.
- [135] B. A. Vallance, C. Chan, M. L. Robertson, B. B. Finlay, *Scand. J. Gastroenterol.* 16 (2002) 771.
- [136] J. J. Varcoe, G. Krejcarek, F. Busta, L. Brady, *J. Food Prot.* 66 (2003) 457.
- 840 [137] B. Weiss, *J. Bacteriol.* 188 (2006) 829.

- [138] K. M. Wiencek, N. A. Klapes, P. M. Foegeding, *Biofouling*. 3 (1991) 139.
- [139] L. M. Wijnands, A. Pielaat, J. B. Dufrenne, M. H. Zwietering, F. M. van Leusden, *J. Appl. Microbiol.* 106 (2009) 258.
- [140] S. Wiles, S. Clare, J. Harker, A. Huett, D. Young, G. Dougan, G. Frankel, *Cell. Microbiol.* 10 (2004) 963.
- [141] G. D. Wu, W. Wang, P. G. Traber, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 7863.
- [142] X. Wu, B. A. Vallance, L. Boyer, K. S. Bergstrom, J. Walker, K. Madsen, J. R. O'Kusky, A. M. Buchan, K. Jacobson, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 294 (2008) G295.
- [143] R. J. Young, D. B. Whitney, T. L. Hanner, D. L. Antonson, J. V. Lupo, J. A. Vanderhoof, *Gastroenterology*. 114 (1998) A435.
- [144] T. Zhao, S. Tkalcic, M. P. Doyle, B. G. Harmon, C. A. Brown, P. Zhao, *J. Food. Prot.* 66 (2003) 924.