

## RESPUESTA DE RATONES INOCULADOS CON BACTERIAS LÁCTICAS DE ORIGEN BOVINO A UN DESAFÍO CON *SALMONELLA DUBLIN*

FRIZZO, L. S.<sup>1</sup>; PERALTA, C.<sup>2</sup>; ZBRUN, V.<sup>1</sup>; BERTOZZI, E.<sup>1</sup>; SOTO, L. P.<sup>1</sup>;

MARTI, E.<sup>1</sup>; DALLA SANTINA, R.<sup>1</sup>; SEQUEIRA, G. J.<sup>1</sup> & ROSMINI, M. R.<sup>1</sup>

### RESUMEN

*Salmonella dublin* produce un desbalance del ecosistema gastrointestinal de los animales de granja. Algunas bacterias lácticas han mostrado capacidad para contrarrestar los efectos de este patógeno. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto protector de un inóculo, formado por 3 cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) de origen bovino, en ratones desafiados con *Salmonella dublin* DSPV595T, mediante la observación de lesiones micromorfológicas patognomónicas producidas por el agente patógeno. El microorganismo patógeno se inoculó a 2 grupos de ratones convencionales, uno de los cuales fue previamente tratado con el inóculo BAL. El estudio histopatológico se realizó tanto en los animales que murieron espontáneamente después de haber sido desafiados con el patógeno, como en aquellos que sobrevivieron después de 24 días de haber recibido la *Salmonella*. El 50% de los animales que pertenecieron al grupo control murieron espontáneamente mientras que en el grupo tratado con BAL esa cifra alcanzó el 32%. Sólo un 10% de las hembras tratadas con BAL murieron espontáneamente mientras que en los machos esa cifra alcanzó al 46,7%. Todos estos individuos presentaron lesiones típicas. El tratamiento con el inóculo brindó protección a los ratones inoculados con *Salmonella dublin* DSPV 595T en la etapa en la cual se produjeron las muertes espontáneas. Las hembras resultaron mejor protegidas que los machos.

*Palabras clave:* bacterias lácticas, *Salmonella dublin*, protección de ratones.

### SUMMARY

#### **Response of mice inoculated with lactic acid bacteria of bovine origin experimentally challenged with *Salmonella dublin*.**

Salmonellosis is a disease that causes a disorder in the gastrointestinal ecosystem of farm animals. Some lactic acid bacteria have shown capacity to counteract the effects of this pathogen. The aim of this work was to study the protecting effect of an inoculum, formed by three lactic acid bacteria (LAB) strain of bovine origin, in mice challenged with *Salmonella dublin* DSPV595T, through the

---

1.- Departamento de Salud Pública Veterinaria (DSPV). Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL. Kreder 2805. (3080) Esperanza, provincia de Santa Fe. Email: lfrizzo@fcv.unl.edu.ar

2.- Laboratorio de Cito e Histopatología. FCV (UNL).

Manuscrito recibido el 30 de agosto de 2005 y aceptado para su publicación el 13 de octubre de 2005.

observation of micro-morphological pathognomonic lesions produced by the pathogenic agent. The pathogenic microorganism was inoculated to two conventional mice groups, having been one of them previously treated with the LAB inoculum. Histopathological studies were performed on both animals that spontaneously died after being challenged with the pathogen and animals that survived 24 days after receiving *Salmonella*. Fifty percent of control group animals died spontaneously vs. 32% in the group treated with LAB. Only 10% of females treated with LAB died spontaneously whereas within males the number reached 46,7%. All animals showed typical lesions. The treatment with the inoculum protected mice that were inoculated with *Salmonella dublin* DSPV 595T at the stage when spontaneous deaths occurred. Females were better protected than males.

*Key words:* lactic bacteria, *Salmonella dublin*, mice protection.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades gastrointestinales están ocasionadas generalmente por desbalances que se producen en el complejo ecosistema que habita el tracto gastroin-testinal de los animales de granja. Los antibióticos se utilizan habitualmente en el tratamiento de animales enfermos y también de manera profiláctica durante períodos de alto riesgo de enfermedades infecciosas (McEwen & Fedorka-Cray, 2002). Sin embargo, las terapias con antibióticos, en especial las administradas por vía oral, si bien controlan los microorganismos patógenos también afectan a muchos microorganismos benéficos produciendo trastornos en el equilibrio de la microbiota gastrointestinal (Salminen *et al.*, 1998). Además, muchos de estos antibióticos o sus residuos pueden quedar en los tejidos de los animales destinados al consumo humano.

La salmonelosis de los bovinos es una enfermedad ampliamente distribuida por todo el mundo. Las infecciones con *Salmonella dublin* son importantes por su impacto sobre la economía de la granja y la salud pública (Roberts, 1989).

Se ha demostrado que algunas bacterias ácido lácticas (BAL) son capaces de inhibir a patógenos intestinales *in vitro* (Hudault *et*

*al.*, 1997) y de proteger *in vivo* a ratones convencionales y gnotobióticos inoculados con *Salmonella enteritidis* subsp. *typhimurium* (Maia *et al.*, 2001, Moura *et al.*, 2001). Esto, sumado a su condición de GRAS (Generally Recognised As Safe), hace de las BAL una interesante herramienta profiláctica capaz de reemplazar a los antibióticos. El uso de los microorganismos autóctonos con capacidad probiótica es una alternativa terapéutica para el tratamiento y prevención de algunas patologías animales (Rosmini *et al.*, 2004).

Es reconocida la importancia de utilizar las cepas probióticas aisladas de un animal en la misma especie (Havenaar *et al.*, 1992). No obstante, es de utilidad evaluar la capacidad probiótica de las cepas en animales de laboratorio, por ser más económico, sencillo de realizar, las poblaciones son siempre homogéneas, las condiciones ambientales se pueden controlar y porque permite disponer de información sobre la actividad bacteriana *in vivo*.

Este trabajo forma parte de un estudio en el cual se pretende desarrollar un inóculo de bacterias probióticas destinado a mejorar los aspectos nutricionales y prevenir problemas sanitarios de la crianza artificial de los terneros, en la etapa de lactante, provenientes de establecimientos lecheros.

El objetivo fue estudiar el efecto protector de un inóculo, formado por 3 cepas de bacterias ácido lácticas de origen bovino, en ratones desafiados con *Salmonella dublin* DSPV595T, mediante la observación de lesiones micromorfológicas patognomónicas producidas por el agente patógeno.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ANIMALES

Se utilizaron 63 ratones convencionales (35 machos y 28 hembras) (*Mus musculus*) de cepa Swiss de 3 semanas de vida provistos por el Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV), Universidad Nacional del Litoral (UNL). Fueron agrupados en jaulas, separados por sexo, y se mantuvieron en condiciones de confort ambiental durante el experimento. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a la Guía para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (NRC, 1996). Se alimentaron con comida peleteada para roedores (Balanceados Constantino, Córdoba, Argentina). El alimento y el agua de bebida se suministraron *ad libitum* durante todo el experimento.

### MICROORGANISMOS

Se utilizaron tres cepas bacterianas de origen bovino: *Lactobacillus casei* DSPV 318T, *Lactobacillus salivarius* DSPV 315T, y *Pediococcus acidilactici* DSPV 006T, las cuales mostraron inocuidad y propiedades probióticas en estudios previos (Frizzo *et al.*, 2002; Frizzo *et al.*, 2004). Estas fueron obtenidas mediante aislamiento, a partir de terneros sanos criados artificialmente. Los aislados se conservaron a -80°C en medio MRS con 35% de glicerol y su identificación se realizó mediante técnicas de biología molecular (Schneider *et al.*, 2004).

La cepa de *Salmonella dublin* DSPV595T de origen bovino se obtuvo de un aislamiento realizado en la FCV a partir de órganos procedentes de una necropsia llevada a cabo en el Hospital de Salud Animal de la FCV y se conservó a -80°C en medio BHI con 35% de glicerol. Su perfil bioquímico se determinó mediante un ensayo con el sistema API 20 E (bioMerieux, Hazelwood, Mo.). La identificación fue realizada por el Servicio de Enterobacterias del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, dependiente de la Administración Nacional de Laboratorios e Instituto de Salud (A.N.L.I.S.), “Dr. Carlos G. Malbrán” (Argentina).

### PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Las BAL se multiplicaron en caldo MRS durante 18 horas a 37°C para obtener un cultivo madre de cada una de las cepas en estudio. Con el fin de establecer la concentración de las cepas a utilizar en los animales se realizaron diluciones decimales a partir de cada cultivo madre. A estos cultivos y a sus diluciones decimales se les efectuaron determinaciones de densidad óptica a 560 nm con un espectrofotómetro (Metrolab 330, UV Vis) y, paralelamente, se realizaron recuentos en placas para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC). Para cada cepa se construyó una curva de calibración a partir del logaritmo de las UFC y de las lecturas de densidad óptica obtenidas. Para preparar el inóculo que se administró a los animales, cada cultivo madre fue centrifugado a 2000g (Cavour VT 3216) durante 5 min y resuspendido en solución fisiológica (NaCl 0,15M) hasta obtener una concentración individual de  $10^9$  UFC ml<sup>-1</sup>. A continuación se mezclaron las tres cepas en contenedores *ad hoc*, se realizó un nuevo centrifugado en las condiciones antes mencionadas y se resuspendieron en 1/10 del volumen original con el fin de obtener una concentración de

10<sup>9</sup> UFC de cada cepa por cada 100 µl de suspensión.

### DISEÑO DEL EXPERIMENTO

La duración total de la experiencia fue de 35 días. Los animales se dividieron en dos grupos donde 31 ejemplares conformaron el grupo tratado (G-BAL) y 32 integraron el grupo control (G-C). Se determinó diariamente la morbilidad y la mortalidad acumulada. La apariencia del estado de salud de cada animal fue monitoreada dos veces al día durante todo el experimento. El criterio utilizado para caracterizar el estado normal y anormal en la apariencia de los individuos fue el siguiente (Shu & Gill, 2002): 1- normal, ratón con ojos brillosos y alertas, tiene un pelaje uniforme y brillante, responde a los estímulos y muestra interés en su ambiente; 2- anormal, pelaje erizado, pelo opaco, poco activo, poco interesado en el ambiente que lo rodea, signos de hiperventilación cuando se lo manipula, no responde a los estímulos y estado de agitación. La morbilidad se calculó en base a la proporción relativa de animales con apariencia anormal en cada grupo.

Para la evaluación de los cambios histológicos se definieron indicadores específicos

de lesiones para cada órgano partiendo de su presencia o ausencia. Dichos indicadores (Cuadro 1) permitieron estandarizar la rutina de observación y evaluar el grado de modificación de las estructuras.

A partir de la interpretación de los indicadores observados se estableció cuáles de los animales presentaban lesiones patognomónicas compatibles con salmonelosis y se tabularon sus frecuencias para el análisis estadístico. Se consideró animal con lesión completa micromorfológica patognomónica a un severo proceso inflamatorio agudo, en ocasiones de tipo hemorrágico, junto a la presencia de nódulos paratifoideos (centros de necrosis coagulativa infiltrada por polimorfonucleares -PMN-).

### TRATAMIENTO CON EL INÓCULO DE BAL

Un inóculo de 100 µl de la suspensión antes mencionada fue administrado diariamente a los 31 ratones del G-BAL por gavage esofágico, durante 10 días consecutivos, antes de la administración del microorganismo patógeno y día por medio durante el resto del experimento. El G-C fue inoculado de la misma manera pero con 100 µl de solución

Cuadro 1: Indicadores morfológicos de la enfermedad utilizados en este trabajo.

Órgano diana		
Yeyuno	Hígado	Bazo
Atrofia de vellosidades	Colangiohepatitis	Esplenitis aguda hemorrágica
Regeneración glandular	Tromboflebitis centrolobulillar	Nódulos paratifoideos <sup>1</sup>
Infiltración de lámina propia	Nódulos paratifoideos <sup>1</sup>	
Necrosis fibrinosa		
Vasculitis		
Nódulos paratifoideos <sup>1</sup>		

<sup>1</sup>Lesión patognomónica

fisiológica (NaCl 0,15M).

### INOCULACIÓN DEL PATÓGENO

La cepa de *Salmonella dublin* DSPV 595T, desarrollada en caldo BHI durante 18 horas a 37 °C, fue administrada por gavage esofágico, en el día 11 del experimento, a todos los ratones de ambos grupos estudiados (G-BAL y G-C). El inóculo contenía una suspensión de  $2,5 \cdot 10^5$  UFC en un volumen de 250  $\mu$ l. La dosis infectiva fue elegida tomando como referencia la información bibliográfica disponible (Silva *et al.*, 1999) y mediante la comprobación experimental, por estudio histopatológico previo a este experimento, de las lesiones de salmonelosis en un lote de 8 ratones (datos no publicados).

### NECROPSIAS

Se realizaron dos tipos de necropsias: programadas y no programadas. Las primeras se efectuaron en días prefijados con animales escogidos al azar (Cuadro 2) y al final de la experiencia con los animales que no murieron. Los animales fueron sacrificados por exanguinación para efectuar las correspondientes necropsias. Las segundas se realizaron a todos los animales que murieron después de la inoculación del patógeno

y dentro de las 12 horas posteriores a la muerte. Las lesiones macroscópicas que presentaban los animales se observaron y registraron. Los órganos obtenidos (yeyuno, hígado y bazo) fueron fijados en formol al 10% estabilizado (PBS pH 7,4).

### ELABORACIÓN Y OBSERVACIÓN DE PREPARADOS HISTOLÓGICOS

La reducción de las muestras se efectuó dentro de las 24 horas del sacrificio o muerte espontánea del animal y previa deshidratación fueron montadas en tacos de parafina. Los cortes se efectuaron mediante un micrótopo tipo Minot con un grosor de 3 a 5  $\mu$ m y posteriormente fueron sometidos a la coloración de hematoxilina de Mayer-eosina. La observación se efectuó con un microscopio binocular Olympus CH 40 y para la captura de imágenes se utilizó una cámara digital Olympus 4000.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La frecuencia de las lesiones en ambos lotes se analizó mediante el test de chi-cuadrado con corrección de Yates. Las pruebas estadísticas se realizaron con el Programa Graphpad InStat Software (1994) versión 3.01.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro 2: Detalle de las necropsias programadas efectuadas al inicio del experimento.

Día de experimento	Número de animales sacrificados	
	G-C	G-BAL
Día 0 (sin inóculo en ambos grupos)	2	2
Día 7 (inóculo probiótico en G-BAL)	2	2
Día 14 (probiótico + <i>Salmonella dublin</i> en G-BAL. <i>Salmonella dublin</i> en G-C)	2	2

### NECROPSIAS PROGRAMADAS (INICIO DEL EXPERIMENTO)

No se encontraron diferencias macroscópicas ni histopatológicas en los dos grupos estudiados. Ninguno de los animales tenía lesiones compatibles con salmonelosis. Tomando en consideración la distribución que tuvieron estas necropsias a lo largo del tiempo (Cuadro 2), los resultados obtenidos permiten realizar 3 consideraciones: en primer lugar, al iniciar el experimento los animales se encontraban en similares condiciones de salud; en segundo lugar, las bacterias que integraron el inóculo no perjudicaron a los individuos del G-BAL, resultados que confirman las observaciones realizadas en un trabajo anterior (Frizzo *et al.*, 2004) y, por último, durante el tiempo transcurrido entre la inoculación del patógeno y la última necropsia (4 días) no se desarrollaron lesiones típicas.

### NECROPSIAS NO PROGRA-

*Cuadro 3: Distribución por sexo de lesiones micromorfológicas patognomónicas de salmonelosis en los animales utilizados en el experimento.*

Necropsias	Grupos	Con lesiones			Sin lesiones			Totales
		Machos	Hembras	Total	Machos	Hembras	Total	
Programadas (inicio experimento)	G-C	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	100,0%	100,0%	6
	G-BAL	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	100,0%	100,0%	6
Muertes espontáneas	G-C	42,8% <sup>a</sup>	50,0% <sup>a</sup>	46,2%	0,0%	8,3%	8,3%	13 <sup>1</sup>
	G-BAL	46,7% <sup>a</sup>	10,0% <sup>b</sup>	32,0%	0,0%	0,0%	0,0%	8 <sup>2</sup>
Programadas (final experimento)	G-C	37,5%	20,0%	30,8	62,5%	80,0%	69,2%	13
	G-BAL	50,0%	22,2%	35,3	50,0%	77,8%	64,7%	17
Totales		20	10		15	18		63
				30			33	

*Letras y números diferentes indican diferencias significativas (P<0,05)*

### MADAS (MUERTE ESPONTÁNEA POST- INOCULACIÓN CON *SALMONELLA* *DUBLIN DSPV595T*)

Durante la necropsia, en ambos grupos experimentales, se observaron en los órganos estudiados las mismas lesiones macroscópicas: esplenomegalia, hepatomegalia, ictericia hepática y nódulos miliares blancos visibles subcapsularmente o ubicados en el parénquima en la superficie de corte y distribuidos aleatoriamente en hígado y bazo. Las mucosas intestinales se observaron desde congestivas hasta hemorrágicas.

El período de muertes espontáneas abarcó 14 días, comprendidos entre los días 17 (6 días post-inoculación del patógeno) y 31 de la experiencia (fin de las muertes espontáneas). En los 7 primeros días de este período se murieron 3 animales del G-BAL y 10 animales del G-C, concentrándose la mayoría de las muertes de este grupo en el tercer día. Durante el resto de este período

la muerte espontánea de los animales se produjo en forma de goteo en los dos grupos. Un total de 21 animales murieron en forma espontánea luego del desafío. De estos, 13 pertenecían al G-C y 8 al G-BAL ( $P < 0,05$ ) (Cuadro 3).

En los dos grupos estudiados (G-C y G-BAL) se produjo un importante número de muertes que pone en evidencia el poder patógeno de la cepa de *S. dublin* utilizada. Una observación similar fue realizada por Wray *et al.* (1989), quienes mencionaron que la infección por *S. dublin* produce una alta morbilidad y mortalidad en terneros y una morbilidad significativa en ganado adulto.

Del total de machos del G-C, un 42,8% murieron espontáneamente y todos ellos presentaban lesiones típicas de salmonelosis. En el caso de las hembras del mismo grupo, el 50% murieron espontáneamente y sólo 1 de ellas (8,3%) no presentaba lesiones patológicas (nódulos paratifoideos) (Cuadro 3) a pesar de tener evidentes lesiones histopatológicas a nivel intestinal. Si bien no se pudo establecer la causa de la muerte de ese individuo que murió espontáneamente sin evidenciar lesiones típicas, resulta razonable pensar que podría estar relacionada con una presentación sobreguada de la enfermedad. Por otra parte, los resultados muestran que la mortandad en este período no presentó diferencias entre los sexos ( $P > 0,05$ ).

En el G-BAL, el 46,7% de los machos y el 10% de las hembras murieron espontáneamente ( $P < 0,05$ ) y todos presentaron lesiones típicas (Cuadro 3). Estos resultados muestran una clara diferencia entre los sexos cuando el inóculo fue suministrado y está evidenciando que las hembras resistieron mejor a la agresión del patógeno. Si se compara este resultado con lo ocurrido en el G-C puede observarse que de los 4 lotes de ratones estudiados, el que mejor se comportó frente al patógeno fue el de las hembras que

recibieron el inóculo.

En el Cuadro 3 se observan, además, diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las proporciones de las hembras muertas espontáneamente en el G-C y G-BAL. Este resultado muestra el papel protector que desempeñó el inóculo en los animales tratados y, al mismo tiempo, refuerza la idea de una mayor resistencia por parte de las hembras. Maia *et al.* (2001) y Moura *et al.* (2001) demostraron un efecto protector de BAL frente a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. typhimurium en ratones. Una de las hipótesis más comúnmente usadas para explicar este efecto de los probióticos frente a la infección microbiana es el antagonismo a través de metabolitos tóxicos (ácido láctico, peróxido de hidrógeno) o sustancias inhibidoras (bacteriocinas, sustancias similares a antibióticos) (Silva *et al.*, 1999). En estudios previos se observó que la cepa *Pediococcus acidilactici* DSPV 006T, la cual formó parte del inóculo de BAL estudiado, produce sustancias inhibidoras (Frizzo *et al.*, 2002).

El ingreso de *Salmonella* por vía oral, la proliferación en el intestino delgado y su rápida penetración en la lámina propia, provoca edema, proliferación de macrófagos, reclutamiento de linfocitos y PMN con dilatación del quílifero central de las vellosidades. Esto genera una caída pronunciada de los enterocitos apicales y una reacción proliferativa en el fondo de las criptas (enteritis regenerativa). El ciclo se descompensa rápidamente, provocando una atrofia y fusión de las vellosidades. La bacteria invade los nódulos linfáticos regionales con reclutamiento de macrófagos y PMN. Lo mismo acontece en las venas submucosas produciendo flebitis y tromboembolias. Los trastornos circulatorios llevan a una lesión irreversible apical de las vellosidades con necrosis, hemorragias y exudación de fibrina (enteritis fibrinocrítica). La diseminación

bacteriana por la vía hemolinfática provoca la etapa de septicemia o bacteriemia transitoria con compromiso de los ganglios linfáticos mesentéricos, el hígado y el bazo (Jubb *et al.*, 1988; Tizard, 1996; Robbins, 2000).

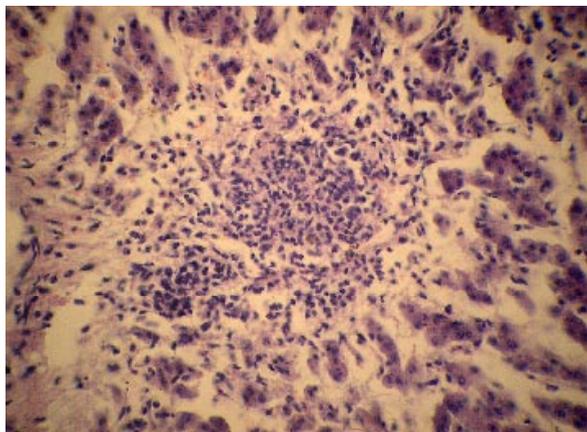
En hígado se pudo observar que la mayoría de los animales presentaron colangiohepatitis mononuclear en los espacios porta con estasis canalicular e infiltración mixta intrasinusoidal (Fig. 1). Los nódulos paratifoideos se ubicaron sin una localización estable en la estructura del lobulillo tradi-

cional. Estos nódulos son el resultado del reclutamiento de los macrófagos y los PMN (Fig. 2). Finalmente se forman centros de necrosis de coagulación focal (Fig. 3) como consecuencia de la muerte de los fagocitos.

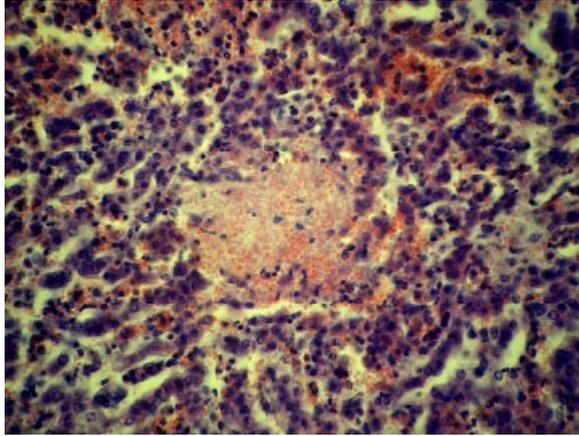
En bazo, en la mayoría de los casos, se observó un severo proceso inflamatorio agudo, en ocasiones de tipo hemorrágico, con la presencia de nódulos paratifoideos (Figs. 4 y 5). Este proceso es consecuencia de la bacteriemia y del reclutamiento de macrófagos y PMN en la pulpa roja del órgano.



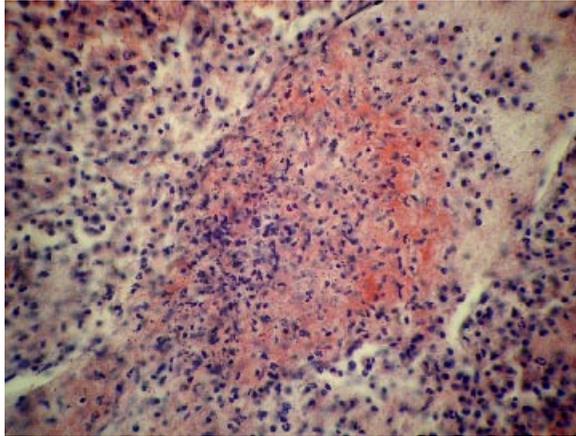
*Fig. 1: Colangiohepatitis con infiltración periportal de mononucleares y estasis biliar intracanalicular (Hígado; H-E x 40)*



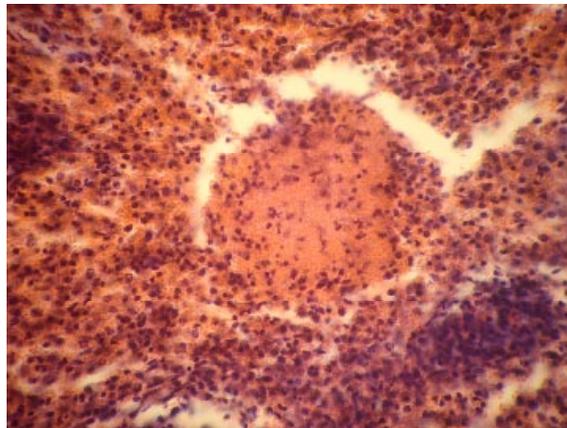
*Fig. 2: Formación inicial de un nódulo paratifoideo con reclutamiento de PMN y macrófagos con escasa necrosis de coagulación (Hígado; H-E x 400).*



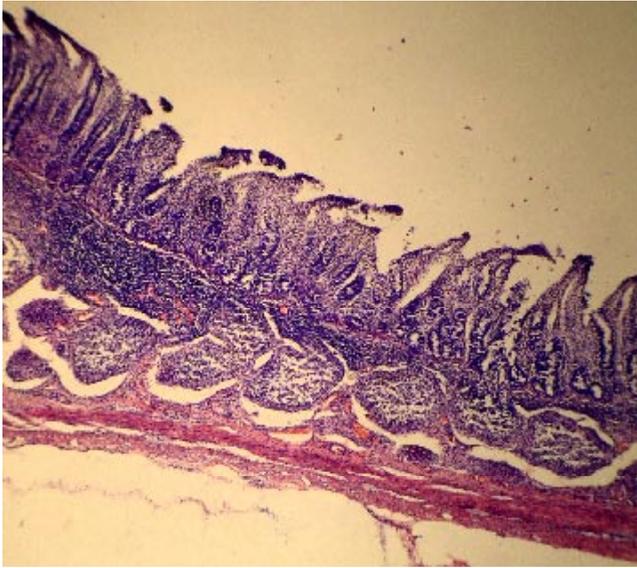
*Fig. 3: Nódulo paratifoideo totalmente conformado con amplia necrosis de coagulación (Hígado; H-E x 400)*



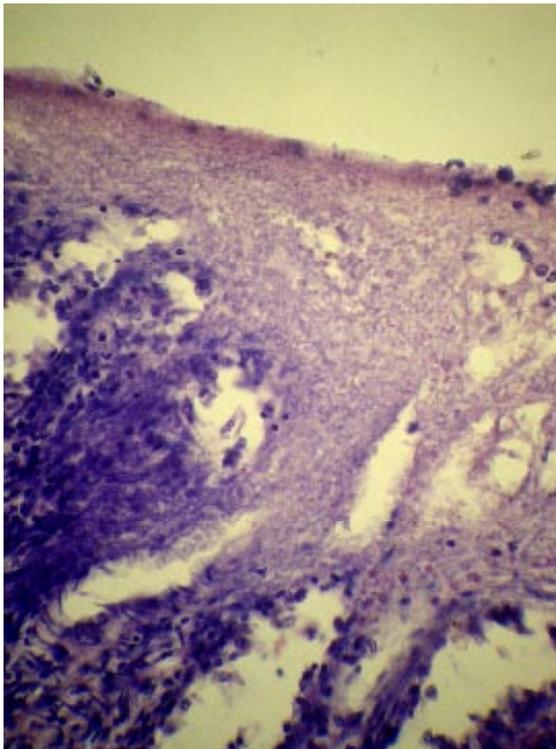
*Fig. 4: Nódulo paratifoideo inicial en la pulpa roja (Bazo; H-E x 400)*



*Fig. 5: Nódulo paratifoideo totalmente conformado con un entorno de pulpa roja con esplenitis hemorrágica (Bazo; H-E x 400)*



*Fig. 6: Enteritis con atrofia de las vellosidades, dilatación del quilífero central, infiltración mononuclear de la lámina propia e hiperplasia de la placa de Peyer (Yeyuno; H-E x*



*Fig. 7: Enteritis fibrinonecrotica con ausencia de vellosidades y capa de fibrina con restos celulares (Yeyuno; H-E x 400)*

En yeyuno, en aquellos animales que murieron al principio de la etapa de muertes espontáneas, se observó una enteritis con necrosis de las glándulas y vellosidades junto a un intento regenerativo del fondo glandular (Fig. 6). Mientras que aquellos que murieron al final de la etapa de muertes espontáneas presentaban enteritis fibrino-necrótica, infiltración de la lámina propia y conservación de las vellosidades y glándulas (Fig. 7).

**NECROPSIAS PROGRAMADAS (FINAL DEL EXPERIMENTO)**

Entre los días 31 y 35 de la experiencia no se produjeron muertes espontáneas, por lo cual el día 35 se sacrificaron los 30 animales restantes (13 del G-C y 17 del G-BAL).

El análisis histopatológico realizado a partir de estas necropsias mostró que el 80% de las hembras del G-C y el 77,8% de las hembras del G-BAL finalizaron el experimento sin lesiones típicas mientras que en los machos sólo el 62,5 % del G-C y el 50% del G-BAL no tenían lesiones típicas (Cuadro 3). Esto muestra, nuevamente, una diferencia entre los sexos pero no entre el G-C y el G-BAL y estaría relacionada a un mejor comportamiento en la resolución de la enfermedad por parte de las hembras frente a la cepa patógena en esta etapa avanzada. *S. dublin* es un serotipo adaptado al hospedador (Brackelsberg *et al.*, 1997), que produce portadores y causa diarrea en áreas endémicas y septicemia, neumonía, fiebre y diarreas esporádicas en áreas no endémicas

(McDonough *et al.*, 1999). Los animales que finalizaron con lesiones podrían haber alcanzado el estado de portador.

**SOBREVIVENCIA Y MORBILIDAD**

El G-C alcanzó el 100% de morbilidad al final del estudio, frente al 65% del G-BAL ( $P<0,05$ ). Sólo el 50% de los animales del G-C sobrevivió al desafío, frente al 68% del G-BAL ( $P<0,05$ ) (Cuadro 4). Algunos individuos del G-BAL no enfermaron, a pesar de haber estado en contacto directo con el agente etiológico, posiblemente debido a la influencia que el inóculo tuvo sobre su sistema inmunológico, generando las defensas necesarias que evitaron el desencadenamiento de esta enfermedad.

En el G-BAL las muertes se produjeron en forma de goteo a lo largo del experimento, mientras que en el G-C, en la etapa temprana de la infección, se produjo un pico de mortandad. Este comportamiento del patógeno en el G-BAL brinda disponibilidad de tiempo para aplicar un tratamiento terapéutico específico antes que se desencadene la mortandad en el lote en forma brusca.

En conclusión, el tratamiento con el inóculo de bacterias ácido lácticas brindó protección a los ratones inoculados con *Salmonella dublin* DSPV 595T en la etapa en la cual se produjeron las muertes espontáneas. Las hembras resultaron mejor protegidas que los machos.

El estudio histopatológico permitió corroborar la inocuidad del inóculo utilizado

*Cuadro 4: Sobrevivencia y morbilidad acumulada al finalizar el experimento.*

Grupo experimental	Morbilidad	Sobrevivencia
G-C	100% <sup>a</sup>	50% <sup>a</sup>
G-BAL	65% <sup>b</sup>	68% <sup>b</sup>

*Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas (P<0,05)*

y confirmó las diferencias encontradas en la sobrevivencia entre lotes.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del proyecto PICT N° 08-06970 financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y del proyecto CAI+D n° 14-1-11 financiado por la Universidad Nacional del Litoral. Los autores expresan su agradecimiento a la Dra. María Inés Caffer del Servicio de Enterobacterias del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, dependiente de la Administración Nacional de Laboratorios e Instituto de Salud (A.N.L.I.S.), “Dr. Carlos G. Malbrán” (Argentina) y al Dr. Luis Calvino de la EEA INTA Rafaela (Argentina), por el apoyo brindado en la identificación de *Salmonella dublin* DSPV 595T.

L. S. Frizzo y L. P. Soto son becarios del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET, Argentina).

## BIBLIOGRAFÍA

- BRACKELSBERG, C. A.; L. K. NOLAN & J. BROWN.** 1997. Characterization of *Salmonella dublin* and *Salmonella typhimurium* (Copenhagen) isolates from cattle. *Vet. Res. Commun.* 21: 409-420.
- FRIZZO, L. S.; G. SEQUEIRA; M. R. ROSMINI; J. BINNER & L. ZEQUIN.** 2002. Evaluación de la actividad antimicrobiana de cepas bacterianas indígenas aisladas de terneros lactantes. *Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas 2002*, p. 59-60. Fac. de Ciencias Veterinarias. UNR. Casilda. Santa Fe, Argentina.
- FRIZZO, L. S.; M. V. ZBRUN; E. BERTOZZI; G. SEQUEIRA; E. MARTÍ; R. DALLA SANTINA & M. R. ROSMINI.** 2004. Colonización del tracto intestinal de ratones convencionales por *Lactobacillus casei* DSPV 318T. *Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas 2004*, p. 57-58. Fac. de Ciencias Veterinarias. UNR. Casilda. Santa Fe, Argentina.
- GRAPHPAD INSTAT SOFTWARE.**® 1994. Versión 3.1. Serial number: 50533-353. Copyright© Graphpad.
- HAVENAAR, R.; B. TEN BRINK & J. H. HUIS IN'T VELT.** 1992. Selection of strains for probiotic use. In: *Probiotics: The Scientific Basis*, R. Fuller Ed. Londres, Chapman & Hall. p. 209-224.
- HUDAULT, S.; V. LIÉVIN; M. F. BERNET-CAMARD & A. L. SERVIN.** 1997. Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (Strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Appl. Environ. Microb.* 63: 513-518.
- JUBB, K. V. F.; P. C. KENNEDY & N. PALMER.** 1988. Patología de los animales domésticos. 3e. Montevideo, Hemisferio Sur.
- MAIA, O. B.; R. DUARTE; A. M. SILVA; D. C. CARA & J. R. NICOLI.** 2001. Evaluation of the components of a commercial probiotic in gnotobiotic mice experimentally challenged with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *typhimurium*. *Vet. Microbiol.* 79: 183-189.
- MCDONOUGH, P. L.; D. FOGELMAN; S. J. SHIN; M. A. BRUNNER & D. H. LEIN.** 1999. *Salmonella enterica* serotype Dublin infection: an emerging infectious disease for the northeastern United States. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2418-2427.
- MCEWEN, S. A. & P. J. FEDORKA-CRAY.** 2002. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin. Infect. Dis.* 34 (Suppl 3): S93-S106.
- MOURA, L. N.; E. NEUMANN; L. Q. VIEIRA & J. R. NICOLI.** 2001. Protection by *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2B20 against

- experimental oral infection with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. typhimurium in gnotobiotic and conventional mice. *Braz. J. Microbiol.* 32: 66-69.
- NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL)** 1996. Guide of the care and use of laboratory animals. Washington D.C., National Academy Press.
- ROBERTS, T.** 1989. Human illness costs of foodborne bacteria. *Am. J. Agric. Econ.* 71: 468-474.
- ROBBINS.** 2000. Patología funcional y estructural. 6e. Madrid, McGraw Hill-Interamericana.
- ROSMINI, M. R.; G. J. SEQUEIRA; I. GUERRERO LEGARRETA; L. E. MARTÍ; R. DALLA SANTINA; L. FRIZZO & J. C. BONAZZA.** 2004. Producción de probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 3: 187-197.
- SALMINEN, S.; M. A. DEIGHTON; Y. BENNO & S. L. GORBACH.** 1998. Lactic acid bacteria in health and disease. En: *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, S. Salminen y A. Von Wright Eds. Nueva York, Marcel Dekker Inc., pp. 211.
- SILVA, A. M.; E. A. BAMBIRRA; A. L. OLIVEIRA; P. P. SOUZA; D. A. GOMES; E. C. VIEIRA & J. R. NICOLI.** 1999. Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with *Salmonella enteritidis* subsp. *typhimurium* in conventional and gnotobiotic mice. *J. Appl. Microbiol.* 86: 331-336.
- SCHNEIDER, R.; M. R. ROSMINI; M. HERMANN & R. VOGEL.** 2004. Identificación de bacterias lácticas componentes de la microbiota típica de los terneros criados en condiciones artificiales. *FAVE Ciencias Veterinarias*, 3: 7-15.
- SHU, Q. & H. S. GILL.** 2002. Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR201) against *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 34: 59-64.
- TIZARD, I. R.** 1996. *Inmunología Veterinaria*. México, McGraw Hill-Interamericana.
- WRAY, C.; Q. C. WADSWORTH; D. W. RI-CHARDS & J. H. MORGAN.** 1989. A three-year study of *Salmonella dublin* infection in a closed dairy herd. *Vet. Rec.* 124: 532-537.