

Eficacia de un probiótico sobre *Escherichia coli* K88 en cerdos

Efficacy of a probiotic on *Escherichia coli* K88 in swine

Ernesto Vega-Cañizares^{1✉}, Miguel Pérez-Ruano², Mabelín Armenteros-Amaya², Juan Emilio Hernández-García³, Juan Carlos Rodríguez-Fernández³, Gregory Valdez-Paneca³

¹Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, CP 32 700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

²Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Agraria de La Habana, “Fructuoso Rodríguez Pérez” (UNAH), San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

³Facultad Agropecuaria, Universidad de Sancti Spíritus, “José Martí Pérez” (UNISS), Sancti Spiritus, Cuba.

RESUMEN: El empleo de probióticos para mejorar la salud y la producción animal se ha motivado por los efectos beneficiosos de los mismos sobre el hospedero. Con el objetivo de evaluar la eficacia de un probiótico sobre la reducción de la carga bacteriana de *Escherichia coli* K88 en cerdos se aplicó un probiótico compuesto por *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus termophilus* en cerdos de la categoría crías. Se conformaron tres grupos de cerdos; en todos los grupos el tratamiento se aplicó por vía oral, al momento del nacimiento y a las 24 horas siguientes. En el primer grupo se aplicó 5 mL del probiótico, que contenía miel de caña, levadura torula y cultivo de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus termophilus*; al segundo grupo se le aplicó 5 mL de miel de caña y levadura torula y al tercer grupo se le aplicó 5 mL de agua estéril. Todos los animales de los diferentes grupos se inocularon posteriormente por vía oral, con la cepa *Escherichia coli* K88. Se concluye que el empleo del probiótico reduce significativamente la carga bacteriana de la cepa *Escherichia coli* K88 en heces fecales de cerdos a partir de los 14 días postratamiento.

Palabras clave: probióticos, *Escherichia coli* K88, cerdos.

ABSTRACT: The use of probiotics to improve health and animal production has been motivated by their beneficial effects on the host. In order to evaluate the efficacy of a probiotic on the reduction of the bacterial load of *Escherichia coli* K88 in swine, a probiotic, composed of *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus termophilus*, was applied in breeding pigs. Three groups of pigs were formed. In all of them, the treatment was applied orally, at the time of birth and at the following 24 hours. In the first group, 5 mL of the probiotic, containing cane honey, torula yeast and culture of *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus termophilus*, were applied. The second group was applied 5 mL of cane honey and torula yeast, and the third group was applied 5 mL of sterile water. All the animals from the different groups were subsequently inoculated orally with the strain *Escherichia coli* K88. It is concluded that the use of this probiotic significantly reduces the bacterial load of the strain *Escherichia coli* K88

Key words: probiotics, *Escherichia coli* K88, swine.

✉ Autor para correspondencia: Ernesto Vega-Cañizares. E-mail: evega@censa.edu.cu

Recibido: 26/12/2016

Aceptado: 3/9/2017

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, un gran número de investigaciones se han centrado en el desarrollo de alternativas a los antibióticos para mantener la salud y el rendimiento de los cerdos. Dentro de las principales alternativas estudiadas se encuentran el uso de probióticos (1).

Los probióticos se consideran alimentos funcionales, definidos como microorganismos vivos, que cuando están presentes en cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud del hospedero (2). Los mismos tienen un efecto protector contra los patógenos locales (3) y un efecto indirecto en la mejora de la respuesta inmunológica (4).

En el momento del nacimiento el aparato digestivo del feto de los mamíferos es estéril de colonización microbiana; sin embargo, a las 48 horas posteriores al nacimiento ya se describe colonización bacteriana con niveles de 10^{10} microorganismos por gramos de heces fecales y el equilibrio microbiano intestinal se establece entre los siete y 15 días de nacidos (5).

El uso de probióticos, prebióticos y simbióticos constituye una de las principales estrategias para modular la microbiota gastrointestinal con efectos en la nutrición y salud del hospedero (6).

Se describe que el principal modo de acción de los probióticos es la modulación sobre la microbiota beneficiosa nativa presente en los huéspedes (7). La introducción de especies bacterianas beneficiosas puede ser una opción muy atractiva para restablecer el equilibrio microbiano y prevenir enfermedades (8).

Las cepas bacterianas usadas en la obtención de probióticos deben ser resistentes a los antibióticos administrados en la dieta animal y, además, producir sustancias antimicrobianas, tales como ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, entre otras (9).

Para la selección del microorganismo con la finalidad de su actividad probiótica se utilizan criterios, como son la capacidad de resistir el

paso por el ambiente gástrico y de sobrevivir al ambiente intestinal (10). Una vez seleccionado el microorganismo es importante demostrar su capacidad de beneficiar la salud del hospedero. Uno de los beneficios puede ser la capacidad de proteger contra los desafíos infecciosos o patológicos (11).

La resistencia de los patógenos a los antibióticos y la posibilidad de residuos de estos últimos en los productos animales atraen cada vez más la atención y el interés por el uso de alternativas a los antibióticos en la alimentación animal (12). Investigaciones recientes con bacterias ácido lácticas, como probiótico en la alimentación de la especie porcina, sugieren que las mismas constituyen una potencial alternativa al empleo de los antibióticos. Las bacterias ácido lácticas incluyen especies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* spp. y otros microorganismos (13).

En un estudio previo realizado en cerdos, donde se utilizó un preparado a partir de cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus termophilus*, se comprobó la colonización del tracto gastrointestinal por estas cepas hasta los 14 días postratamiento y se observó que la frecuencia de aplicación del probiótico no influye en ella (14). Sin embargo, se desconoce la eficacia *in vivo* de este probiótico sobre la reducción de la carga bacteriana de cepas patógenas productoras de diarreas en el cerdo. Sobre la base de estos antecedentes el presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar la eficacia de un probiótico en la reducción de la carga bacteriana de la cepa patógena *Escherichia coli* K88.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se conformaron tres grupos de cerdos clínicamente sanos (ocho animales en cada grupo), de la categoría cría del cruce comercial Landrace Yorkshire-Duroc. En el primer grupo se aplicaron 5 mL del probiótico, al segundo grupo, 5 mL de placebo (miel de caña y levadura torula, preparado en igual proporción

que el probiótico) y, al tercer grupo, 5mL de agua estéril.

El probiótico consistió en: mezclar 150 mL de miel de caña, 100 mg de levadura torula y se completó con agua a 1L de volumen total. Posteriormente, se esterilizó a 121°C durante 30 minutos y se le añadió 25 mL del cultivo de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus termophilus* y se incubó a 42 - 45 °C durante 48 horas. La concentración de microorganismos en el producto final osciló entre 10⁸ y 10⁹ unidades formadoras de colonias/mL (ufc/mL). En todos los grupos el tratamiento se aplicó por vía oral al momento del nacimiento y a las 24 horas después.

Experimento de confrontación

Cinco días después del último tratamiento se inocularon todos los animales por vía oral con 3 mL de la cepa de *Escherichia coli* K88, en una concentración de 10⁶ ufc/mL. La cepa que se utilizó pertenece al banco de cultivos del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA).

El muestreo microbiológico se realizó utilizando un hisopo por vía rectal en tres momentos: el primer muestreo (momento cero): 24 horas después de la inoculación de la cepa de *Escherichia coli* K88, el segundo muestreo se realizó siete días después del primer muestreo y, el tercero, 14 días después del primero.

El aislamiento se realizó, por triplicado, en el medio de cultivo agar base de sangre (BioCEN, Cuba) con adición de 5 % de eritrocitos de ovino estéril, utilizando el método de agotamiento por estrías para el aislamiento. La identificación de los microorganismos se realizó mediante el enfrentamiento con antisueros específicos y, posteriormente, se realizó recuento microbiológico para determinar la carga bacteriana.

Para el análisis de los resultados se utilizó un análisis de varianza, con el uso del paquete estadístico SAS 9.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio de la carga bacteriana de la cepa *E. coli* K88, determinada por medio del hisopaje rectal en el primer y el segundo muestreos, no evidenciaron diferencias significativas entre los grupos en estudio, aspecto que confirma que en el momento de la inoculación existía una carga bacteriana similar entre los diferentes grupos, sin mostrar efecto de probióticos sobre la carga bacteriana a los siete días después de la inoculación. Sin embargo, en el tercer muestreo (14 días posterior a la inoculación de la cepa de *E. coli* K88), el grupo tratado con el probiótico mostró una reducción significativa ($p \leq 0,05$) en la carga bacteriana de la cepa *E. coli* K88, con respecto al grupo placebo y al que se le aplicó agua estéril, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas entre estos últimos. Tampoco se evidenció en estos dos grupos diferencias entre los distintos muestreos realizados (Tabla 1).

Estos resultados indican que en el grupo tratado con el probiótico se disminuyó la carga microbiana de la cepa *E. coli* K88, aspecto importante a considerar, ya que la presencia de *E. coli* enterotoxigénica K88 se ha descrito como uno de los principales problemas que afectan la producción porcina, debido a la presentación de diarrea, el incremento de la mortalidad, así como a la disminución de la ganancia media diaria y el rendimiento en cerdos postdestete (15,16,17). Este resultado corrobora estudios anteriores que refieren que las cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus termophilus* son capaces de colonizar el tracto digestivo de los cerdos recién nacidos y reducir la presencia de otros microorganismos que pudieran ser potencialmente patógenos (14).

Resultados similares a los de este estudio se han referido por diversos autores. Se señala que en los cerdos de 24 días de edad, infectados experimentalmente con *E. coli* K88, la inclusión en la dieta de un probiótico que contenía una cepa de *Bacillus subtilis* redujo el

TABLA 1. Eficacia del probiótico sobre el recuento microbiológico (ufc) de la cepa *E. coli* K88 en heces fecales de cerdos. / *Efficacy of the probiotic on the microbiological count (cfu) of E. coli K88 strain in fecal feces of pigs.*

Muestreos	I		II		III	
Grupos	X	D.S.	X	D.S.	X	D.S.
1	187,44 ^a	170,30	115,82 ^a	108,75	0,01 ^b	1,24
2	216,96 ^a	183,34	113,69 ^a	90,29	173,43 ^a	138,75
3	214,79 ^a	143,74	180,34 ^a	160,78	176,31 ^a	175,83

Letras desiguales por filas difieren significativamente ($p \leq 0,05$).

Leyenda:

I: Primer muestreo, 24 horas después de la inoculación de la cepa de *Escherichia coli* K88 (seis días después del último tratamiento). II: Segundo muestreo (siete días después del primer muestreo). III: Tercer muestreo (14 días después del primer muestreo).

recuento de *E. coli* K88 en heces fecales a las 24 horas de la inoculación (18).

En un estudio realizado para investigar el efecto de un probiótico (a base de bacterias ácido lácticas) sobre la carga de *Salmonella* entérica serovar *Typhimurium* refieren que a partir de los 15 días posteriores a la inoculación se observó una reducción significativa de la carga bacteriana en heces fecales en el grupo de animales tratados con respecto al grupo control (19). Otros autores (20) encontraron que el empleo de probiótico a base de *Lactobacillus plantarum* evidenció una tendencia a reducir la presentación de diarrea en cerdos postdestete inoculados por vía oral con una cepa enterotoxigénica de *E. coli*, mostrando potencial para ser utilizado en el control de la colibacilosis postdestete.

En este sentido, el empleo de un probiótico (*Lactobacillus rhamnosus*) fue eficaz en la disminución de la diarrea en los lechones postdestete producidas por *E. coli* K88 (21). Estudios recientes refieren que al alimentar cerdos con dieta que contenía *Lactobacillus acidophilus* se redujo significativamente el conteo rectal de *E. coli* (22). Otros autores (23) observaron que el alimento con probiótico (*Enterococcus faecium* NCIMB 11181) en cerditos disminuyó el nivel de bacterias del género *Escherichia* y aumentó el número de bacterias del género *Lactobacillus*. Asimismo

se refiere que la aplicación de *Saccharomyces cerevisiae* tiene un efecto protector del epitelio intestinal a la acción de cepas de *E. coli* (24).

La eficacia del probiótico evaluado pudiera influir de manera positiva sobre los indicadores de salud y bioproductivo en los cerdos de la categoría cría. En este sentido, se ha referido que la aplicación de probióticos en cerdos de la categoría zootécnica de crías reduce el porcentaje de animales con diarreas con respecto al grupo control (22,25). Rodríguez *et al.* (26), en un estudio donde evaluaron el efecto de un probiótico similar al utilizado en el presente estudio sobre los indicadores productivos y de salud, encontraron diferencias significativas a favor del grupo tratado con una mejor ganancia media diaria y conversión alimentaria, así como una menor incidencia de animales con diarreas y disminución de la mortalidad con respecto al grupo control.

El resultado pudiera estar explicado porque las bacterias ácido lácticas, que incluyen especies de *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. y otros microorganismos, pueden regular el medio ambiente intestinal e inhibir o eliminar patógenos debido a su capacidad de colonizar el tracto gastrointestinal, ya que compiten con los patógenos para los sitios de unión en la superficie celular del epitelio intestinal,

regulan la inmunidad de la mucosa intestinal, mantienen la función de la barrera intestinal y producen sustancias con actividad antimicrobiana, beneficiando así la salud de los cerdos. Los mecanismos relacionados con estos efectos incluyen la producción de sustancias como ácido láctico, peróxido de hidrógeno, que producen disminución del pH e inhibición del crecimiento de cepas patógenas. La estimulación del sistema inmune puede estar producida por una mayor diferenciación de linfocitos T y estímulo de la expresión de citoquinas (15,27).

La adición de probióticos fue eficaz en la disminución de la diarrea en los lechones posdestete inducidas por *E. coli* K88, posiblemente a través de la modulación de la microbiota intestinal, la mejora en la defensa a nivel intestinal y la regulación de la producción de citoquinas inflamatorias sistémicas (21).

Por otra parte, se ha señalado que la aplicación de cepas probióticas puede variar individualmente entre los animales; los mejores resultados se obtienen cuando se realiza la combinación de varias cepas probióticas (28). La importancia de los resultados está dada por el aumento en el interés por el uso de los probióticos como profilácticos y terapéuticos en la producción porcina (29), donde relativamente pocas cepas han demostrado su eficacia en los estudios *in vivo* (28).

El probiótico en su conjunto es capaz de lograr niveles significativos de reducción de la carga bacteriana, específicamente de la cepa *E. coli* K88. Los mejores resultados se obtienen a los 14 días de aplicado el tratamiento. Estos resultados permiten considerar que la aplicación del probiótico pudiera tener una implicación directa en la mejora de los indicadores de salud y bioproductivos en cerdos de la categoría cría.

REFERENCIAS

1. Thacker PA. Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: a review. *J Anim Sci Biotech.* 2013;4:35. doi:10.1186/2049-1891-4-35.
2. Crittenden R. Incorporating probiotics into foods. In Lee YK, Saminen S. *Handbook of probiotics and prebiotics.* 2009; 2.ed. Nova York: Wile-Interscience; p. 596.
3. Suo C, Yin Y, Wang X, Lou X, Song D, *et al.* Effects of *Lactobacillus plantarum* ZJ316 on pig growth and pork quality. *BMC Vet Res.* 2012;8:89. doi:10.1186/1746-6148-8-89.
4. Ohshima T, Kojima Y, seneviratne CJ, Maeda N. Therapeutic Application of symbiotic a Fusion of Probiotics and Prebiotics, and Biogenics as a New Concept for Oral Candida Infections: A Mini Review. *Front Microbiol.* 2016;(25)7:10.
5. Fernández R, Crespo N. New advances in the application of probiotic. *International pigtopic.* Mount Morris, Illinois. 2003;18(7):11-13.
6. De Almeida P, Teshima E, Ferreira C. Aspectos terapéuticos de probióticos, prebióticos e simbióticos. 2012; En: *Prebióticos e Probióticos. Actualizacao e prospeccao.* Capítulo 2, p.29. Editora Rubio. Brasil.
7. Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastal R, Rowland I, Wolvers D B. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition.* 2010. 104 (Suppl.2):S1-S63.
8. Gupta V, Garg R. Probiotics. *Indian J Med Microbiol.* 2009;27(3):202-209.
9. Hemaiswarya S, Raja R, Ravikumar R, Carvalho IS. Mechanism of action of probiotics. *Braz Arch Biol Technol.* 2013;56(1):113-119.
10. Charteris, WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol.* 1998; 84:759-768.

11. Flaviano dos Santos M, Simone VG, Persichini RAC, Marcal SA, Neuman E, Moreira LJV, *et al.* Modelos Animais Gnotobióticos e convencionais para a seleção e avaliação de probióticos. 2012; Libro: Prebióticos e Probióticos. Atualização e prospecção. Capítulo 9, p. 145. Editora Rubio. Brasil.
12. Sekhon BS, Jairath S. Prebiotics, probiotics and symbiotics: An overview. *J Pharmaceut Edu Res.* 2010;1(2):13-36.
13. Yang F, Hou C, Zeng X, Qiao S. The use of lactic Acid bacteria as a probiotic in Swine diets. *Pathogens.* 2015;27;4(1):34-45.
14. Pérez Ruano M, Armenteros M, Vega E. Evaluación de la colonización del tracto digestivo de cerdos por cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus*, componentes de un producto probiótico. *Rev Salud Anim.* 2014;36(3):141-146.
15. Krause DO, Bhandari SK, House JD, Nyachoti CM. Response of nursery pigs to a synbiotic preparation of starch and an anti-*Escherichia coli* K88 probiotic. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(24):8192-8200.
16. Hancox LR, Le Bon M, Richards PJ, Guillou D, Dodd, CER, Mellits, KH. Effect of a single dose of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* on the occurrence of porcine neonatal diarrhoea. *Animal.* 2015;9(11):1756-1759.
17. Hermann-Bank ML, Skovgaard K, Stockmarr A, Strube ML, Larsen N, *et al.* Characterization of the bacterial gut microbiota of piglets suffering from new neonatal porcine diarrhoea. *BMC Vet Res.* 2015;11:139. doi: 10.1186/s12917-015-0419-4
18. Bhandari SK, Xu B, Nyachoti CM, Giesting DW, Krause DO. Evaluation of alternatives to antibiotics using an *Escherichia coli* K88 model of piglet diarrhea: effects on gut microbial ecology. *J Anim Sci.* 2008;86(4):836-847.
19. Casey PG, Gardiner GE, Casey G, Bradshaw B, Lawlor PG, Lynch PB, Leonard FC, Stanton C, Ross RP, Fitzgerald GF, Hill C. A five-strain probiotic combination reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in pigs challenged with *Salmonella enteric* Serovar *Typhimurium*. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(6):1858-1863.
20. Guerra-Ordaz AA, González-Ortiz G, La Ragione RM, Woodward MJ, Collins JW, Pérez JF, Martín-Orúe SM. Lactose and *Lactobacillus plantarum*, a potential complementary synbiotic to control post weaning colibacillosis in piglets. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(16):4879-4886.
21. Zhang L, Xu YQ, Liu HY, Lai T, Ma JL, Wang JF, Zhu YH. Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG using an *Escherichia coli* K88 model of piglet diarrhoea: Effects on diarrhoea incidence, faecal microflora and immune responses. *Vet Microbiol.* 2010;141(1-2):142-148.
22. Qiao J, Wang Z, Li H, Wang W. Effects of *Lactobacillus acidophilus* dietary supplementation on the performance, intestinal barrier function, rectal microflora and serum immune function in weaned piglets challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2015;107(4):883-891.
23. PajarilloE, Alain B., Jong P, Marilen P, Hyeun B.K, Chan-Soo P, DaeKyung K.. Effects of probiotic *Enterococcus faecium* NCIMB 11181 administration on swine fecal microbiota diversity and composition using barcoded pyrosequencing. *Anim Feed Sci Tech.* 2015;201:80-88.
24. Badia R, Zanello G, Chevaleyre C, Lizardo R, Meurens, F, *et al.* Effect of *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii* and b-galactomannan oligosaccharide on porcine intestinal epithelial and dendritic cells challenged in vitro with *Escherichia*

- coli* F4 (K88). Vet Res. 2012;43:4. doi:10.1186/1297-9716-43-4.
25. Taras D, Vahjen W, Macha M, Simon O. Performance, diarrhea incidence, and occurrence of *Escherichia coli* virulence genes during long-term administration of a probiotic *Enterococcus faecium* strain to sows and piglets. J Anim Sci. 2006;84(3):608-617.
26. Rodríguez JC, Carmenate MC, Hernández JE, Guerra A, Calero I, Álvarez JM, Martín E, Suárez M. Evaluación del suministro de un preparado biológico de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus termophilus* en cerdos en crecimiento. Rev Computadorizada de Producción Porcina. 2009;16(1):54-58.
27. Hou C, Zeng X, Yang F, Liu H, Qiao S. Study and use of the probiotic *Lactobacillus reuteri* in pigs: a review. J Anim Sci Biotechnol. 2015; 6(1):14.
28. Gardiner GE, Casey PG, Casey G, Lynch PB, Lawlor PG, Hill C, Fitzgerald GF, Stanton C, Ross P. Relative Ability of Orally Administered *Lactobacillus murinus* to Predominate and Persist in the Porcine Gastrointestinal Tract. Appl Environ Microbiol. 2004;70(4):1895-1906.
29. Robles-Huaynate RA, Thomaz MC, Santana AE, Hermans-Masson GCI, Borges AA, et al. Probiótico em dietas de suínos sobre os parâmetros sanguíneos e digestibilidade de rações. Semina: Ciências Agrárias, Londrina. 2014; 35(3):1627-1636.