

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

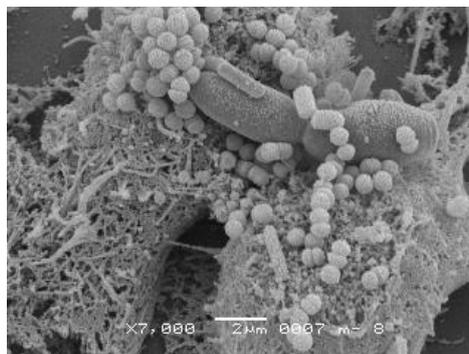


**DESARROLLO DE UN ALIMENTO FUNCIONAL  
DESHIDRATADO CONSTITUIDO POR  
MICROORGANISMOS AISLADOS DE KEFIR**

TESIS DOCTORAL

PATRICIA ARACELI BOLLA

~ AÑO 2011 ~



EL PRESENTE TRABAJO,  
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR DE LA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS (UNLP), FUE REALIZADO  
EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO  
EN CRIOTECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Y EN LA CÁTEDRA DE  
MIDROBIOLOGÍA, BAJO LA  
DIRECCIÓN DE LA DRA. GRACIELA L. DE ANTONI Y  
LA CODIRECCIÓN DEL DR. PATRICIO J. de URRAZA

# *Agradecimientos*

---

- ❖ Deseo agradecer profundamente a todas aquellas personas que colaboraron conmigo, ya sea en la faz académica o humana, en el transcurso de este trabajo de Tesis.
- ❖ A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por la formación profesional que me otorgó.
- ❖ Al Consejo Nacional de Investigaciones que mediante el otorgamiento de las becas posibilitaron el desarrollo de este trabajo de Tesis.
- ❖ A la Dra. Graciela L. De Antoni por su estímulo, experiencia y apoyo necesarios para la realización de este trabajo.
- ❖ Al Dr Patricio de Urza por su ayuda y apoyo para la realización de esta tesis.
- ❖ A la Dra. María de los Ángeles Serradell por su calidad humana, por su ayuda permanente durante la realización de este trabajo de tesis, por su incansable inyección anímica, pero sobre todo por su amistad y contención en los momentos difíciles. No existen la palabras adecuadas para expresar tamaña gratitud y cariño.
- ❖ Al Dr. Pablo Pérez, la Dra Analía Abraham y la Dra. Graciela Garrote por ayudarme cada vez que recurri a ellos, por buena predisposición y por estar conmigo cuando más los necesite.
- ❖ A Ivanna, Ceci, Paula y Jessica por tener siempre ese buen humor, por formar un núcleo de buenos momentos y amistad. Por estar en los momentos más difíciles sosteniéndome para seguir adelante y por ayudar en todo este trabajo de tesis.
- ❖ A mis amigos de toda la vida Virginia y Pablo por su amistad invaluable y por estar siempre.

- ❖ A los chicos de la cátedra de micro por su buen humor y el estímulo constante, especialmente a Esteban y Eli.
- ❖ A Martín H, Fernando T., Marina G. y Pablo M. por escucharme y ayudarme mucho tanto en la escritura como el desarrollo de la tesis.
- ❖ A Marcelo Fernández por su colaboración en el desarrollo de este trabajo de tesis y su amistad.
- ❖ A los chicos de todo grupo de microbiología (Andrea, Silvita, Mica, Judith, Aye, Ale, Lucia, Caro, Luciana, Fernanda, Angela, Emiliano y Roberto) por su ayuda en el trabajo diario, enorme colaboración y muy buen humor.
- ❖ A mis amigos de la vida Gaby Meroni, Flor Jose, July Spagnolo, Nico Quatela, Belen Jalo, Kuko, Gabriel Robles Luna, Virginia Vetere., Andrea Merlo y Nacho. Por todo el apoyo, el cariño y por brindarme su amistad de tantos años y con tanto momentos vividos juntos.
- ❖ A Mica S., Moni C., Ana G., Tati y Sabri por estar siempre junto a mí y mi familia en todo momento, siendo un motor indispensable sobre todo en este último año.
- ❖ A mis abuelos por ese cariño invaluable, los extraño.
- ❖ A mi tío Negro, Roberto, Julio y Ali por estar siempre, apoyarme en cada paso y darme estímulo para seguir adelante.
- ❖ A mis padres: Ida y Hugo y mis hermanos: Nano y Bule por acompañarme y apoyarme en cada momento de este trabajo de tesis. Por brindarme amor y felicidad siempre.
- ❖ A mis cuñados y amigos: Lu, Nico, A mis sobrinos: Elias y Maite. Por el apoyo incondicional, por haber confiado en mí siempre y hacerme muy feliz cada día.
- ❖ A Román por su compañerismo, amistad y por acompañarme siempre en los pasos de esta tesis.
- ❖ A Cutu por darme alegría y amor día a día.

# *Dedicatoria*

---

*A mi esposo, Cutu por su ternura, comprensión y contención durante todos estos años juntos.*

*A mis padres Ida, Hugo, por enseñarme que el arma fundamental para ser buena persona es la honestidad y el amor. Por hacerme una persona fuerte para seguir siempre hacia adelante, y sensible.*

*A mis hermanos Nano y Bule mis compañeros incansables en toda mi vida.*

*Especialmente a mi*

*papá Hugo Bolla quien desde hace muy poquito no está mi lado pero desde el cielo es el ángel que me acompaña en el camino....*

“Somos la memoria que tenemos y la responsabilidad que asumimos, sin memoria no existimos y sin responsabilidad quizá no debamos existir ”

*Jose de Sousa Saramago 1922-2010.*

# Indice

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

<b>1. Microbiota intestinal</b> .....	1
<b>2. Probióticos</b> .....	3
2.1 Evolución histórica y concepto de probiótico.....	3
2.2 Microorganismos probióticos.....	6
2.3 Kefir.....	9
<b>3. Acciones sobre la funcionalidad del tracto gastrointestinal</b> ....	15
<b>4. Patologías del tracto gastrointestinal</b> .....	20
4.1. Gastroenteritis infecciosas y factores microbianos.....	20
<b>5. Alimentos funcionales</b> .....	24
<b>6. Enteropatógenos</b> .....	25
6.1. <i>Shigella</i> .....	25
6.1.1. Efectos de los probióticos sobre <i>Shigella</i> .....	28
6.2. <i>Clostridium</i> .....	31
6.2.1. <i>Clostridium Difficile</i> .....	31
6.2.2. Tratamiento de la enfermedad causada por <i>Clostridium</i> .....	34
<b>7. Conservación de microorganismos</b> .....	40
7.1. Métodos de conservación.....	40
7.2. Liofilización.....	41
7.2.1. Congelación.....	42
7.2.2. Secado secundario.....	43

## **CAPÍTULO I: Formulación de una mezcla microbiana**

<b>Introducción</b> .....	46
<b>Objetivos</b> .....	48

<b>Materiales y Métodos</b> .....	49
1. Cepas y medios de cultivo.....	49
2. Estudio del antagonismo entre cepas.....	51
3. Estudio del sinergismo entre cepas.....	51
4. Obtención de la mezcla microbiana.....	52
5. Evaluación de la capacidad acidificante de la mezcla microbiana.....	52
6. Determinación del contenido de ácidos orgánicos.....	52
7. Determinación del contenido de etanol.....	53
8. Ensayo de inhibición de <i>Shigella</i> .....	54
<b>Resultados y Discusión</b> .....	55
Estudio del antagonismo entre cepas.....	55
Estudio de sinergismo entre cepas. Evaluación del crecimiento en conjunto por recuento de microorganismos viables.....	55
Evaluación de la capacidad acidificante de la mezcla microbiana.....	58
Determinación del contenido de ácidos orgánicos.....	61
Determinación del contenido de etanol.....	65
Ensayo de inhibición de <i>Shigella</i> .....	67
<b>Conclusiones</b> .....	69

***CAPÍTULO II: Efectos de la mezcla microbiana contra la invasión de *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri****

<b>Introducción</b> .....	70
<b>Objetivos</b> .....	72
<b>Materiales y Métodos</b> .....	73
1. Cepas Utilizadas.....	73
2. Mezcla microbiana.....	73
3. Microorganismos Patógenos.....	73
4. Línea celular eucariota y condición de cultivo .....	74

5. Estudio de la invasión de células Hep-2 por <i>Shigella sonnei</i> 45 y <i>Shigella flexneri</i> 72 .....	74
6. Efecto de bacterias y levaduras aisladas de kefir frente a la invasión de <i>Shigella sonnei</i> 45 y <i>Shigella flexneri</i> 72.....	75
6.1 Co-incubación.....	75
6.2 Pre-incubación.....	76
7. Efecto de la mezcla microbiana frente a la invasión de <i>S. sonnei</i> 45 y <i>S. flexneri</i> 72.....	77
8. Marcación fluorescente del citoesqueleto.....	77
9. Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	78
<b>Resultados y Discusión.....</b>	<b>80</b>
Estudio de la invasión de células Hep-2 por <i>S. flexneri</i> 72 y <i>S. sonnei</i> 45...80	
Efecto de bacterias y levaduras aisladas de kefir frente a la invasión de <i>S. sonnei</i> 45 y <i>S. flexneri</i> 72.....	81
Efecto de la mezcla microbiana frente a la invasión de células Hep-2 por <i>S. sonnei</i> 45 y <i>S. flexneri</i> 72.....	86
Marcación fluorescente del citoesqueleto.....	91
Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	94
<b>Conclusiones.....</b>	<b>97</b>

***CAPÍTULO III: Efecto de la mezcla microbiana sobre la actividad citotóxica de *C. difficile****

<b>Introducción.....</b>	<b>98</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>101</b>
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>102</b>
1. Cepas puras y mezcla microbiana.....	102
2. Obtención de sobrenadante de la mezcla microbiana y sus cepas puras.....	102
3. Microorganismos patógenos.....	103

4. Línea celular eucariota y condición de cultivo.....	103
5. Estudio de la actividad citotóxica del sobrenadante de <i>C. difficile</i> .....	104
6. Estudio de la mezcla microbiana y sus cepas puras frente a la actividad citotóxica de <i>C. difficile</i> .....	104
7. Estudio de las características de los metabolitos del sobrenadante de <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> .....	105
8. Marcación fluorescente de citoesqueleto.....	105
<b>Resultados y Discusión</b> .....	106
Estudio de la actividad citotóxica de <i>C. difficile</i> .....	106
Efecto de la mezcla microbiana y sus cepas aisladas frente a la actividad citotóxica de <i>C. difficile</i> .....	108
Efectos de las diferentes fracciones de sobrenadante de <i>Lc. Lactis</i> sobre la actividad citotóxica de <i>C. Difficile</i> .....	112
Marcación fluorescente de citoesqueleto.....	114
<b>Conclusiones</b> .....	117

***CAPÍTULO IV: Efecto de la mezcla microbiana frente a la infección con *C. difficile* (in vivo)***

<b>Introducción</b> .....	118
<b>Objetivos</b> .....	123
<b>Materiales y Métodos</b> .....	124
1. Suspensiones de <i>C. difficile</i> .....	124
2. Suspensión de la mezcla microbiana.....	124
3. Animales Empleados.....	125
4. Inducción de enterocolitis por <i>C. difficile</i> .....	125
5. Efecto protector de la mezcla microbiana sobre la infección por <i>C. difficile</i> .....	126
6. Marcadores de la infección.....	127
7. Determinación de la actividad biológica.....	128

8. Estudios histológicos.....	128
9. Estudio de mieloperoxidasa.....	129
10. Análisis Estadístico.....	130

**Resultados y Discusión.....131**

1. Inducción de enterocolitis por <i>C. difficile</i> .....	131
2. Estudio de diferentes concentraciones de la mezcla microbiana frente a <i>C. difficile</i> .....	132
3. Efecto protector de la mezcla microbiana sobre la infección por <i>C. difficile</i> .....	133
4. Determinación de la actividad biológica.....	139
5. Estudio de mieloperoxidasa.....	140
6. Estudios Histológicos.....	141

**Conclusiones.....144**

**CAPÍTULO V: Conservación a largo plazo de la mezcla microbiana**

**Introducción.....145**

**Objetivos.....147**

**Materiales y Métodos.....148**

1. Microorganismos y condiciones de cultivo.....	148
2. Preparación de productos para la conservación.....	148
3. Liofilización y condiciones de almacenamiento.....	148
4. Refrigeración, congelación y almacenamiento.....	149
5. Enumeración de microorganismos.....	149
6. Ensayo de inhibición de <i>Shigella</i> por la mezcla microbiana.....	149
7. Ensayo de translocación.....	150
8. Análisis estadístico.....	151

**Resultados y Discusión.....152**

1. Estudio de la conservación de las cepas puras a baja temperatura...	152
2. Efecto de crioprotectores sobre la resistencia a la liofilización.....	155
3. Efecto del almacenamiento sobre la mezcla microbiana y sus microorganismos puros liofilizados.....	157
4. <i>Shigella</i> ensayo de inhibición.....	159
5. Estudio de translocación de microorganismos.....	160

<b>Conclusiones.....</b>	<b>164</b>
--------------------------	------------

### **CONCLUSIONES GENERALES**

<b>Conclusiones generales.....</b>	<b>165</b>
------------------------------------	------------

### **APÉNDICE I: Buffers y medios de cultivo**

1. Buffers y medios de cultivos.....	169
2. Coloraciones.....	173

### **APÉNDICE II: cultivo de células**

1. Cultivo de células y preparación de placas.....	174
--	-----

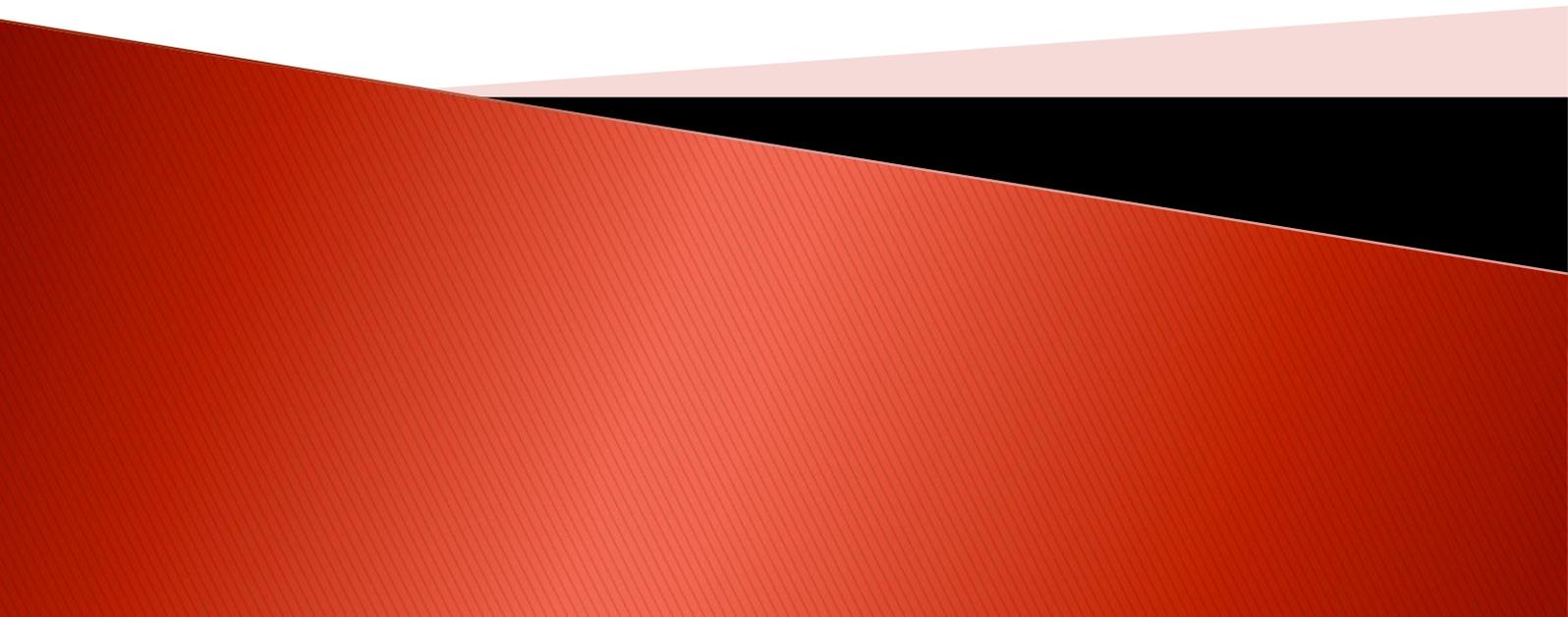
### **APÉNDICE III: Determinación de proteínas**

1. Método de Bradford.....	176
----------------------------	-----

### **BIBLIOGRAFÍA**

<b>Bibliografía.....</b>	<b>177</b>
--------------------------	------------

# INTRODUCCIÓN



# Introducción General

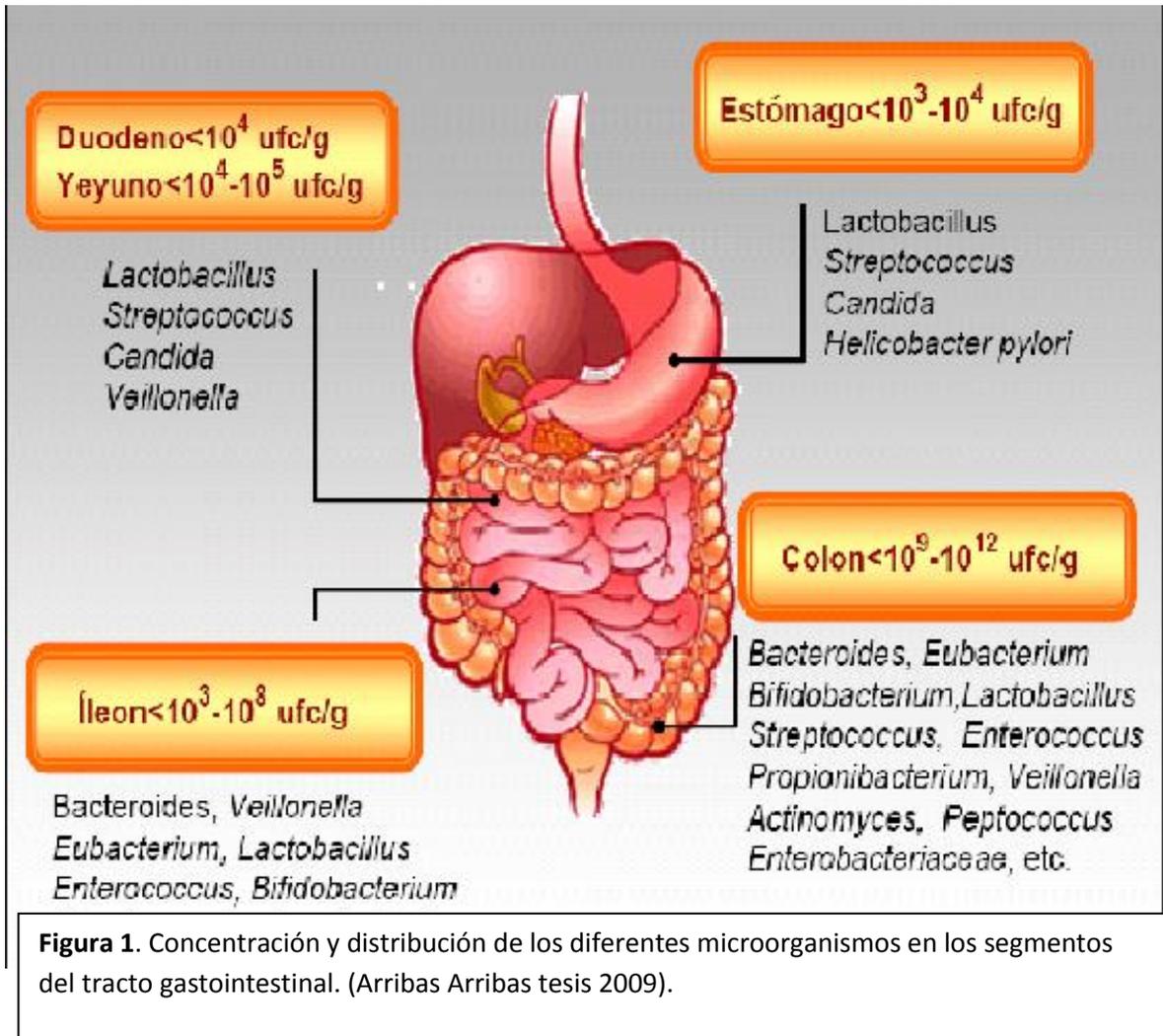
## 1-Microbiota intestinal

El tracto gastrointestinal humano constituye un complejo ecosistema siendo el hábitat natural de un gran número de bacterias. Este ecosistema incluye numerosos microorganismos necesarios para el mantenimiento de la homeostasis intestinal que son capaces de promover efectos beneficiosos para la salud, pero también contiene otros considerados como potenciales patógenos por su capacidad de invadir al hospedador.

Antes del nacimiento, el tracto gastrointestinal es estéril, siendo distintos los acontecimientos que pueden determinar la colonización inicial. Ésta tiene lugar durante el parto, en el cual se produce la primera exposición microbiana del recién nacido a la flora fecal y vaginal de la madre, habiéndose observado diferencias entre niños nacidos por cesárea o por vía vaginal (Harmsen et al, 2000). En los meses siguientes se establece una flora comensal estable (Fanaro et al, 2003). A los dos años de edad la composición y el metabolismo de la microbiota intestinal de un niño se asemejan a la de un adulto (Guérin-Dana et al, 1997). Inicialmente, diversos géneros de bacterias aerobias colonizan el tubo digestivo, sobre todo enterobacterias como *Escherichia coli* junto con diversas especies del género *Lactobacillus*. Éstas consumen el oxígeno del ambiente y progresivamente se establece un microsistema en el que hay un mayor predominio de especies anaerobias obligadas, como *Bacteroides*, *Eubacterias* y *Bifidobacterium*. Mientras que el tracto gastrointestinal superior contiene relativamente pocas bacterias, este número se incrementa progresivamente conforme se avanza

distalmente, siendo máximo en el colon (figura 1). Las bacterias se benefician de un constante flujo de nutrientes, de una temperatura estable y de un buen nicho donde desarrollarse. De igual manera, el hospedador se beneficia de las bacterias por su capacidad de sintetizar vitamina K, obtener energía de los nutrientes no absorbidos en forma de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), inhibir el crecimiento de microorganismos potencialmente patógenos y mantener la integridad y funcionalidad de la mucosa.

La microbiota intestinal protege contra infecciones ya sea por competencia de nutrientes, sitios de unión intestinal y producción de factores antimicrobianos como son el ácido láctico y las bacteriocinas. Algunos estudios revelan que la ausencia total de microbiota intestinal provoca alteraciones significativas en la estructura y función intestinal, como son reducción del número de vellosidades y atrofia criptica (Sharma et al, 2005; Szetkuti et al, 1990), y una reducción en el número y densidad de las placas de Peyer (Maeda et al, 2001). En su convivencia con las bacterias algunas células como las células epiteliales intestinales, desarrollan receptores de reconocimiento de componentes específicos de bacterias, hongos y virus. Estos receptores incluyen los TLR (*toll- like receptor*) y los NOD (dominios de oligomerización de unión de nucleótidos), que son imprescindibles para el inicio de la respuesta por la inmunidad innata y cuya activación genera diferentes cascadas de señalización intracelular que acaban en la producción de citocinas proinflamatorias (Sansone et al 2004) En ausencia de señalización bacteriana en el lumen intestinal, la mucosa asociada a tejido linfoide es rudimentaria y con un gran defecto inmunitario. Esto se puede explicar por falta de educación del sistema inmune de mucosa por falta de estimulación temprana.



## 2. Probióticos

### 2.1. Evolución histórica y concepto de probiótico

Históricamente los fermentos mixtos fueron utilizados para la conservación y elaboración de productos alimenticios. Desde que se estudió el uso de la leche, nuestros ancestros utilizaban las bacterias ácido lácticas (LAB) en los productos de lechería sin conocer la existencia de estos microorganismos. Los estudios de microbiología láctica comenzaron con la investigación del proceso de acidificación que ocurre naturalmente en la leche, suero de quesería o suero de

manteca (Hassan y Frank, 2001). Estos productos acidificados se han utilizado como inóculo para producir queso, mantequilla y cultivos lácticos, pero las fermentaciones resultantes eran imprevisibles y de calidad desigual.

El primer producto conocido en base a la fermentación de la leche fue el queso, el cual se obtiene por fermentación y posterior desuerando de la misma. La producción industrial de queso y manteca lleva más de 200 años, sin embargo la producción industrial de fermentos iniciadores comenzó recién en el siglo XIX, pero una complicación era su estabilidad y estandarización. En general se define el fermento iniciador como un compuesto conformado por algunas cepas específicas que son capaces de fermentar la leche y acidificarla. En general está constituido por microorganismos viables que adicionados a los alimentos o a un sustrato mejoran su calidad o aumentan su aceptabilidad.

La modulación de la microbiota intestinal para mejorar la salud se ha efectuado empíricamente desde tiempos ancestrales, existiendo noticias del empleo de leche fermentada para el tratamiento de infecciones gastrointestinales ya en el año 76 AC. No obstante, no fue hasta el siglo XX cuando se empezó a sugerir que la humanidad no sólo había hecho uso inadvertido de una multitud de microorganismos para la elaboración y/o conservación de numerosos alimentos, sino que además existían algunas bacterias que ejercían efectos beneficiosos para la salud de los hospedadores que las consumían. Pasteur, en 1857, fue el primero en demostrar que la fermentación láctica era de origen microbiano. Más tarde, en 1878, Lister aisló cultivos puros de bacterias ácido lácticas responsables de la acidificación de la leche (Brock, 1961). En 1906, Cohendy tras administrar leche fermentada por *Lactobacillus bulgaricus* (actualmente *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*) a pacientes

con alteraciones intestinales, observó una notable mejoría tras 8-12 días de tratamiento (Cohendy et al 1996). Paralelamente, Tissier no sólo había descubierto la existencia de bifidobacterias en el tracto intestinal de lactantes alimentados exclusivamente con leche materna, sino que había demostrado los beneficios clínicos derivados de la modulación de la microbiota intestinal de niños con infecciones intestinales (Tissier et al 1906). Dos años después, el premio Nóbel ruso Elie Metchnikoff publicó un libro, titulado *Prolongation of Life*, que tuvo una gran influencia en la comunidad científica. En él postulaba que el consumo de las bacterias que intervenían en la fermentación del yogur contribuía al mantenimiento de la salud mediante la supresión de las bacterias putrefactivas de la microbiota intestinal y que ésta era la causa de la longevidad de los campesinos búlgaros, grandes consumidores de yogur.

Durante varias décadas, estos productos potencialmente probióticos sólo se podían adquirir en farmacias y se empleaban para prevenir o aliviar trastornos tan diversos como diarrea, estreñimiento, colitis mucosa, colitis ulcerativa crónica, cistitis o dermatitis. Posiblemente el término "probiótico", que etimológicamente procede del griego "pro bios" (por la vida), fue empleado por primera vez por Vergio en 1954, cuando comparaba los efectos adversos que los antibióticos ejercían sobre la microbiota intestinal con las acciones beneficiosas ejercidas por otros factores que no pudo determinar. Una década más tarde, Lilly y Stillwell (1965) se referían a los probióticos como microorganismos que promovían el crecimiento de otros microorganismos (Lilly et al 1965). Fuller (1989) redefinió a los probióticos como "*aquellos suplementos alimenticios integrados por microorganismos vivos que afectan beneficiosamente al hospedador que los consume mediante la mejora de su equilibrio microbiano intestinal*" (Fuller 1989). Recientemente,

la OMS ha revisado su definición y los considera como "*organismos vivos que administrados en cantidades adecuadas ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del hospedador*". No obstante, esta definición está en continua evolución en un intento de adaptarse a los nuevos conocimientos que surgen de los trabajos de investigación con probióticos. En este sentido, varios científicos han demostrado que algunos microorganismos inactivados, e incluso sus componentes celulares, pueden ejercer un efecto beneficioso en la salud (Ouwehand et al 1998, Isolauri et al 2002), por lo que todos estos hallazgos deberán considerarse en futuras revisiones del concepto de probiótico.

## 2.2. Microorganismos probióticos

De acuerdo con lo comentado anteriormente, los probióticos son microorganismos que promueven la salud de quienes los ingieren, y para que puedan considerarse como tales es necesario que cumplan una serie de características, entre las que se incluyen:

- 1) Ser de origen humano, ya que en teoría, las cepas aisladas de seres humanos sanos van a presentar una mayor facilidad para permanecer en el intestino humano y probablemente no sean patógenas, habiéndose utilizado para definir esta característica el acrónimo inglés "GRAS" ("generally recognized as safe"). Aunque, también se han utilizado probióticos de origen no humano, como *Saccharomyces cerevisiae*, demostrándose su seguridad tras el consumo regular por el hombre.

- 2) Deben poseer tolerancia a las condiciones ambientales del tracto gastrointestinal, ya que si los microorganismos probióticos han de llegar viables al intestino, es preciso que resistan el pH gástrico, las enzimas digestivas y la acción detergente e inhibidora de las sales biliares.

3) Han de ser capaces de colonizar el intestino y adherirse a la mucosa intestinal para que tenga lugar la modulación de la respuesta inmune, así como la exclusión de microorganismos patógenos, si bien en esto último puede deberse también a su capacidad de producir compuestos antimicrobianos.

Entre los microorganismos utilizados como probióticos, las bacterias lácticas y las bifidobacterias ocupan el lugar más destacado, así como levaduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae* (Shortt 1998, Vaughan et al 2002). También se utilizan con este fin bacterias que pertenecen a otros géneros, como *Escherichia coli* y *Bacillus cereus*, generalmente como probióticos para animales.

Los microorganismos comúnmente empleados como probióticos se encuentran disponibles comercialmente a través de laboratorios o industrias alimenticias a nivel internacional así como en colecciones de cultivos. Algunos ejemplos de estos microorganismos son los siguientes: *Lactobacillus acidophilus* NCFM (Rhone-Poulenc, Estados Unidos), *Lactobacillus reuteri* 106 (BioGaia, Estados Unidos), *Bifidobacterium longum* bb536 (Morinaga Milk Ind. Japón), *Lactobacillus plantarum* 299 (ProViva, Finlandia), *Lactobacillus casei* YIT9018, *Shirota*, (Yakult, Japón) y *Lactobacillus johnsonii* LJ-1 (Nestlé, Suiza). *Lactobacillus casei* CRL 431 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (CERELA, Argentina), *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 (CERELA, Argentina) entre otros. Los probióticos lácticos están incluidos en diversos productos lácteos, actualmente en el mercado, como los denominados "bio-yogurts" (Nestle, st. Ivel, Danone, Onken, Vifit) leches fermentadas (Yakult: *L. casei* Shirota; Nestle's LC1Go: *L. johnsonii*; LG21 yogurt: *L. gasseri* OLL2716), quesos probióticos (Bioqueso Ilolay Vita), leche BIO (Sancor/Cerela/Conicet), entre otros.

También se los encuentra en preparados en forma de tabletas y polvos que incluyen un solo microorganismo o una mezcla de ellos, como multibiota. En la tabla 1 se describen diferentes productos probióticos comerciales y los microorganismos que los constituyen.

**Tabla 1:** Productos probióticos disponibles en el mercado.

Nombre comercial	Composición de probióticos	Nombre comercial	Composición de probióticos
Ultralevura®	<i>S. boulardii</i>	Rotargemine®	<i>L.acidophilus</i> , <i>B.bifidum</i> , <i>L.bulgaricus</i> , <i>S.thermophilus</i>
Casenfilus®	<i>L. acidophilus</i> <i>B. bifidum</i>	Enterum®	<i>Bacillus coagulans</i>
Infloran®	<i>L.acidophilus</i> <i>B.bifidum</i>	VSL #3 ®	<i>L.casei</i> <i>L.acidophilus</i> <i>L.plantarum</i> , <i>L.delbrueckii</i> , <i>L.bulgaricus</i> , <i>B.longu</i> , <i>B.brevis</i> , <i>B. infantis</i> , <i>S. thermophilus</i>
Bouchard®	<i>L.acidophilus</i>	Bioralsuero baby	<i>L. reuteri</i>
Lactofilus®	<i>L. acidophilus</i>	Bioralsuero®	<i>L. reuteri</i>
Snalvacolon®	<i>Bacillus subtilis</i>	Bioralsuerotravel	<i>L. reuteri</i>
Casenbiotic®	<i>L. reuteri</i>	Activia	<i>L. animalis</i>
Reuteri®	<i>L. reuteri</i>	Actimel	<i>L. casei</i>
Protransitus®	<i>L. plantarum</i>	LC1	<i>L. johnsonii</i>

Existen productos lácteos probióticos fermentados que se elaboran en forma artesanal como el kefir. Las leches fermentadas son productos lácteos, elaborados a partir de leche entera o descremada que requieren la acción de bacterias lácticas específicas para desarrollar su sabor, olor, color y textura característicos. Existe una gran variedad de leches fermentadas, entre las más reconocidas se destacan el Yogur, el Kumis, el Kuban y el kefir. El yogur es el más popular, tiene sabor ácido, aroma a acetaldehído y no posee tendencia al desuerado. El fermento iniciador utilizado para su formulación es un starter mixto constituido por *Streptococcus thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Marshall 1987). El Kuban es una leche fermentada consumida masivamente en Rusia y se obtiene por fermentación de la leche con *Lc lactis* var. *holandicus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgraricus* y tres tipos de levaduras (Marth 1974). El kefir y el kumis son leche fermentadas con leve contenido alcohólico, de sabor ácido y carácter espumoso que resulta de la producción de dióxido de carbono. Su microbiota es menos definida que la del yogur pero está constituido por bacterias y levaduras. El kumis se elabora con leche de yegua no pasteurizada y la fermentación es causada por *L delbrueckii* subsp *bulgaricus*, *L. leichmannii* y una levadura fermentadora de lactosa del género *Tórula* (Marth 1974).

### **2.3-Kefir**

El Kefir es una leche fermentada originaria de la región del caucaso a la cual se le acreditan varias propiedades beneficiosa para la salud (Liu et al 2002, 2006). La leche fermentada con los gránulos de kefir es consumida por el hombre desde hace miles de años sin registrarse efectos adversos. El kefir se obtiene por la actividad fermentativa de los gránulos de kefir. Estos gránulos están

constituidos por una masa gelatinosa e irregular, de consistencia elástica (Garrote 2000). La matriz del gránulo está constituida por polisacáridos y proteínas, en ella conviven un gran número de microorganismos en simbiosis. Del gránulo de kefir se han aislado e identificado una amplia variedad de especies microbianas que comprenden levaduras y bacterias (Lopitz-Otsoa, 2006).

Esta particular composición hace que el kefir se distinga de los yogures comerciales. El kéfir tiene consistencia uniforme, y cremosa, su sabor es ligeramente ácido y con cierta efervescencia debida al dióxido de carbono. Las levaduras le otorgan bajo nivel de etanol, una gran variedad de sustancias aromáticas incluyendo acetaldehído, acetoina y diacetilo que le dan al kefir una sabor muy característico (Farnworth Mainville, 2003).

Al kefir se le atribuyen propiedades beneficiosas para la salud. En la actualidad es considerado un ejemplo de leche fermentada con características probióticas obtenida a partir de una mezcla de bacterias y levaduras (Simova E., 2002). Esta particular simbiosis se observa como un ordenamiento de levaduras en estrecha relación con los cocos y entre ellas los bacilos en forma de varillas. Los cocos se observan preferentemente en la superficie de las levaduras. Estas bacterias y levaduras se encuentran en asociación simbiótica y son las responsables de la fermentación ácido láctica y ácido alcohólica de la leche obteniéndose la leche fermentada deseada.

La microbiota de kéfir consiste en levaduras fermentadoras o no fermentadores de lactosa, bacterias lácticas homofermentativas y heterofermentativas y bacterias ácido acéticas. Entre las especies bacterianas encontramos el *Lactobacillus brevis* (Otogalli y Galli, 1973), *Lb. casei* (Koroleva, 1988; Molska, 1983), *Lb. paracasei* (Pidoux, 1988), *Lb. kefir* (Koroleva, 1988; Garrote, 2001), *Lb. parakefir*, *Lb. kefiranofaciens* ( Marquina et al, 2002), *Lb.*

*kefirgranum*, *Lb. acidophilus* (Otogalli,1973), *Lb. caucasicum*, *Lb. curvatus* (Witthuhn et al, 2004); *Lb. hilgardii* (Pidoux, 1988), *Lb. helveticus* (Korovela, 1988;Simova et al, 2002), *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* (Korovela, 1988), *Lb. plantarum* ( Garrote, 2001; Maquina et al , 2002), *Lb. viridescens*, *Lb. gasseri*, *Lb. fermentum* ( Witthuhn et al, 2004); *Lactococcus lactis* (Otogalli y Galli, 1973; Korovela, 1988; Simova et al, 2002), *Lc cremoris* (Yüksedag et al, 2004); *Leuconostoc* ( Mainville et al, 2006; Witthuhn et al, 2004; Otogalli y Galli, 1973; Garrote, 2001). Dentro de las levaduras encontramos *Saccharomyces cerevisiae* (Rosi, 1978; Simova et al, 2002), *S. lactis* (Otogalli y Galli, 1973), *S. lipolytica* (Garrote, 1997), *S. kefir*, *S. unisporum* (Marquina et al, 2002), *S. florentinus*, *S. carlsbergensis* ( Botazzi et al, 1994), *S. delbrueckii* ( Rosi, 1978), *S. durans* (yüksedag et al , 2004), *Candida kefir* (Koroleva, 1988), *C. lypolitica* (Witthuhn et al, 2004), *C. valida*, *C. tenuis* (Otogalli y Galli, 1973) *C. pseudotropicalis* (Otogalli y Galli, 1973), *C. holmii*, *Kluyveromyces marxianus* ( Koroleva, 1988; Simova et al, 2002), *K. lactis* (Zourari y Anifantakis, 1988), *Torulaspota delbrueckii* (Korleva, 1988; Angullo et al, 1992), *Torula kefir* (Rosi,1978), *Torulopsis holmii* (Iwasawa et al, 1992), entre otras.

La microbiota que encontremos en kefir depende del origen de los gránulos (Luo y Lin, 1999), condiciones locales de cultivo y del almacenamiento y elaboración del mismo. Se ha demostrado que muchas de las bacterias y levaduras aisladas de kefir presentan propiedades probióticas como así también su resistencia a sales biliares, el pH y la adhesión a células Caco-2 (Garrote et al., 2004; Golowczyc et al., 2007, 2008). Entre los microorganismos estudiados las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* CIDCA 8112 y *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 fueron capaces de regular la respuesta pro-inflamatoria inducida en las células epiteliales

intestinales *in vitro* e *in vivo* (Romanin et al. 2010). *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 mostró un alto poder inhibitorio contra *Salmonella spp* y *Shigella spp. in vitro* (Golowczyc et al., 2008), previno el desprendimiento de las células eucariotas y redujo al mínimo los rearrreglos de actina-F y las alteraciones morfológicas mediadas por *Escherichia coli enterohemorrágica* O157: H7 en células Hep-2 (Hugo et al., 2008). *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 a través de su capa S inhibe la invasión de *Salmonella entérica* de las células Caco-2 (Golowczyc et al., 2007)

Desde el punto de vista de su composición química y microbiológica, el kefir es una leche fermentada muy compleja. Estas características determinan que sea difícil obtener una calidad constante en los productos fermentados. Los microorganismos del gránulo pueden experimentar fluctuaciones en su concentración debidas a las condiciones de incubación. Por otra parte, las levaduras se mantienen metabólicamente activas durante la refrigeración produciendo cambios del producto durante la conservación y limitando así la vida útil del producto. Estos inconvenientes hacen difícil la industrialización y comercialización de la leche fermentada. Aunque kefir comercial está disponible en las góndolas de los supermercados, sobre todo en Europa, no comparte todas las propiedades del kefir tradicional.

Se han realizado diferentes estudios respecto a la industrialización del kefir. Algunos estudios han demostrado que (Maeda et al, 2004) los gránulos de kefir no se pueden utilizar como cultivos iniciadores en la industria. La microbiota de un gránulo de kefir está en equilibrio simbiótico en cuanto a las especies y la estructura cuantitativa de los grupos microbianos que lo constituyen. Ocurren varios cambios significativos a lo largo del proceso de producción debido a la complejidad en la relación microbiana de la

comunidad en el kefir y la influencia mutua en el metabolismo de los microorganismos puede llevar a diferentes perfiles de producción de compuestos importantes en los caracteres organolépticos de la leche fermentada. Esta es la razón por la cual el empleo de los gránulos de Kefir como cultivos iniciadores dificulte su elaboración en la industria.

La ingesta de un elevado número de microorganismos viables obliga a investigar su seguridad. Desde un punto de vista teórico, al tratarse de microorganismos que normalmente forman parte de nuestra flora comensal, difícilmente podrían causar problemas infecciosos. En el caso del kefir en principio se podría pensar que los microorganismos que los constituyen son inocuos para el hombre ya que es un alimento milenario consumido diariamente en países del este europeo.

En general los estudios clínicos indican que el consumo de probióticos comerciales brinda un grado de seguridad adecuado. El uso de probióticos en personas enfermas está restringido a las cepas e indicaciones con eficacia probada. Aunque se ha descrito algún caso aislado de translocación en pacientes inmunocomprometidos y de bacteriemia por lactobacilos en colitis ulcerosa, el perfil de seguridad de los probióticos más utilizados en el contexto de estudios controlados debe considerarse bueno.

La producción comercial de cultivos lácticos iniciadores y su uso crecieron rápidamente en la industria láctea debido a sus numerosas ventajas. Actualmente, muchos productos lácteos se elaboran con cultivos iniciadores comerciales, que han sido aislados y seleccionados en función de la variedad, de las propiedades deseadas (aromas, producción de bacteriocinas, tolerancia a las sales biliares, etc) y de la velocidad de producción de ácido láctico. También se han introducido las levaduras en dichos fermentos obteniendo así cambios

favorables en las condiciones organolépticas (Mugula et al, 2003; Chen et al 2009).

Para garantizar su potencial efecto benéfico en el huésped, los microorganismos probióticos deben cumplir ciertas características. En este aspecto, son importantes el pH derivado del proceso de fermentación, el oxígeno disuelto, el antagonismo entre especies, la composición química del medio de cultivo, la concentración de azúcares, las prácticas de inoculación del cultivo probiótico, la temperatura y duración de la fermentación, y las condiciones de almacenamiento del producto. Se ha sugerido que la proliferación de las levaduras en los alimentos se ve favorecida por el ambiente ácido creado por las BAL (Bacterias ácido lácticas), mientras que el crecimiento de las bacterias es estimulado por la presencia de levaduras, que pueden proporcionar factores de crecimiento, tales como, las vitaminas y los compuestos solubles de nitrógeno (Nout, 1991). La asociación de BAL y levaduras durante la fermentación aportan metabolitos que podrían contribuir al sabor a los alimentos (Akinrele, 1970; Halm et al, 1993.; Brauman et al, 1996; Hansen y Hansen, 1996). La producción de ácidos y otros componentes antimicrobianos durante la fermentación puede promover o mejorar la seguridad microbiológica (Nout et al, 1989; Svanberg et al, 1992; Kingamkono et al, 1994, 1995) y la estabilidad de los productos (Mensah et al., 1991).

Muchos autores han estudiado diferentes mezclas de microorganismos como starter iniciadores de la fermentación, en general a base de bacterias lácticas. (Liu et al, 2009; Mogula et al, 2003).

Las bacterias lácticas son microorganismos gram-positivos, no esporulados, no pigmentados y catalasa negativa. Pueden ser cocos o bacilos, son aerotolerantes y producen gran cantidad de ácido láctico.

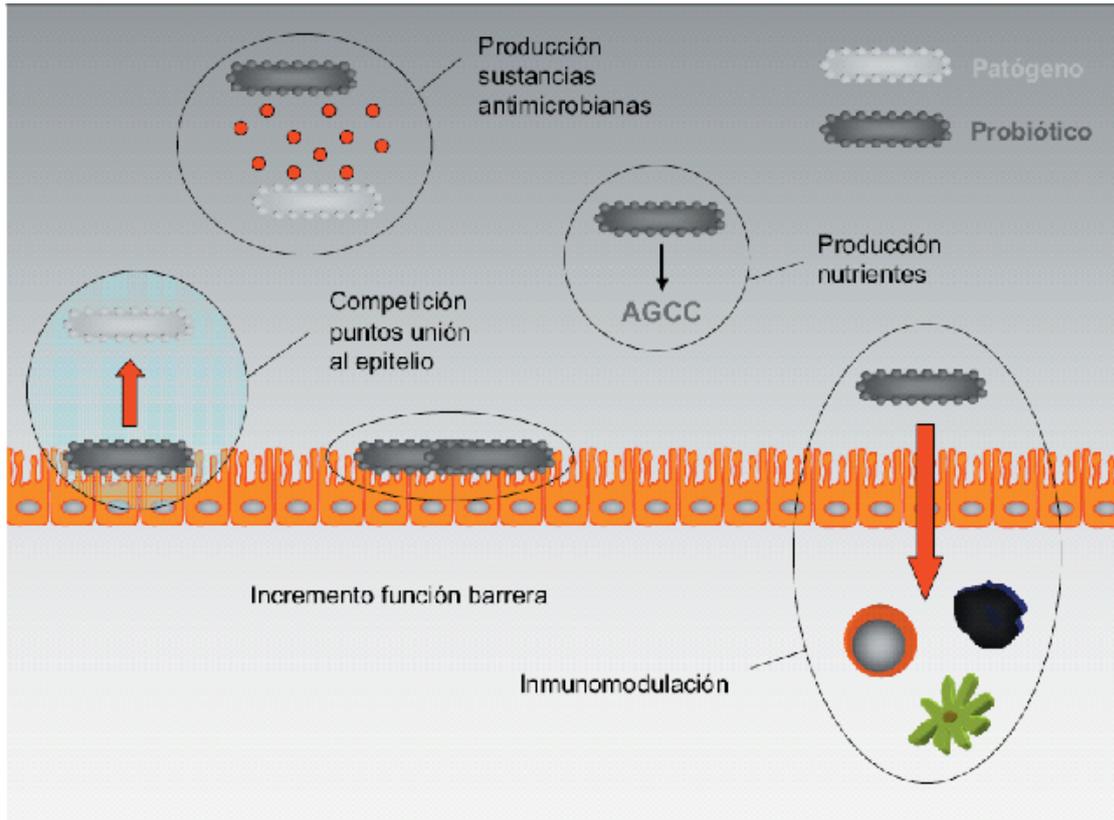
Pueden fermentar hidratos de carbono, y según ello se clasifican en homo o heterofermentativas.

Los ácidos orgánicos, fundamentalmente el ácido láctico y el ácido acético, han sido históricamente los metabolitos producidos por BAL más empleados como conservantes por ser saludables para el medio ambiente, naturales y generalmente reconocidos como seguros. Se ha propuesto que las moléculas de estos ácidos inhiben el crecimiento de células bacterianas y fúngicas mediante diferentes mecanismos: la disrupción de la membrana plasmática (Bracey, 1998), la inhibición de reacciones metabólicas esenciales (Krebs, 1983) y el estrés por mantener el pH intracelular (Bracey, 1998; Stopforth, 2003).

### **3- Acciones sobre la funcionalidad del tracto gastrointestinal**

Históricamente se ha atribuido el efecto de los probióticos a su capacidad de modificar la composición de la microbiota intestinal de potencialmente dañina a beneficiosa para el hospedador. Sin embargo, el mejor conocimiento de estos microorganismos ha permitido establecer diferentes acciones a través de los cuales ejercen efectos beneficiosos (Figura 2):

1. Competición con bacterias nocivas por:
  - desplazamiento de su sitio de unión al epitelio.
  - inhibición de su crecimiento y/o muerte mediante la producción de compuestos antibacterianos o reducción del pH.
2. Mejora de la función de barrera intestinal.
3. Producción de nutrientes importantes para la función intestinal.
4. Inmunomodulación.



**Figura 2:** Mecanismos de acción de los probióticos. (Arribas et al 2008)

Cuando ocurre un desequilibrio entre bacterias patógenas y bacterias beneficiosas de la microbiota intestinal, existe una predisposición al desarrollo de infecciones y/o enfermedades inmunoinflamatorias. El equilibrio de la flora bacteriana se puede optimizar mediante intervención farmacológica o nutricional sobre el ecosistema de los microorganismos intestinales utilizando probióticos. Los probióticos producen beneficios inmunológicos activando los macrófagos locales y aumentando la producción de inmunoglobulinas modulando el perfil de citoquinas, y no inmunológicos que son la digestión de los alimentos que compiten con los patógenos por los nutrientes. Otro posible mecanismo consiste en una modificación del pH en el lumen intestinal, debido fundamentalmente a la producción de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico y los ácidos grasos

de cadena corta acetato, propionato y butirato, como consecuencia de su capacidad fermentativa (Le Blay et al 1999, Morison et al 2006). Otro mecanismo involucrado es la producción de compuestos antibacterianos como pueden ser bacteriocinas o peróxido de hidrogeno (Jack et al 1995, Liévin et al 2000). Sin embargo, el desplazamiento de bacterias nocivas no necesariamente implica actividad bacteriostática o bactericida, sino que puede ser consecuencia de la competición física por unirse al epitelio, consumiendo también los sustratos disponibles para las bacterias patógenas (Shida et al 2002).

El tracto gastrointestinal cuenta con distintos mecanismos que tratan de prevenir la entrada de agentes potencialmente perjudiciales para el organismo. Para este cometido, la monocapa epitelial y el revestimiento de moco que la recubre, junto con las uniones estrechas que mantienen unidos a los enterocitos, forman una barrera física que previene la entrada a la lámina propia de microorganismos potencialmente patógenos y de antígenos lumbinales.

La flora bacteriana fermenta a los carbohidratos provenientes de la dieta generando acetato, propionato y butirato, generados principalmente en el intestino grueso. Estos metabolitos funcionan como la principal fuente de energía para los colonocitos, regulando su desarrollo y diferenciación (Cumming 1981). Además, y en íntima relación con su capacidad de colaborar en la función de barrera intestinal, tienen efectos tróficos sobre el epitelio intestinal, lo que es de gran importancia para la recuperación de la integridad del epitelio intestinal en caso de daño y para la reducción del riesgo de translocación bacteriana que puede tener lugar en situaciones de alteración de la barrera intestinal como es en la enfermedad inflamatoria intestinal (Urao et al 1999).

El sistema inmunitario intestinal constituye la parte más extensa y compleja del sistema inmunitario, ya que al estar en contacto con el exterior, recibe diariamente una enorme carga antigénica, debiendo distinguir entre potenciales patógenos y antígenos inocuos como son las proteínas de la dieta y las bacterias comensales. El principal componente del sistema inmunitario intestinal está constituido por el tejido linfoide asociado al intestino (GALT, *Gut-Associated Lymphoid Tissue*), en el que se puede distinguir dos compartimentos (Mowat 2003):

a) GALT organizado, constituido por folículos linfoides aislados, folículos linfoides asociados o placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos.

b) GALT difuso, integrado por poblaciones de linfocitos dispersos a lo largo del epitelio y de la lámina propia del intestino. Dada su localización intestinal y la posibilidad de interactuar con el epitelio de la mucosa, es evidente que los probióticos actúan sobre la inmunidad intestinal tanto específica como inespecífica, y que este hecho está íntimamente relacionado con sus efectos beneficiosos sobre el hospedador.

Diversos estudios han puesto de manifiesto que numerosos lactobacilos pueden alertar al sistema inmune intestinal, y secundariamente favorecer el rechazo de microorganismos patógenos, esto lo pueden realizar mediante la producción de inmunoglobulinas específicas de tipo A (Rinne et al 2005), o la activación de células K ("natural killer") (Ogawa et al 2006). Otros efectos inmunomoduladores de estos probióticos se derivan de su capacidad para incrementar la actividad fagocítica de leucocitos intestinales, promover una mayor proliferación de células B junto con aumento en la secreción de inmunoglobulinas (A y G), y estimular la producción de citocinas como IL-2, IL-6 o TNF- $\alpha$ . Otros probióticos,

como *E. coli* no patógena o *Lactobacillus sakei*, tienen la capacidad de aumentar la producción de citocinas antiinflamatorias tales como IL-10 y TGF- $\beta$  al mismo tiempo que reduce las de carácter proinflamatorio, por ejemplo TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  o IL-8.

Estas propiedades inmunomoduladoras también se han puesto de manifiesto en estudios llevados a cabo en humanos con patologías intestinales. Cuando se administró una mezcla probiótica a pacientes con anastomosis ileoanal, se pudo observar una disminución en los niveles de RNAm de IL-1 $\beta$ , IL-8 e IFN- $\gamma$ , así como en el número de células polimorfonucleares, en comparación con los pacientes que recibieron el placebo (Lammers et al 2005). Ulisse *et al.*, describieron una reducción de la expresión de las citocinas IFN- $\gamma$  e IL-1 $\alpha$  y de la actividad óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en biopsias de pacientes con pouchitis tratados con probióticos (Ulisse et al 2001). A pesar del gran número de estudios, en la actualidad no se conoce con exactitud cómo se lleva a cabo la interacción de los probióticos con las células linfoides del intestino para conseguir la activación del sistema inmunitario intestinal. En este sentido, se ha propuesto que los lactobacilos pueden modificar la producción de citosinas mediante la participación de algún componente de su pared celular que no ha sido totalmente caracterizado (Solis et al 1997, Rangavajhyala et al 1997). Es importante destacar que el efecto de los probióticos sobre la respuesta inmune no se limita a una actuación sobre el tejido intestinal, pudiendo afectar a la inmunidad sistémica, con claros efectos beneficiosos en diferentes afecciones de alta prevalencia, especialmente en la población infantil, como son el eczema atópico y las alergias en general (Majamaa et al 1997).

Por lo antes expuesto, el uso de probióticos se asocia en la actualidad con un gran número de efectos beneficiosos en humanos, muchos de ellos establecidos de forma empírica, como la mejora de

la intolerancia a la lactosa, la modulación del sistema inmunitario, la reducción de la hipercolesterolemia y la protección frente a enfermedades infecciosas, inflamatorias y alérgicas (Gill 2003). Sin embargo, no se debe asumir, que todos los probióticos posean las mismas propiedades beneficiosas. De igual manera, cuando se adscribe un efecto beneficioso a una cepa, como se ha dicho anteriormente, éste no se puede extrapolar a las restantes cepas de la misma especie. Incluso el efecto que una cepa puede presentar depende de las condiciones de su empleo y, muy particularmente, de la dosis. La concentración de probióticos viables que se considera que debe llegar al intestino para producir un efecto beneficioso es  $\geq 10^6$  UFC/ml en el intestino delgado y  $\geq 10^8$  UFC/g en el colon (Marteau et al 2003). Existen evidencias de la eficacia de las bacterias probióticas en ciertas áreas, y suficientes estudios experimentales en otras para justificar posibles mecanismos de acción que faciliten el desarrollo de microorganismos más efectivos, así como para definir los límites de su efectividad. En base a esto, pasamos a detallar algunos de los efectos beneficiosos atribuidos a los probióticos, con distinto grado de apoyo experimental.

## **4- Patologías del tracto gastrointestinal**

### **4.1- Gastroenteritis infecciosas y factores microbiano**

La gastroenteritis infecciosa es una inflamación y/o disfunción del intestino producida por microorganismos o sus toxinas. Se caracteriza por un síndrome diarreico (disminución de la consistencia de las heces en general con un aumento en el número de deposiciones) acompañado o no con vómitos y dolor abdominal. Constituye una de las causas principales de morbilidad mundial.

La gastroenteritis es más frecuente y grave en niños que adultos, y constituye la principal causa de mortalidad infantil en el mundo.

En condiciones normales, el organismo posee un gran mecanismo de defensa como para combatir la enorme cantidad de microorganismos entéricos potencialmente patógenos ingeridos en cada comida.

El 99% de la flora intestinal saprófita, situada predominantemente en el último tramo del intestino delgado y colon, está constituida por microorganismos anaerobios (bateroides, clostridium, Peptoestreptococcus y muchos otros). Otras bacterias como *E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus* y *Enterococcus*, representan el 1% restante. Esta flora constituye un mecanismo de defensa eficaz impidiendo la colonización de bacterias enteropatógenas. En personas con escasa población de bacterias intestinales, como los niños que todavía no han desarrollado la colonización entérica normal, o tras la ingesta de antibióticos vía oral, los microorganismos enteropatógenos pueden causar infecciones con inóculos más pequeños. Más aún pueden seleccionarse microorganismos como *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Clostridium* y *Candida* que colonizan el intestino, con el riesgo de infección sistémica.

La mayoría de los microorganismos patógenos no alcanzan el tracto intestinal debido a la barrera gástrica. El pH gástrico normal, inferior a 4, destruye el 99,9% de las enterobacterias ingeridas en 30 min. En situaciones en las cuales este pH es superior o en gastrectomizados existe un mayor riesgo de infecciones entéricas por *Shigella* o *Salmonella*) y parasitarias (*G. lamblia*).

En la lámina propia del intestino delgado (placas de Peyer) y colon existen células linfoides que se disponen en nódulos. Tanto la respuesta celular inmune como la producción de anticuerpos juegan un papel importante en la protección del huésped frente a infecciones

gastrointestinales. También la inmunidad humoral (inmunoglobulinas G, M e IgA secretoras) desempeña un importante papel protector.

El número de microorganismos ingeridos capaz de causar enfermedad varía considerablemente de una especie a otra. En caso de *Shigella*, *Entamoeba* y *Giardia lamblia* son suficientes 10 a 100 bacterias o quistes para provocar infección, mientras que se requiere la ingesta de  $10^5$ - $10^8$  microorganismos para causar enfermedad en el caso de *Salmonella* y *Vibrio Cholerae*.

La capacidad de causar enfermedad por parte de la mayoría de los microorganismos enteropatógenos depende no solamente de su capacidad de penetrar a través de la mucosa o producir enterotoxinas o citotoxinas, sino también su capacidad para adherirse y colonizar la mucosa. Esta característica ha sido bien descrita para *E. coli* enterotoxigénica, la cual debe adherirse y colonizar el epitelio intestinal previamente a la producción de enterotoxina. *E. coli* enteropatógena y enterohemorrágica producen factores de virulencia que le permiten adherirse y destruir el borde del cepillo del epitelio intestinal.

La producción de una o más exotoxinas por diversos microorganismos enteropatógenos es importante en la patogénesis de la diarrea. Las toxinas pueden estar preformadas en los alimentos o bien pueden ser liberadas por el agente causal en la luz intestinal. Se distinguen las enterotoxinas, responsables de diarrea acuosa, actuando directamente en los mecanismos secretores de la mucosa intestinal; citotoxinas, que provocan la destrucción de las células de la mucosa intestinal, originando diarrea inflamatoria, y neurotoxinas, que actúan directamente en el sistema nervioso central y periférico. Algunas exotoxinas actúan por diferentes mecanismos; así, *Shigella dysenteriae* tipo I, por ejemplo, produce una toxina que tiene capacidad enterotóxica y citotóxica.

Las citotoxinas bacterianas, por su parte, destruyen las células de la mucosa intestinal produciendo el síndrome disentérico, con presencia de sangre en las heces. Los microorganismos enteropatógenos que característicamente producen estas citotoxinas incluyen *S. dysenteriae*, *V. parahemolyticus* y *C. difficile*.

Los cuadros disenteriformes pueden resultar no solo de la producción de citotoxinas, sino también de la invasión bacteriana y destrucción de las células de la mucosa intestinal. Las infecciones causadas por *Shigella* y *E.coli* enteroinvasivo, por ejemplo, están caracterizadas por la invasión de las células epiteliales de la mucosa intestinal, multiplicación intraepitelial y posterior diseminación a las células adyacentes.

Como se mencionó anteriormente, los probióticos son capaces de modular el sistema inmune de tipo sistémico y por tanto presentan efectos positivos frente a alteraciones tanto intestinales como extraintestinales. Dentro de las patologías intestinales frente a las que los probióticos se han propuesto como efectivos encontramos la diarrea (Black et al 1991; Rolfe et al 2000), intolerancia a la lactosa (Fernandes et al 1987, Jiang et al 1997), enfermedad inflamatoria intestinal (Malchow et al 1997, Rembacken et al 1999), úlcera gastroduodenal, e incluso cáncer (Hirayama et al 2000, Brandy et al 2000). En relación con las afecciones sistémicas en las que los probióticos pueden presentar un efecto beneficioso se incluyen distintos fenómenos de tipo alérgico. Se ha propuesto el efecto terapéutico que pueden presentar los probióticos en el tratamiento de la vaginitis tras su administración local (McLean et al 2000).

## 5-Alimentos Funcionales

El desarrollo de alimentos funcionales constituye una oportunidad real de contribuir a la mejora de la calidad de la dieta y a la selección de alimentos que pueden afectar positivamente la salud y el bienestar del consumidor.

En los últimos años ha existido una gran demanda de una nueva línea de alimentos funcionales a base de probióticos que ayudan a mantener el estado de salud general del organismo y a la vez pueden tener un efecto benéfico adicional, terapéutico o preventivo en el huésped. Estos productos se han industrializados de manera segura. Según la FAO (2002) los probióticos se definen como: "Microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrados en cantidades adecuadas". Los alimentos funcionales se definen como "alimentos susceptibles de producir un efecto benéfico sobre una o varias funciones específicas en el organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, de mejorar el estado de salud y de bienestar y/o de reducir el riesgo de una enfermedad" (Mollet, 2002).

El concepto de alimentos funcionales nació en Japón. En los años 80, las autoridades sanitarias japonesas se dieron cuenta que para controlar los gastos sanitarios, generados por la mayor esperanza de vida de la población anciana, había que garantizar también una mejor calidad de vida. Se introdujo un nuevo concepto de alimentos, que se desarrollaron específicamente para mejorar la salud y reducir el riesgo de contraer enfermedades. En Japón, la investigación sobre alimentos funcionales empezó activamente ya a principios de los 80, y en 1986 se implementaron los primeros programas específicos. En 1991 se introduce el concepto de alimentos para usos específicos en favor de la salud (Foods for Specified Health

Use, FOSHU). Éstos deben estar en la forma de alimentos ordinarios, no en cápsulas ni pastillas, y se asume que se consumen como parte de la dieta habitual. La mayor parte de los productos que han sido aprobados contienen oligosacáridos (OS) o bacterias como factores que promueven la salud a nivel intestinal (Diplock y col., 1999).

El agregado de bacterias probióticas para la elaboración de Alimentos Funcionales depende por un lado, del sinergismo que debe establecerse entre estos cultivos y los iniciadores de la fermentación (fermentos, cultivos iniciadores) lo que permite obtener un producto fermentado con excelentes propiedades sensoriales (Saarela, 2000) y por el otro lado, de los factores extrínsecos que afectan o condicionan la viabilidad de las cepas funcionales. En los Alimentos Funcionales los microorganismos probióticos deben permanecer viables y activos en el alimento y durante el pasaje gastrointestinal para garantizar así su potencial efecto benéfico en el huésped.

## 6-Enteropatógenos

### 6.1-Shigella

Los microorganismos del género *Shigella* son bacilos Gram-negativos, no móviles, no esporulados, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Estos bacilos fueron descritos hace más de 100 años por el científico japonés Kiyoshi Shiga quien aisló el *Bacillus dysenteriae*. Posteriormente al *Bacillus dysenteriae* se lo llamó *Shigella* en honor al científico japonés.

Se conocen alrededor de 4 especies con más de 45 serogrupos basados en el antígeno O: *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y *Shigella sonnei*. Estos serogrupos se clasifican de la A a la D:

**Serogrupo A:** *S. dysenteriae*, es un tipo que se encuentra en los países del mundo en desarrollo donde ocasiona epidemias mortíferas.

**Serogrupo B:** *S. flexneri*, causante de cerca de una tercera parte de los casos de shigelosis en los Estados Unidos.

**Serogrupo C:** *S. boydii*, causante de disentería por vía fecal-oral restringida a la India.

**Serogrupo D:** *S. sonnei*, conocida también como *Shigella* del grupo D, que ocasiona más de dos terceras partes de todos los casos de shigelosis en los Estados Unidos.

Los grupos A–C son fisiológicamente similares, *S. sonnei* (grupo D) puede ser distinguida del resto en base a las pruebas de metabolismo bioquímico.

Las *Shigellas* son bacilos entero-invasivos que provocan la destrucción inflamatoria del epitelio intestinal dando lugar a la disentería bacilar y a una recto-colitis aguda. Estas patologías pueden causar complicaciones letales, sobre todo en recién nacidos y niños pequeños en la mayoría de las zonas empobrecidas del planeta. La mortalidad anual atribuida a la disentería bacilar es alrededor de un millón y es una de las causas más importante de enfermedades gastrointestinales en todo el mundo.

Un reporte de la dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud de la Nación Argentina, que abarca el período 01/01/2009 al 26/09/2009, si bien comprende un bajo número de casos, permite observar que el 59% de los agentes causales de diarrea son bacterias, correspondiendo el 52% de estas a *Shigella*, seguido por *Campylobacter* (18%), *E.coli* (17%) y *Salmonella* (13%). Dentro del género *Shigella*, las especies más frecuentemente notificadas son *S. flexneri* (73%) y *S. sonnei* (18%) (Ministerio de Salud de la Nación Argentina. 2009, 2010).

El reservorio natural de *Shigella* es el intestino humano. La dosis infectiva necesaria para causar la enfermedad es muy baja, aproximadamente 10 a 100 bacterias. La transmisión ocurre de persona a persona por la vía fecal-oral y a través del consumo de alimentos contaminados. En general ocurre a través del agua y alimentos que son procesados o elaborados manualmente y que están expuestos a escaso tratamiento térmico o se sirven crudos al consumidor (Kapperud G. et al. 1995, Koutsotoli A. D. et al. 2006, Lindqvist R. 1999, Warren B. R. et al. 2006). La *Shigella* causa disentería, resultando en una destrucción de las células epiteliales de la mucosa intestinal a nivel del ciego y el recto.

*Shigella sonnei* es la causante más frecuente de shigelosis en las naciones industrializadas mientras que *Shigella flexneri* es la causa más común en los países en vía de desarrollo. La shigelosis es una enfermedad inflamatoria aguda de la mucosa colónica caracterizada por calambres abdominales, fiebre y diarrea severa que a menudo contiene sangre y moco. *Shigella* causa la enfermedad al invadir y replicarse en las células que tapizan la mucosa colónica. En la adherencia de estos microorganismos a la célula, intervienen proteínas de los genes estructurales. Estos genes se hallan en un plásmido de gran tamaño llamado plásmido de virulencia. *Shigella* se une e invade, en primer lugar, a las células M que se encuentran en el denominado epitelio asociado al folículo (FAE), sobre las placas de Peyer, y una vez en el interior de la mucosa intestinal es captada por los macrófagos residentes en el espacio subepitelial. A su vez, se ha descrito que *Shigella* lisa la vacuola fagocítica del macrófago provocando la muerte por apoptosis de dicha célula, proceso en el cual interviene el plásmido de invasividad. Antes de su muerte, el macrófago es activado por *Shigella* a través de la vía de las caspasas-1 liberando citoquinas proinflamatorias como IL-18 e IL-1. Estas

citoquinas activan la respuesta inmune innata y el reclutamiento de polimorfonucleares que infiltran el epitelio desestabilizándolo. La pérdida de la integridad celular provoca que más bacterias penetren el epitelio con facilidad. Mediante una reorganización de los filamentos de actina de las células, las bacterias son empujadas de célula en célula, y de este modo se encuentran protegidas frente a una posible destrucción por parte del sistema inmune (figura 3).

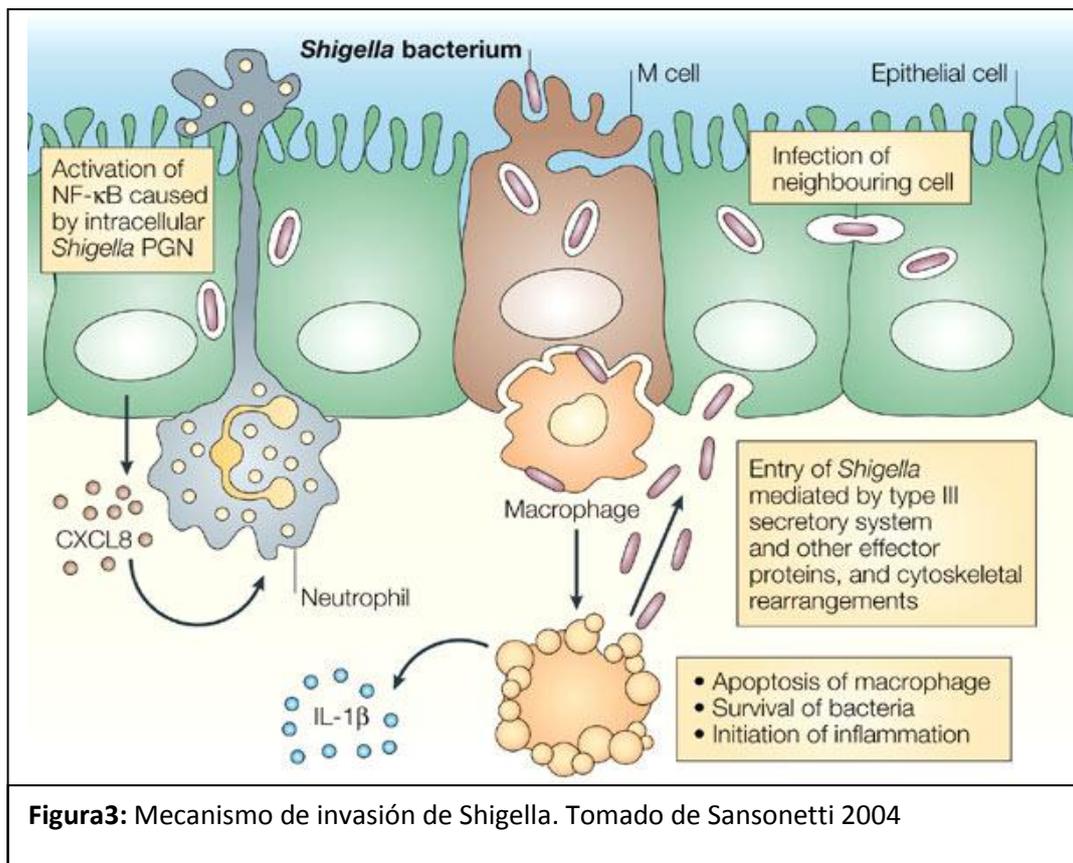


Figura3: Mecanismo de invasión de Shigella. Tomado de Sansonetti 2004

### 6.1.1-Efectos de los probióticos sobre Shigella

Los probióticos se han definido como microorganismos viables no patógenos que, cuando se administran al hombre o los animales en dosis adecuadas, confieren beneficios para la salud del huésped mediante la mejora del equilibrio microbiano de la flora intestinal.

También se utilizan como productos farmacéuticos destinados a fines terapéuticos, principalmente para trastornos gastrointestinales o genito-uritarios (Berg *et al* 1998; Reid *et al* 2001).

Algunos resultados demuestran que *L. casei* modula las vías pro-inflamatorias inducidas por *S. flexneri*. La utilización de tratamientos con *Lb. casei* frente a la infección de *Shigella* en el epitelio intestinal humano está en expansión. En lo que respecta a las levaduras, Rodrigues *et al.* (1996) demostraron que *Saccharomyces boulardii* protege a ratones convencionales y gnotobióticos contra la infección oral por *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri*. Algunos estudios experimentales y/o ensayos clínicos han sido llevados a cabo con la asociación de los probióticos, pero en general con microorganismos que presenta la misma combinación de mecanismos de protección tales como *Bifidobacterium* y *Streptococcus* (Saavedra *et al.* 1994). La combinación de probióticos con diferentes mecanismos de acción es interesante para ampliar la gama de protección de un preparado bioterapéutico.

Distintos investigadores han demostrado que el kefir posee propiedades probióticas dado que inhibe el crecimiento de patógenos intestinales (Garrote 2000, Garrote y col. 2000, Silva y col. 2009) y ejerce efectos de modulación sobre la respuesta inmune sistémica y en la mucosa intestinal (Thoreaux y Schmucker 2001, Vinderola y col. 2005a, b, Vinderola y col. 2006a,b). Sin embargo, poco se conoce acerca del papel que juegan los microorganismos que componen el kefir en la inducción de estos efectos benéficos. Algunos ensayos *in vitro* demostraron que diez levaduras aisladas de diferentes gránulos de kefir son capaces de inhibir el crecimiento de *E. coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* y/o *Bacillus cereus* (Diosma, 2006, comunicación personal). Recientemente, Hugo *et al* (2008) reportaron que *L. plantarum* CIDCA 83114 fue capaz de inhibir los

efectos citotóxicos de una cepa de *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) sobre cultivos de la línea celular Hep-2, a través de mecanismos independientes de la viabilidad del lactobacilo. A su vez, se demostró la capacidad de *L. plantarum* CIDCA 83114 y de extractos obtenidos a partir de las paredes bacterianas de inhibir los efectos citotóxicos de la toxina Shiga 2 producida por ECEH sobre células Vero (Kakisu 2010 Tesis doctoral).

Si bien se conocen muchos estudios respecto a los efectos probióticos de BAL y levaduras sobre diferentes enteropatógenos, se conocen pocas evidencias tanto *in vivo* como *in vitro* frente a *Shigella*. Uno de los principales estudios fue realizado por Nader y col en 1992 quienes observaron una protección de *Lb. casei* y *Lb. acidophilus* contra la acción de *Shigella sonnei* en ratones albinos obteniendo una supervivencia del 40% respecto al control. *Lactobacillus casei* intervienen en la modulación de la respuesta inmune pro-inflamatoria que induce *S. flexneri* luego de la invasión sobre células epiteliales Caco-2 (Tien et al. 2006). Moorthy et al 2007 observaron que la combinación de *L. rhamnosus* y *L. acidophilus* demostró ser más eficaz en la reducción de la infiltración de neutrófilos y contrarrestar de manera significativa el estrés oxidativo durante la diarrea inducida por *S. dysenteriae* en ratas albinas adultas.

Estudios recientes revelan que cuando se evalúa la exclusión, la competencia y el desplazamiento de *Shigella sonnei* sobre células HT-29, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* M5-L, *Lactobacillus rhamnosus* J10-L y *Lactobacillus casei* Q8-L todos mostraron actividad inhibitoria y poseen la capacidad de inhibir la adherencia de *S. sonnei* a células HT-29 (Zhang 2010).

## 6.2- Clostridium

*Clostridium* es un bacilo Gram positivo, anaerobio, formador de esporos. Este género se define por los cuatro rasgos siguientes: 1) presencia de endosporas; 2) metabolismo anaerobio estricto; 3) incapacidad de reducir sulfato a sulfito, y 4) pared celular grampositiva. La mayor parte de clostridios son saprofitos inocuos, pero algunos son patógenos del ser humano bien conocidos con antecedentes comprobados de producción de enfermedades, como el tétanos (*C. tetani*), el botulismo (*Clostridium botulinum*, *Clostridium barata*, *Clostridium butyricum*), mionecrosis o gangrena gaseosa (*C. perfringens*, *Clostridium novyi*, *Clostridium septicum*, *C. histolyticum*) y diarrea y colitis asociadas a antibióticos (*Clostridium difficile*). La importante capacidad patógena de los clostridios se puede atribuir a las siguientes características: 1) la capacidad para sobrevivir en condiciones ambientales adversas mediante la formación de esporas; 2) el rápido crecimiento en un ambiente enriquecido y privado de oxígeno, y 3) la síntesis de numerosas toxinas histolíticas, enterotoxinas y neurotoxinas.

### 6.2.1 *Clostridium difficile*

Hasta mediados de los años setenta no se consideró la importancia clínica de *C. difficile*. Este microorganismo rara vez se aislaba de los coprocultivos y se desconocía su función en la enfermedad del ser humano. Sin embargo, los estudios sistemáticos muestran claramente que la toxina producida por *C. difficile* origina enfermedades gastrointestinales asociadas a antibióticos que comprenden desde una diarrea relativamente benigna y de resolución

espontánea hasta una colitis pseudomembranosa grave que pone en peligro la vida.

En pacientes con tratamiento con antibióticos o agentes antineoplásicos sufren un desbalance en su microbiota intestinal normal lo que ayuda a la colonización del tracto gastrointestinal por *C. difficile*. Una vez instalado en el intestino, desarrolla produciendo como principales factores de virulencia dos toxinas, toxina A y toxina B. Las infecciones causadas por este patógeno conducen a cuadros que van desde diarrea, colitis, colitis pseudomembranosa fulminante (CPM), megacolon tóxico y en casos severos puede conducir a la muerte del paciente (Elmer, 1996, Dallal 2002). Las diarreas asociadas a *C. difficile* (DACD) comprenden entre el 20 y 50% de las diarreas asociadas a antibióticos y el 10% de las diarreas nosocomiales (Mylonakis et al., 2001).

La citotoxina provoca la despolimerización de la actina, con posterior destrucción del citoesqueleto celular tanto en condiciones in vivo como in vitro. A pesar de que ambas toxinas parecen interaccionar de manera sinérgica en la patogenia de la enfermedad, las cepas negativas para la enterotoxina A aún son capaces de producir enfermedad. El diagnóstico de la infección por *C. difficile* se confirma mediante la demostración de la presencia de la enterotoxina o la citotoxina en una muestra fecal procedente de un paciente con síntomas clínicos compatibles con esta entidad.

La enterotoxina es quimiotáctica para los neutrófilos, con infiltración de polimorfonucleares en el íleon, lo que da lugar a la liberación de citoquinas. Asimismo, la toxina A ejerce un efecto citopático que altera la unión intercelular estrecha, incrementa la permeabilidad de la pared intestinal, y produce una ulterior diarrea.

La citotoxina provoca la despolimerización de la actina, con posterior destrucción del citoesqueleto celular tanto en condiciones *in*

vivo como *in vitro*. A pesar de que ambas toxinas parecen interaccionar de manera sinérgica en la patogenia de la enfermedad, las cepas negativas para la enterotoxina A aún son capaces de producir enfermedad. Por otra parte, la producción de una o ambas toxinas no parece bastar para provocar enfermedad; por ejemplo, el estado de portador de *C. difficile* y la presencia de concentraciones elevadas de toxinas son frecuentes en los niños pequeños, mientras que la enfermedad no lo es.

Las proteínas de la capa superficial (SLPs) bacterianas desempeñan una destacada función en la unión del patógeno al epitelio intestinal, la cual posibilita la producción localizada de toxinas y ulterior daño tisular. *C. difficile* forma parte de la microbiota intestinal normal en un pequeño número de individuos sanos y algunos pacientes hospitalizados. La enfermedad se desarrolla en los individuos que reciben antibióticos debido a que estos fármacos alteran la microbiota entérica normal, permitiendo el crecimiento excesivo de estos microorganismos relativamente resistentes, o haciendo al paciente más vulnerable a la adquisición exógena de *C. difficile*. La enfermedad se desarrolla cuando el microorganismo prolifera en el colon y sintetiza sus toxinas en el mismo. El diagnóstico de la infección por *C. difficile* se confirma mediante la demostración de la presencia de la enterotoxina o la citotoxina en una muestra fecal procedente de un paciente con síntomas clínicos compatibles con esta entidad. Asimismo, la presencia de la citotoxina se puede detectar mediante un análisis de citotoxicidad *in vitro* basado en células de cultivo.

Para tratar de comprender mejor los mecanismos de interacción entre *C. difficile* y el hospedador que conllevan a la colonización, se han empleado modelos *in vitro* que utilizan diferentes líneas celulares en cultivo como Caco-2, Hela y HT29, células productoras de mucus

HT29-MTX y fibroblastos. (Paredes- Sabja et al 2011, Ma et al 2011, Eveillard et al 1993)

### **6.2.2-Tratamiento de la enfermedad causada por *Clostridium*.**

La forma de tratar la infección por *Clostridium* consiste en retirar los antibióticos implicados en favorecer su instalación (p. ej., ampicilina, clindamicina). En general cuando esto ocurre la sintomatología revierte.

Sin embargo, en ocasiones, es necesario realizar un tratamiento específico con metronidazol o vancomicina para el control de la diarrea o la colitis graves (Poutanen y Simor, 2004). Se han observado recidivas en 20% a 30% de los pacientes después de finalizar la terapia. Esto se debe a que sólo las formas vegetativas de *C. difficile* mueren cuando se aplica el tratamiento antibiótico, las esporas son resistentes. Una estrategia utilizada para evitar estas recidivas consiste en aplicar una segunda tanda de tratamiento con el mismo antibiótico.

Es difícil prevenir la enfermedad, debido a que *Clostridium difficile* es un patógeno hospitalario que se encuentra fundamentalmente en las zonas adyacentes a los pacientes infectados (como camas, aseos). Las esporas de *C. difficile* son difíciles de eliminar, a no ser que se apliquen medidas estrictas de limpieza y mantenimiento; por tanto, el microorganismo puede contaminar el ambiente durante muchos meses y puede constituir el principal origen de los brotes nosocomiales de la enfermedad por *C. difficile*.

En la prevención de las infecciones causadas por *C. difficile* se han empleado eficazmente terapias alternativas, como la administración de probióticos. Dentro de los probióticos empleados

podemos mencionar, a *Saccharomyces boulardii*, levadura que administrada 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).

Muchos de los mecanismos por los cuales ciertas bacterias probióticas antagonizan los efectos de patógenos aún no han sido dilucidados completamente. En el caso particular de *C. difficile*, como se mencionó anteriormente, se han empleado diferentes agentes probióticos en terapias preventivas. Aun así, no queda claro cuáles serían los mecanismos por los cuales dichas terapias probióticas ejercen su acción contra las infecciones por *C. difficile*.

Para muchos patógenos intestinales, la adherencia de la bacteria al epitelio intestinal es un prerrequisito para la colonización e infección (Kagnoff, 1997; Eckmann et al., 1995). Uno de los mecanismos a través de los cuales las bacterias probióticas ejercen su acción protectora es el efecto barrera. Éste consiste en impedir el establecimiento o permanencia de los microorganismos potencialmente patógenos en el intestino mediante diferentes mecanismos entre los que podemos mencionar la inhibición del crecimiento del patógeno por la acción de sustancias tales como bacteriocinas, ácidos orgánicos, enzimas proteolíticas, etc. (Collado et al., 2005); competencia por nutrientes, inhibición de la adhesión por impedimento estérico o competencia por receptores sobre las células epiteliales, bloqueo o inactivación de las adhesinas bacterianas, y efectos inmuno moduladores (Bouveir et al., 2001; Gill et al., 2003).

A pesar del tratamiento antibiótico adecuado, alrededor de 10-40% de los pacientes con diarrea antibiótica por *C. difficile* (DACD) experimentarán recurrencia de la enfermedad, sobre todo con la misma cepa, lo que sugiere un fracaso para eliminar completamente

el patógeno de la zona gastrointestinal. Los factores de riesgo de recaída incluyen una reducción de los anticuerpos IgG contra la toxina A en el suero (Kyne, 2001; Katchar, 2007).

Los probióticos se encuentran en una gran gama de productos como yogures, las leches fermentadas, polvos y cápsulas. El uso de probióticos como complemento de los medicamentos es cada vez más utilizado, existen datos relevantes que sustentan el uso de probióticos en enfermedades como la gastroenteritis pediátrica aguda (Szajewska, 2007; Szajewska, 2007), enterocolitis necrotizante, colitis ulcerosa (Alfaleh, 2008; Hedin, 2007; Kruis, 2004), y síndrome de intestino irritable (Kajander, 2008).

Los probióticos estimulan la función inmune de varias maneras, los modelos celulares y ensayos en modelos animales han demostrado que los probióticos pueden tener un profundo efecto anti-inflamatorio a través de la respuesta de la inmunidad innata (Hudspith et al, 2006; Schlee et al, 2007; Romanin et al 2010). Por otro lado pueden impedir la colonización por enteropatógenos y la posterior adhesión e invasión de la mucosa gastrointestinal. Una serie de estudios *in vitro*, la mayoría con *Escherichia coli* y *Salmonella entérica* serotipo *typhimurium* (*typhimurium S*), han demostrado que los probióticos inhiben el crecimiento de enteropatógenos (Ma D et al, 2004; Tuomola et al 1998). Estudios posteriores evidenciaron efectos similares de lactobacilos y bifidobacterias contra el crecimiento de *C. difficile* (Wullt et al, 2007).

Sin embargo, hay pocos estudios específicos sobre los mecanismos de resistencia a la colonización de *C difficile*. Algunos estudios indican que la ingesta de probióticos debe realizarse con anterioridad a la infección del enteropatógeno para evitar la adhesión. El probiótico VSL # 3 (una combinación de nueve cepas de bifidobacterias, *Lactobacillus* y *Streptococcus thermophilus*) y

*Lactobacillus rhamnosus* GG también inducen producción de mucina del colon a través de la regulación positiva del gen MUC2, mejorando así la barrera de protección de la epitelio (Mattar et al, 2002; Caballero-Franco et al, 2007; Mack et al 1999).

Entre las especies más utilizadas para el estudio de las lesiones ocasionadas por la infección, espontánea o inducida con antibióticos, por *C. difficile* se destaca el hámster (Larson et al., 1978), el cobayo (Low et al., 1980), el ratón (Naaber et al., 1995), la rata (Czuprynski et al., 1983) y el conejo (Carman et al., 1984). Sin embargo, la especie más sensible a la infección por este patógeno es el hámster sirio (*Mesocricetus auratus*) el cual es capaz de desarrollar la enfermedad con la sola exposición a un ambiente contaminado por *C. difficile* (Rheg y Lu, 1982). Estudios sobre modelos animales indican que el tratamiento previo con *S. boulardii* puede inhibir directamente a *C. difficile* (Castagliuolo et al, 1996; Castagliuolo et al, 1999; Castex et al, 1990; Pothoulakis et al, 1993). Estos ensayos en ratas pretratadas con *S. boulardii* redujeron la unión de la toxina A del borde en cepillo intestinal, así como también la secreción intestinal de fluido, y también se descubrió una reducción de la permeabilidad intestinal. Este efecto se debe probablemente a una proteasa secretada por *S. boulardii* que puede hidrolizar las toxinas A y B y por lo tanto inhibe su unión a los respectivos receptores del borde en cepillo intestinal de la rata y líneas celulares de enterocito (Castagliuolo et al, 1996; Castagliuolo et al, 1999). Existen pocos modelos disponibles para realizar estudios sobre *C. difficile* y posibles agentes protectores contra tal infección. El modelo en hámster inducido por clindamicina, imita los aspectos de la enfermedad en seres humanos y ha sido ampliamente utilizado para prueba de la virulencia.

En el modelo de enterocolitis en hámsters, inducido por la administración de antibiótico, se ha demostrado una correlación entre la capacidad de colonización de diferentes cepas de *C. difficile* y su habilidad para asociarse a regiones del yeyuno y colon del animal (Borriello et al., 1998). La colonización por *C. difficile* implica la interacción de la bacteria con la superficie apical de la célula epitelial. Una vez allí establecida es capaz de liberar sus principales factores de virulencia, toxina A y toxina B, las cuales afectan la función barrera del epitelio intestinal exponiendo la zona basolateral de los enterocitos.

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 partir de los pocos días post infección con *C. difficile*. Esto no sólo depende de la dosis de infección, sino también de la toxigenicidad de la capa de clostridio utilizada (Bartlett 1978). 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).

Después de la administración de clindamicina y un desafío con cepas toxigénicas de *C. difficile*, los hámsters desarrollan una cecitis hemorrágica, que se manifiesta como "cola húmeda" (un signo de diarrea en hámsters) y es seguido por la muerte. Los hámsters con frecuencia mueren precipitadamente luego de la infección (a menudo sin signos de cola mojada), cuando son infectados con cepas altamente virulentas *C. difficile* (Razaq et al 2007). La infección intestinal por *C. difficile* es rápidamente letal en los hámsters y, por tanto, un aumento de la supervivencia es el principal objetivo del modelo.

Una evidencia de la infección en el tracto gastrointestinal, especialmente en el colon y el ciego, se caracteriza por la inflamación, enrojecimiento/hemorragia y una gran cantidad de líquido. El tracto gastrointestinal se deteriora muy rápidamente y disminuye la motilidad intestinal. La presencia de megacolon tóxico en humanos es una patología grave de la infección por *C. difficile*. Sin embargo, a diferencia de la condición clínica, rara vez los hámsters presentan diarrea (cola mojada) y con frecuencia mueren de la infección precipitadamente, sin signos de diarrea (aureola anal o cola mojada) cuando están infectados con cepas muy virulentas de *C. difficile* (Razaq et al, 2007; Sambol et al, 2001).

La mieloperoxidasa (MPO, peróxido de hidrógeno oxidoreductasa) es una enzima ampliamente distribuida en el organismo y sus fuentes fundamentales las constituyen los leucocitos (neutrófilos y monocitos) y los macrófagos. El incremento de la actividad de la MPO se ha reportado en varios procesos patológicos y está asociada con un aumento del riesgo al estrés oxidativo, como en el caso de las enfermedades infecciosas (generales o locales), las enfermedades inflamatorias (artritis reumatoidea) y la isquemia/reperfusión. En estos casos se reporta un aumento significativo de la actividad de MPO, en proporción directa al número de neutrófilos infiltrados en el tejido, por lo que se puede utilizar su actividad como índice de migración leucocitaria y por lo tanto de estrés oxidativo (Márquez et al, 1990; Svensson et al, 1988; Komatsu et al, 1992; Simpson et al, 1988). A fin de determinar la lesión provocado por *C. difficile*, se puede considerar a la MPO como un marcador de inflamación.

## 7-Conservación de microorganismos

El uso industrial de los probióticos implica no solo, la viabilidad, pureza y mantenimiento de sus propiedades probióticas, sino también una adecuada preservación de los mismos por largos períodos de tiempo sin que ninguna de sus propiedades tecnológicas y probióticas se vean alterada. Si bien se han utilizado muchas técnicas de conservación de microorganismos, no todos responden de manera similar. La necesidad de conservar cepas probióticas para ser fácilmente comercializables es un estímulo para la búsqueda de métodos de conservación.

### 7.1-Métodos de Conservación

Las metodologías de conservación se pueden dividir en dos tipos: las que permiten mantenimiento a corto plazo y aquellas que lo hacen a largo plazo. Dentro de las del primer tipo encontramos el enfriamiento a 4°C en la cual los microorganismos se mantienen en medios adecuados en heladera por períodos cortos que van desde 1 a 5 semanas. Y el congelamiento donde los microorganismos en medios adecuados son sometidos a temperaturas de entre 0° y -20°C.

Por debajo de 0°C comienza a congelarse el agua extracelular y comienza la salida del agua intracelular produciéndose una concentración de solutos intracelulares, lo cual causa un daño físico a la célula. No todos los microorganismos pueden soportar estas condiciones y esta característica es dependiente de cada cepa. El período máximo de almacenamiento es de 6 meses a aproximadamente 2 años.

Dentro de las técnicas utilizadas de almacenamiento de microorganismos a largo plazo, encontramos el congelamiento a -

80°C, la liofilización, y la ultracongelación con nitrógeno líquido. Se utilizan cultivos concentrados congelándolos a temperaturas de -20°C a -80°C en glicerol (Barbour y Priest, 1986) o por ejemplo a -196 °C en nitrógeno líquido (Tamine y Deeth, 1980). Lo cierto es que estas técnicas permiten la conservación de las muestras pero no su traslado, por ello se comenzaron a utilizar otras técnicas como el secado en spray y la liofilización.

## 7.2-Liofilización

La liofilización es un método de desecación en el que se elimina el agua contenida en la muestra por congelación y posterior sublimación del hielo en condiciones de vacío. Hammer en 1911 fue el primero en utilizar la liofilización para la conservación de microorganismos. El término liofilización surge cuando Flosdorft y Mudd (1935) utilizaron "*liofilo*" refiriéndose a la afinidad del agua en los materiales biológicos.

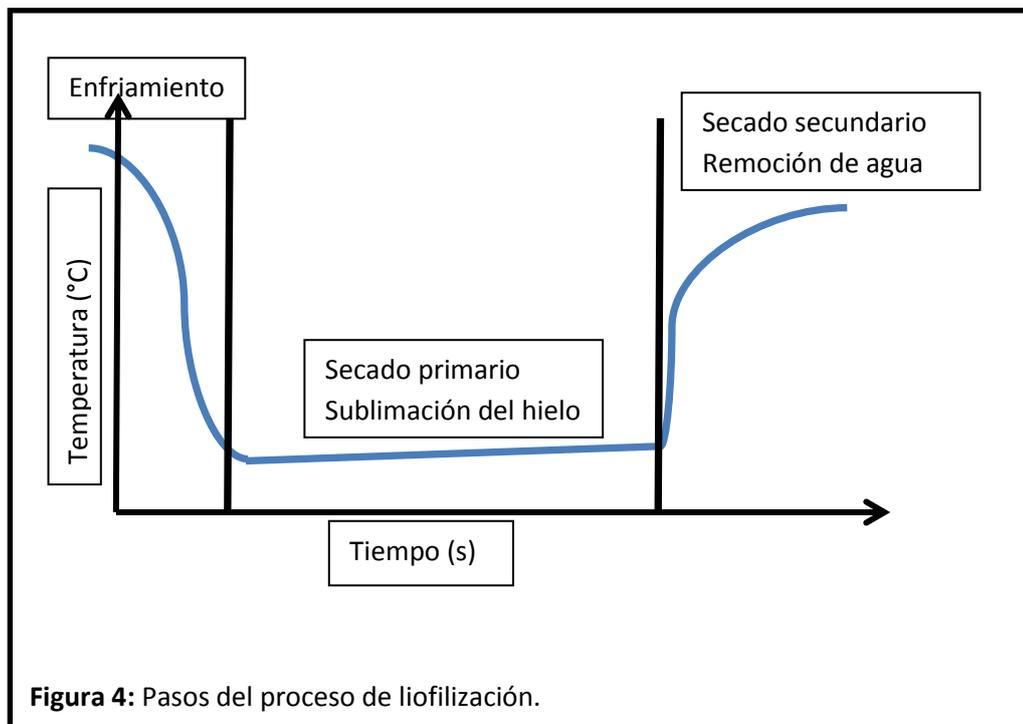


Figura 4: Pasos del proceso de liofilización.

La liofilización consta de diferentes procesos (figura 4):

- 1-Congelación
- 2-Secado Primario
- 3-Secado secundario

### 7.2.1-Congelación

Durante esta etapa se congela la mayor parte del agua que contiene la muestra formando cristales de hielo. El enfriamiento rápido conduce a la formación de cristales pequeños que preservan mejor las estructuras celulares pero son más difíciles de liofilizar. Por el contrario el enfriamiento lento conduce a la formación de cristales más grandes y llevan a un mejor secado. El resto del agua y los solutos quedan en una fase amorfa llamada fase vítrea. En el caso que se formen solidos cristalinos tendremos la temperatura eutéctica que es la máxima temperatura que puede alcanzar el producto durante la desecación primaria. Cuando en lugar de formarse una mezcla eutéctica, toda la suspensión aumenta progresivamente su viscosidad a medida que se enfría encontraremos el punto de transición vítrea. La temperatura de transición vítrea es la temperatura a la cual se produce el congelamiento total, en este punto es difícil de lograr una buena liofilización.

En esta etapa se intenta remover el agua libre y débilmente ligada de la muestra. La correcta sublimación depende de la presión de vapor del producto congelado y por ende de la temperatura. Para sublimar el agua es necesario trabajar por debajo del punto triple del diagrama de fases para el agua (0,006 atm de presión y 273,16K de temperatura).

## DIAGRAMA DE FASES DEL AGUA

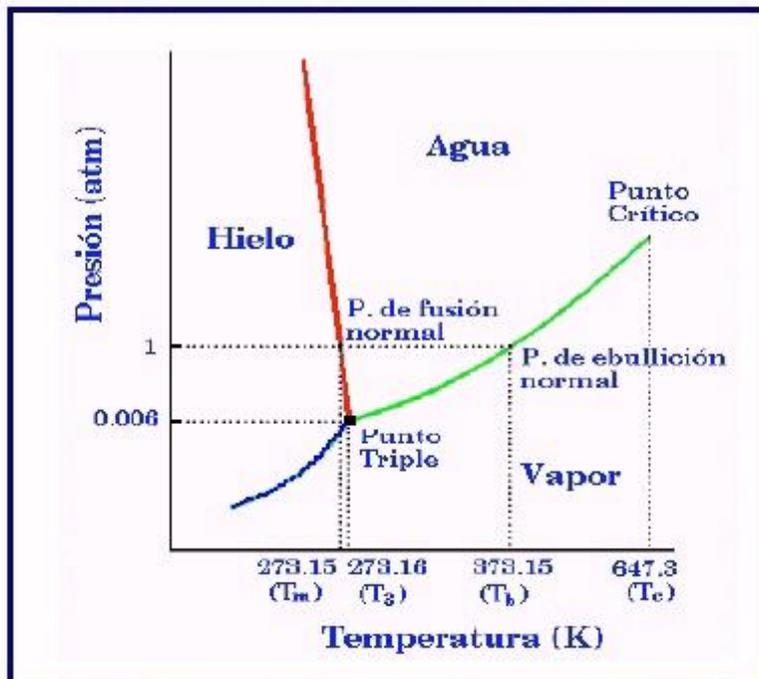


Figura 4: Diagrama de las fases para el agua

Para poder cumplir con estas condiciones el equipo de liofilización consta de una bomba de vacío que evacua el aire del medio y un condensador que recolecta el agua vaporizada que abandona la muestra. Una parte fundamental en el proceso es la energía que se entrega para remover el agua del producto congelado.

### 7.2.2-Secado secundario

El producto proveniente del secado primario, aún contiene agua estrechamente ligada, la cual contribuye a la integridad estructural. En esta etapa hay que entregar aún más energía para liberar el resto del agua de manera que quede solo 1-3%.

Finalmente, una vez que el producto está perfectamente seco se conserva hasta su utilización para lo cual basta con reconstituirlo mediante la adición de agua.

En general, para llevar a cabo el proceso de liofilización se utilizan crioprotectores que son sustancias capaces de estructurar el agua de manera que por congelación, no dañen la muestra, esto es debido a su capacidad de formar puente de hidrógeno. Los crioprotectores también actúan reemplazando el agua ligada y de esta manera protegen contra la destrucción por deshidratación (Martos et al 2007, Juárez Tomas et al, 2009) Entre las sustancias más utilizadas encontramos azúcares como trehalosa, sacarosa, lactosa, etc, como así también glicerol y otros. El uso de crioprotectores ha demostrado que mejora las tasas de supervivencia de los diferentes microorganismos y su efecto parece ser uno de los parámetros más importantes durante la congelación y la liofilización (De Antoni *et al.* 1991; de Urraza y De Antoni, 1997; Carvalho *et al.* 2004; Blanquet *et al.* 2005). Diferentes autores han demostrado que los hidratos de carbono y sustancias proteicas ejercen un efecto protector sobre la supervivencia de las cepas bacterianas o de levadura durante el secado por congelación y almacenamiento. En particular, diversos azúcares, se encontró que presentan efectos protectores para los diferentes lactobacilos (Leslie *et al.* 1995; Linders *et al.* 1997; Selmer-Olsen *et al.* 1999; Carvalho *et al.* 2002, 2003, 2004). Entre los sistemas proteicos, la leche o sus proteínas se emplearon comúnmente como crioprotectores (Abraham *et al.* 1990; Abadías *et al.* 2001; Blanquet *et al.* 2005; Otero *et al.* 2007).

### **Hipótesis de trabajo:**

A pesar de los numerosos estudios sobre probióticos que encontramos en la actualidad, poco se conoce respecto a complejos multicepas. En este trabajo de tesis se propuso:

- 1- Desarrollar una mezcla microbiana constituida por microorganismos aislados de kefir
- 2- Estudiar sus características tecnológicas y potencialmente probióticas
- 3- Determinar la capacidad inhibitoria frente a *Shigella* y *Clostridium difficile*
- 4- Estudiar la capacidad de la mezcla microbiana de proteger contra la infección por *Clostridium difficile* en un modelo *in vivo*.
- 5- Determinar el método de conservación más adecuado para la mezcla microbiana.

# CAPÍTULO I

Formulación de una mezcla  
microbiana

## Introducción

El kefir es un leche fermentada constituida por bacterias lácticas homofermentativas y heterofermentativas, levaduras fermentadoras y no fermentadores de la lactosa y bacterias ácido acéticas (Kozikowski, 1977; Vayssier, 1978), al cual se le atribuyen propiedades beneficiosas para la salud. La leche fermentada contiene un bajo contenido de etanol y es de carácter ácido, lo cual depende de las proporciones del inóculo y el tiempo de incubación. (Ertekin B. et al, 2010). Las acciones combinadas de las bacterias ácido lácticas y levaduras presentes en el gránulo de kefir serían la responsable de las propiedades que se le atribuyen a esta leche fermentada.

Resulta de gran importancia seleccionar cepas de bacterias lácticas y levaduras probióticas para la formulación de nuevos productos con características probióticas. Estos productos deben ser seguros, resistir el pasaje gástrico y a la bilis, colonizar el epitelio intestinal y poseer actividad antagónica contra bacterias patógenas.

La asociación de BAL y levaduras durante la fermentación aportan metabolitos que podrían contribuir al sabor de los alimentos (Akinrele, 1970; Halm et al, 1993.; Brauman et al, 1996; Hansen y Hansen, 1996). La producción de ácidos y otros componentes antimicrobianos durante la fermentación puede promover o mejorar la seguridad microbiológica (Nout et al, 1989.;Svanberg et al, 1992;Kingamkono et al, 1994, 1995) y la estabilidad de los productos (Mensah et al., 1991).

Muchos autores han estudiados diferentes mezclas de microorganismos como iniciadores de la fermentación, en general a base de bacterias lácticas. (Liu et al, 2009; Mogula et al, 2003).

Las levaduras aportan dióxido de carbono y etanol a los alimentos y pueden cambiar su metabolismo de acuerdo a la concentración de carbohidratos y el oxígeno disponible como por ejemplo *Kluyveromyces marxianus*, que metaboliza la lactosa produciendo glucosa, galactosa y etanol. A su vez pueden producir vitaminas que mejoran el crecimiento de los lactobacilos (Lopitz-Otsoa et al., 2006). Las levaduras se utilizan para tratamientos intestinales permitiendo el balance de la flora y evitando trastornos en la absorción intestinal (Czerucka et al. 2007). Estas levaduras tienen características distintivas relacionadas con la capacidad enzimática de eliminar la lactosa y la capacidad de modular la flora intestinal. Además liberan aminoácidos y factores de crecimiento permitiendo el desarrollo de lactobacilos que tienen dificultad para utilizar los aminoácidos y caseína de la leche.

La complejidad de obtener un fermento mixto reside en poder mantener la estabilidad de cada microorganismo en la mezcla y en las proporciones establecidas, y tener una capacidad sinérgica o, al menos, no antagónica. Uno de los desafíos en la obtención de un fermento mixto radica no sólo en la industrialización sino también en la posibilidad de hacer llegar un producto con características probióticas prácticamente inalterado durante su vida útil y seguro para la población.

## Objetivos

- ❖ Desarrollo de una mezcla microbiana constituida por microorganismos aislados de Kefir.
- ❖ Estudio de algunas características tecnológicas y potencialmente probióticas.

# Materiales y Métodos

## 1-Cepas y medios de cultivo

Las cepas utilizadas fueron aisladas de gránulos de kefir e identificadas y caracterizadas en el CIDCA.

Las cepas utilizadas son:

Lactobacilos: *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114.

*Lactobacillus kefir* CIDCA 8348.

Lactococo: *Lactococcus lactis subsp lactis* CIDCA 8221.

Levaduras: *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154.

*Saccharomyces cerevisiae* CIDCA 8112.

Dichas cepas fueron elegidas en base a sus propiedades potencialmente probióticas descritas en la tabla 1.

**Tabla1:** Propiedades probióticas de los microorganismos aislados de Kefir

Microorganismos	Propiedades probióticas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CIDCA8112 <i>Kluyveromyces marxianus</i> CIDCA 8154.	Elevada resistencia a sales biliares y capacidad regulatoria de la respuesta proinflamatoria inducida en las células epiteliales intestinales <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> (Romanin et al 2010)
<i>Lactobacillus plantarum</i> CIDCA83114	Alta potencia inhibitoria contra <i>Salmonella</i> spp y <i>Shigella</i> spp <i>in vitro</i> (Golowczyc et al 2008, Kakisu tesis doctoral 2010)  Inhibición de los efectos citotóxicos e invasivos de <i>E. coli</i> enterohemorrágica O157:H7 en células Hep-2 (Hugo et al 2008)
<i>Lactobacillus kefir</i> CIDCA8348	Inhibición de la invasión de <i>Salmonella entérica</i> en células Caco-2 (Golowczyc et al 2007)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> CIDCA 8221	Capacidad de crecer y acidificar la leche otorgando características organolépticas definidas al producto (Garrote Tesis doctoral 2000).

**Para mayor claridad de aquí en adelante se mencionaran las cepas escribiendo solo género y especie, evitando la sigla CIDCA y el número**

Los cultivos puros se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  en criotubos con leche al 12% como crioprotector. A partir de estos ceparios, los lactobacilos se crecieron en caldo De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (DIFCO, Detroit, USA) durante 24 horas a  $30^{\circ}\text{C}$ . Las levaduras se crecieron durante 24 horas a  $30^{\circ}\text{C}$  en caldo YPD:20g%Dextrosa Anedra, 20g% Triptona (DIFCO, Detroit, USA), 10g% Extracto de levadura (Biokard Diagnostic, Beauvais, France). *Lactococcus lactis* se creció durante 24 horas a  $30^{\circ}\text{C}$  en caldo 1.1.1:1g% Extracto de levadura (Biokard Diagnostic, Beauvais, France), 1g% Triptona (DIFCO, Detroit, USA), 1g% Lactosa (Mann Research Laboratories, NY) (Abraham *et al*, 1990). Los cultivos se conservaron refrigerados a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 4 días y se reactivaron antes de los experimentos mediante repiques al 1% en los medios indicados. La pureza de los cultivos se constató mediante tinción de Gram y por morfología de las colonias en agar MRS, YPD o 1.1.1 según corresponda.

Se utilizaron los gránulos de kefir CIDCA AGK1 caracterizados en el CIDCA (Garrote 2000). De estos gránulos se aislaron e identificaron los siguientes microorganismos *Lactococcus lactis* subps *lactis*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus kefirgranum* y *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces lipolytica*, y bacterias del género *Acetobacter*, *Geotrichum candidum*. El número promedio de microorganismos viables por gramo de gránulo de kefir CIDCA AGK1 es de  $3,6 \times 10^6$  lactococos,  $3,96 \times 10^8$  lactobacilos y  $9,30 \times 10^7$  levaduras (Garrote tesis doctoral 2000). La concentración de microorganismos viables (UFC/ml) de leche fermentada con gránulos AGK1 es:  $6,0 \times 10^9$  lactococos,  $3,3 \times 10^9$  lactobacilos y  $3,0 \times 10^6$  de levaduras (Garrote tesis doctoral 2000).

## 2-Estudio del antagonismo entre cepas

Se evaluó el antagonismo de las cepas descritas en la tabla 1. Para ello se sembró en profundidad cada microorganismo en el medio correspondiente (agar MRS, YGC o 1.1.1) y se realizó una estría de cada uno de los restantes en superficie. Las placas se incubaron a 30°C durante 48 hs y se evaluó la presencia de halo de inhibición de crecimiento alrededor de la estría.

## 3-Estudio de sinergismo entre cepas

Se estudió la cinética de crecimiento de cada una de las cepas puras y la estimulación del crecimiento de las levaduras por lactobacilos y lactococos, estudiando diferentes combinaciones, en leche UHT. Para realizar estos experimentos, los cultivos de las bacterias se crecieron en los medios correspondientes, se ajustaron a DO=1 y se centrifugaron a 10000 g durante 15 min. Los pellets se resuspendieron en leche UHT y se adicionaron en proporción 1:1 *Kluyveromyces marxianus* o *Saccharomyces cerevisiae*. Se incubaron durante 48 horas a 30°C tomándose muestras cada 1 hora para realizar el recuento de bacterias y levaduras en medios diferenciales.

Las muestras se diluyeron convenientemente en triptona 0,1% y se sembraron en placas de agar MRS para los lactobacilos, agar YGC para las levaduras y agar 1.1.1 para Lactococos. Se expresaron los resultados en unidades formadoras de colonia por ml de cultivo (UFC/ml).

De igual manera se estudió la estimulación del crecimiento de lactobacilos y lactococos por levaduras

#### **4-Obtención de la mezcla microbiana**

Los cultivos de cada uno de los microorganismos descritos en la tabla 1 y crecidos como se indica en el punto 1, se centrifugaron a 10000 g durante 15 min descartando el sobrenadante, se lavaron 2 veces con PBS (NaCl 9 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,795 g/l, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0114 g/l, pH 7,2-7,4) y se juntaron en un mismo tubo resuspendiendo todos los pellets en 10 ml de leche UHT o en medio TSB (Tryptic Soy Broth, Biokard Diagnostic, Beauvais, Francia) según el experimento. La concentración final en la mezcla fue de 10<sup>9</sup> UFC/ml de bacterias y 10<sup>6</sup> UFC/ml de levaduras.

#### **5-Evaluación de la capacidad acidificante de la mezcla microbiana.**

Se estudió la cinética de acidificación de los cultivos puros de bacterias y levaduras y de la mezcla microbiana en leche UHT. Las bacterias se inocularon en una concentración inicial de 10<sup>9</sup> UFC/ml y la concentración inicial de levaduras fue de 10<sup>6</sup> UFC/ml (composición de la mezcla microbiana) e idéntica concentración para las cepas aisladas. Se incubó durante 36 horas a 30°C y se tomaron alícuotas cada 1 hora y se midió el pH utilizando un phmetro Hanna pH 211 Microprocessor pH Meter con electrodo de vidrio HI 1330B. Se expresaron los datos obtenidos como pH en función del tiempo de incubación.

#### **6-Determinación del contenido de ácidos orgánicos.**

Se determinó el contenido de ácidos orgánicos (Ac. láctico, Ac. Acético), mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC). Para la determinación de ácidos se utilizó una columna de

intercambio iónico AMINEX HPX-87H (Biorad Labs) y un detector UV-visible (Waterstm 996, Millipore Corporation). La identificación de los ácidos se realizó a partir de la comparación de los tiempos de retención con soluciones estándar de ácidos (Sigma,USA). La longitud de onda seleccionada en base a los espectros de los ácidos a evaluar fue 214nm. Las muestras utilizadas corresponden a los sobrenadantes extraídos de cultivos de la mezcla microbiana incubada en leche UHT durante 24 horas a 30°C y sus cepas aisladas (*Lb. plantarum* y *Lb kefir*, *Lc. lactis*, *S. cerevisiae* y *S. cerevisiae*) cultivadas en iguales condiciones. Los cultivos microbianos se centrifugaron 5 min a 10000 g y el sobrenadante obtenido se filtró a través de una membrana de celulosa de 0,45 µm. Finalmente se colocaron, dentro de un vial, 0,5 ml de sobrenadante y 0,5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,009 N (fase móvil). Se realizaron curvas de calibración con ácido láctico, ácido acético, ácido propiónico, ácido fórmico y ácido cítrico mediante las cuales se calcularon las concentraciones de los ácidos presentes en las muestras que se expresaron como %v/v. Las soluciones estándar de ácidos se prepararon con reactivos de calidad HPLC (Sigma Chemical Co).

## 7- Determinación del contenido de etanol

Se determinó el contenido de etanol mediante "head-space" por cromatografía de gases. Se colocó 1ml de cada una de las leches fermentadas por la mezcla microbiana y gránulos de kefir AGK1, junto con 1ml de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saturado y 1ml de n-propanol 10/00 como estándar interno en un vial de 5 ml. Se sellaron los viales y se llevaron a baño de temperatura constante a 60°C durante 15 minutos. Se inyectaron 200 µl en un cromatógrafo Varian con columna capilar a 50°C y la temperatura de inyección fue de 170°C. Se utilizó un detector FID conectado a un integrador. Siendo

nitrógeno el gas portador. La curva de calibración se realizó en un rango de 0 a 5 ‰ v/v, con estándar de etanol calidad HPLC

## 8-Ensayo de inhibición de *Shigella*

Se estudió el efecto inhibitorio de la mezcla microbiana sobre *Shigella sonnei*. Un cultivo *over-night* de *Shigella sonnei* con aproximadamente  $10^8$  UFC/ml se centrifugó a 3000 g durante 15 min, y los pellets se suspendieron a un volumen igual de caldo tripteína-soya (TSB). Por otro lado 10ml de la mezcla microbiana en TSB se adicionaron a 10 ml de *Shigella* en TSB (1:1). Ambas muestras se incubaron a 37 ° C con agitación a 180 rpm. Se realizó un recuento de *Shigella* en placa a diferentes intervalos de tiempo (3, 8, 24, 48 hs) en agar nutritivo. Como controles se utilizó un cultivo de *Shigella* en TSB.

## Resultados y Discusión

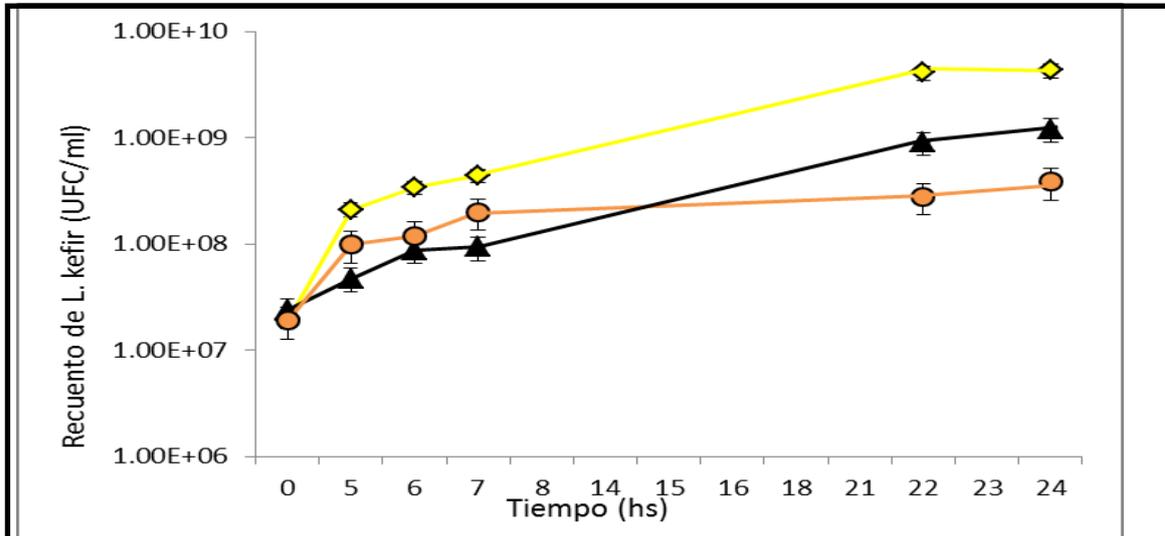
### Estudio del antagonismo entre cepas.

Se evaluó el antagonismo de las cepas que constituyen la mezcla microbiana. Para ello se sembraron en profundidad en agar MRS las cepas de *Lb kefir* CIDCA 8348, *Lb plantarum* CIDCA 83114 y *Lc. lactis subsp lactis* CIDCA 8221 independientemente. Luego se procedió a realizar una estría de las levaduras (*k. marxianus* CIDCA 8154, *S. cerevisiae* CIDCA 8112) y las bacterias lácticas no sembradas en profundidad. En todos los casos se observó que el crecimiento de la pátina fue uniforme sin observarse halo de inhibición en la cercanía de la estría. A su vez no se observó limitación del crecimiento en las estrías, el mismo fue uniforme y continuo. Por tanto puede deducirse que no hubo antagonismo entre cepas.

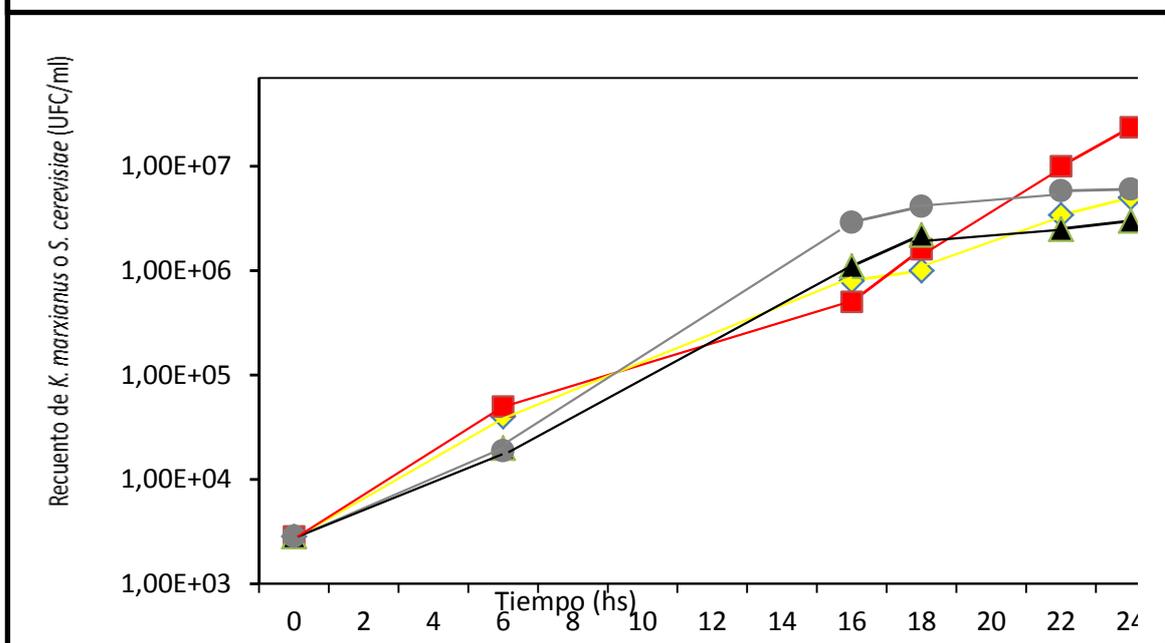
### Estudios de sinergismo entre cepas. Evaluación del crecimiento en conjunto por recuento de microorganismos viables

Se estudió el crecimiento de *Lb kefir*, *Lc lactis subsp lactis* y *Lb plantarum* en forma aislada y en presencia de las levaduras *K. marxianus* y *S. cerevisiae*. En la Figura 1A se observa que el crecimiento de *Lb kefir* se ve estimulado por la levadura *S. cerevisiae* resultando en un aumento de 1 log. Esto podría deberse a que *S. cerevisiae* produce metabolitos que le son útiles al *Lb. kefir* para su crecimiento. Sin embargo *K. marxianus* no afecta significativamente el crecimiento de este lactobacilo. En la figura 1B se observa la cinética de crecimiento de las levaduras en presencia de *Lb. kefir*. El

crecimiento de *K. marxianus* aumentó levemente 0,5 log en presencia de *Lb. kefir*. *S. cerevisiae* se vio estimulada por *Lb. kefir*, obteniéndose también un incremento de aproximadamente 1 log al cabo de 24 horas respecto al crecimiento en forma aislada.

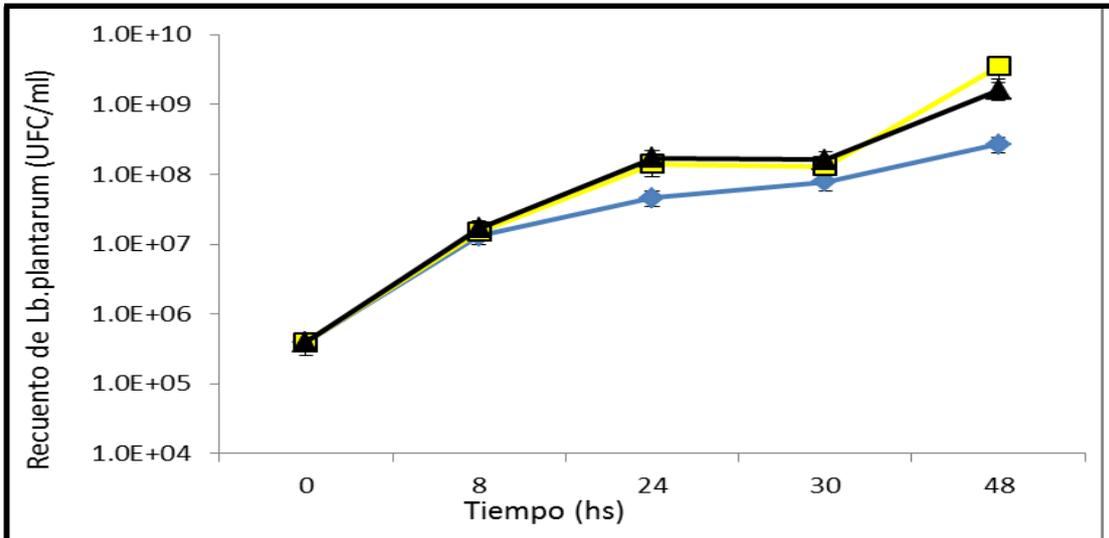


**Figura1A:** Cinética de crecimiento de cultivos puros y co-cultivos en leche Crecimiento de *Lb kefir* CIDCA8348 en leche como cultivo puro -○-, y en co-cultivo con *S. cerevisiae* CIDCA8154 ▲ o *S. cerevisiae* CIDCA 8112 -◇-.

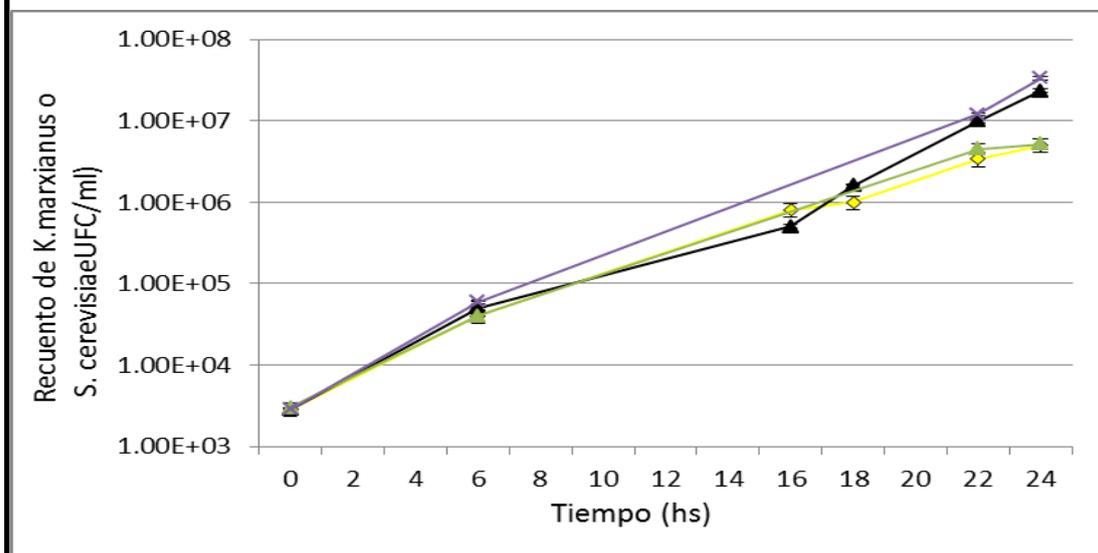


**Figura 1B:** Cinética de crecimiento de cultivos puros y co-cultivos en leche. Crecimiento de *S. cerevisiae* CIDCA8154 -▲- y *S. cerevisiae* CIDCA 8112 -◇- en leche. Crecimiento de *S. cerevisiae* CIDCA8154 en co-cultivo con *Lb kefir* CIDCA8348 -●- y crecimiento de *S. cerevisiae* CIDCA 8112 en co-cultivo con *Lb kefir* -■-.

La cepa de *Lb. plantarum* (Figura 2A) fue levemente estimulada en su crecimiento por la presencia de ambas levaduras incrementándose las UFC/ml en aproximadamente 1 log al cabo de 48 horas de co-incubación.



**Figura 2A:** Cinética de crecimiento de cultivos puros y co-cultivos en leche. Crecimiento de *Lb. plantarum* CIDCA83114 como cultivo puro  $\blacklozenge$ , y en co-cultivo con *S. cerevisiae* CIDCA8154  $\blacktriangle$  - o *S. cerevisiae* CIDCA 8112  $\blacksquare$  -.



**Figura 2B:** Cinética de crecimiento de cultivos puros y co-cultivos en leche Crecimiento de *S. cerevisiae* CIDCA8154-  $\blacktriangle$  y *S. cerevisiae* CIDCA 8112 -  $\blacklozenge$  como cultivo puro, y *S. cerevisiae* CIDCA8154 en co-cultivo con *Lb. plantarum* CIDCA83114 -  $\blackcross$  - *S. cerevisiae* CIDCA 8112 en co-cultivo con *Lb. plantarum* -  $\blacktriangle$  -

EL crecimiento de las levaduras en presencia de *Lb. plantarum* no fue afectadas significativamente (Figura 2B) respecto al control. En la tabla 1 se muestra la cinética de crecimiento de *Lc. lactis* en presencia de las levaduras. El crecimiento de *Lc. lactis* no se ve estimulado por la presencia de *K. marxianus* y *S. cerevisiae* (tabla2).

Tiempo (hs)	<i>K. marxianus</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lc. lactis</i> ( <i>Kluyveromyces</i> )	<i>Lc. lactis</i> ( <i>Saccharomyces</i> )	<i>K.marxianus</i> ( <i>lactococo</i> )	<i>S.cerevisiae</i> ( <i>lactococo</i> )
0	4.50E+02	2.00E+02	3.50E+04	3.50E+04	3.50E+04	4.50E+02	2.00E+02
24	3.00E+05	2.00E+04	1.70E+08	2.35E+08	2.00E+08	4.00E+05	3.00E+04
48	8.50E+05	2.00E+06	2.90E+09	2.80E+09	5.40E+09	9.50E+05	1.00E+06

**Tabla 2:** Crecimiento expresado en UFC/ml de cultivos puros de *K. marxianus*, *S. cerevisiae* y *Lc. lactis*, y de co-cultivos en leche indicando el recuento de *Lc. lactis* en presencia de las (levaduras) o el recuento de las levaduras en presencia de (lactococo).

Durante el estudio del comportamiento de ambas levaduras en co-cultivo con *Lc. lactis*, no se observó cambio en el de crecimiento de la levaduras como se muestra en las Tabla2.

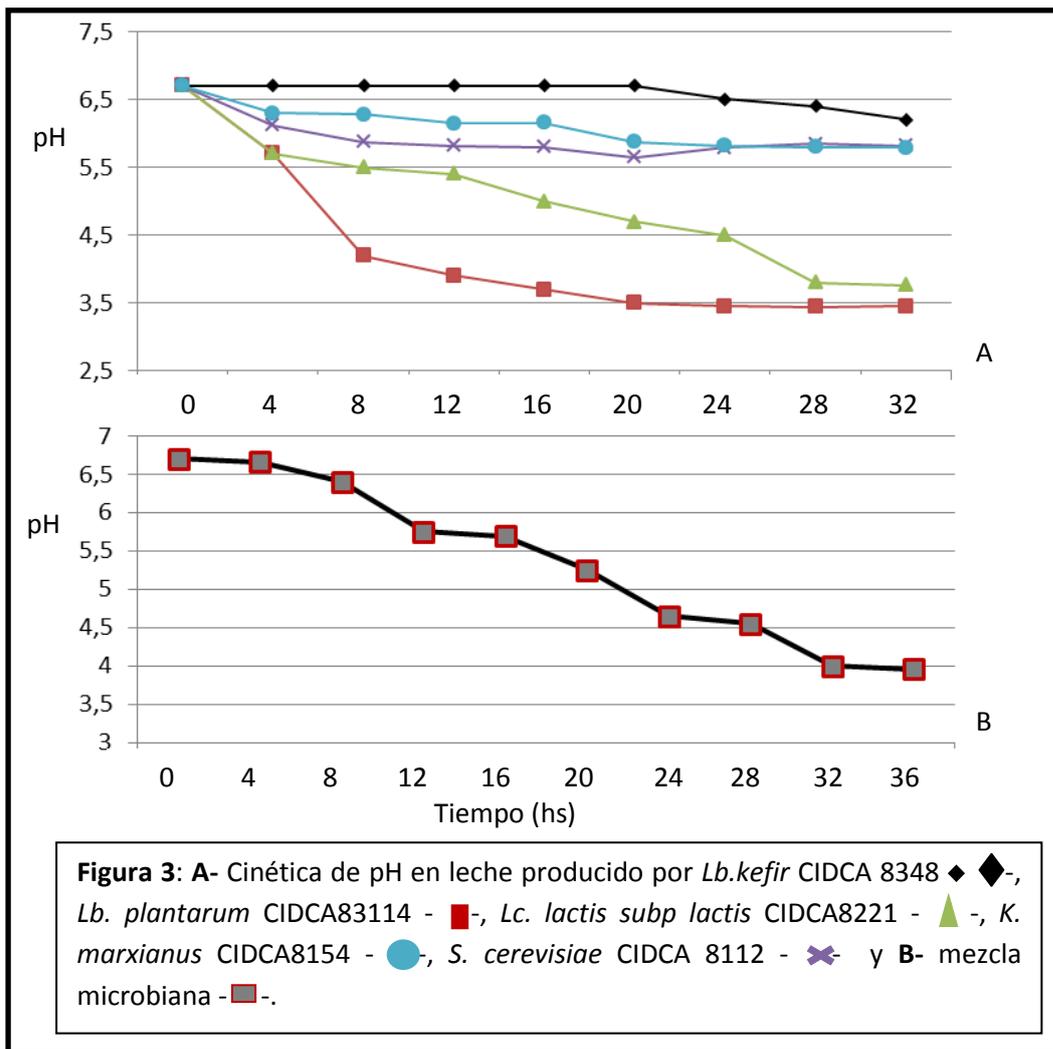
Los resultados obtenidos indican que no existe antagonismo entre las cepas microbianas seleccionadas y se observa un pequeño estímulo del crecimiento de los lactobacilos por la cepa de *S. cerevisiae* y *K. marxianus*. Teniendo en cuenta, principalmente, la ausencia de antagonismo, se formuló una mezcla microbiana como se indicó en materiales y métodos, tratando de respetar la proporción de microorganismos encontrada en la leche fermentada con gránulos de kefir.

### **Evaluación de la capacidad acidificante de la mezcla microbiana.**

En la figura 3A se observa que *Lb. kefir*, *S. cerevisiae* y *K. marxianus* producen un leve descenso del pH al cabo de 32 horas de incubación a 30°C. Sin embargo la cinética de acidificación de *Lc.*

*lactis* y *Lb. plantarum* en leche muestra un rápido descenso del pH. De la pendiente de estas curvas puede deducirse que la velocidad de acidificación de *Lb. plantarum* es mucho mayor para el resto de los microorganismos.

En la Figura 3B se observa el descenso del pH causado por la mezcla microbiana. La mezcla microbiana luego de la incubación a 30°C durante 32 hs llegó a pH 4, pH similar al obtenido con *Lb. plantarum* en forma aislada que fue de 3,5 en concordancia con Wu et al, 2009 quienes encontraron valores de pH entre 3,37 y 3,94 para diferentes leches fermentadas con *Lb. casei*, *Lb. helveticus*, *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei*, *Lb. kefiranofaciens* y *Lb. fermentum*.



Sin embargo el pH final es algo mayor para la mezcla microbiana que para la cepa pura de *Lb. plantarum*, lo cual podría deberse a los efectos de las cepas restantes sobre el pH. la capacidad de acidificación de *Lb. plantarum* no se ve influenciada por el resto de los microorganismos presentes en la mezcla microbiana. Cuando se estudió el crecimiento de la mezcla microbiana en leche se observó que todas las cepas que la constituyen mantienen su viabilidad y la capacidad de crecer siendo las que mayor crecimiento presentan el *Lb. plantarum* y *Lc. lactis* (tabla 2).

En la tabla 3 se observa el crecimiento de cada una de las cepas en la mezcla microbiana luego de crecer la mezcla durante 26 horas a 30°C. El recuento final de bacterias y levaduras se ve incrementado, lo cual indica la capacidad de las cepas de mantener su viabilidad y su capacidad de crecimiento. Los valores finales de recuento son similares a los obtenidos en los ensayos anteriores, aproximadamente  $10^9$  UFC/ml para los lactobacilos y lactococo y  $10^7$  UFC/ml para las levaduras.

<b>Tabla 3:</b> Crecimiento de cada una de las cepas en función del tiempo de fermentación de la leche con la mezcla microbiana					
<b>TIEMPO(h)</b>	<b><i>Lb. plantarum</i> (UFC/ml)</b>	<b><i>Lb. kefir</i> (UFC/ml)</b>	<b><i>Lc. lactis</i> (UFC/ml)</b>	<b><i>S. cerevisiae</i> (UFC/ml)</b>	<b><i>K marxianus</i> (UFC/ml)</b>
<b>0</b>	5.50E+08	5.40E+08	5.70E+08	1.40E+05	1.37E+05
<b>6</b>	8.10E+08	9.00E+08	1.05E+09	5.50E+06	5.82E+06
<b>26</b>	1.10E+09	6.00E+09	8.60E+09	1.00E+07	1.35E+07

Como era de esperar las bacterias lácticas inoculadas en altas concentraciones (aproximadamente  $10^8$ - $10^9$  UFC/ml), presentaron un leve crecimiento al cabo de 26 horas de incubación ya que se encontraban desde el momento del inóculo en la máxima

concentración detectada en el kefir. Sin embargo, las levaduras inoculadas en baja concentración ( $1 \times 10^5$  UFC/ml) mostraron un crecimiento de aproximadamente 2 log. Al final de la fermentación con la mezcla microbiana, la composición de la leche fermentada presenta una concentración similar de bacterias lácticas a la observada en el kefir y una concentración 10 veces mayor de levaduras con respecto al kefir.

### Determinación del contenido de ácidos orgánicos.

Se evaluó el contenido de ácidos orgánicos mediante cromatografía HPLC. Se inyectaron muestras de sobrenadantes obtenidos de la fermentación láctica de *Lb kefir* CIDCA8348, *Lb. plantarum* CIDCA 83114, *Lc. lactis subp lactis* CIDCA 8221, *K. marxianus* CIDCA 8154, *S. cerevisiae* CIDCA 8112 y de la mezcla microbiana, en igual concentración relativa. Por otro lado se analizaron patrones de ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico, ácido cítrico y ácido propiónico evaluándose su tiempo de retención (tabla 3) y realizándose curvas de calibración para cada ácido patrón a fin de cuantificar los mismos en las muestras (Figura 4).

**Tabla 4.** Tiempo de retención de los ácidos orgánicos puros calidad HPLC

<b>Ácidos orgánicos patrón</b>	<b>Tiempos de retención (min)</b>
ácido láctico	14,330
ácido acético	16,995
ácido fórmico	15,636
ácido cítrico	9,194
ácido propiónico	19,818

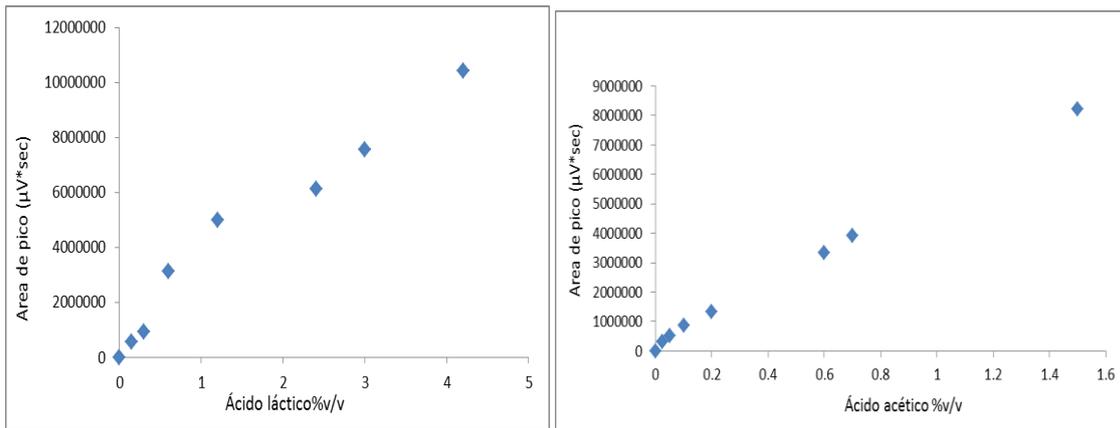


Figura4: Curva de calibración con estándares de ácido láctico y ácido acético.

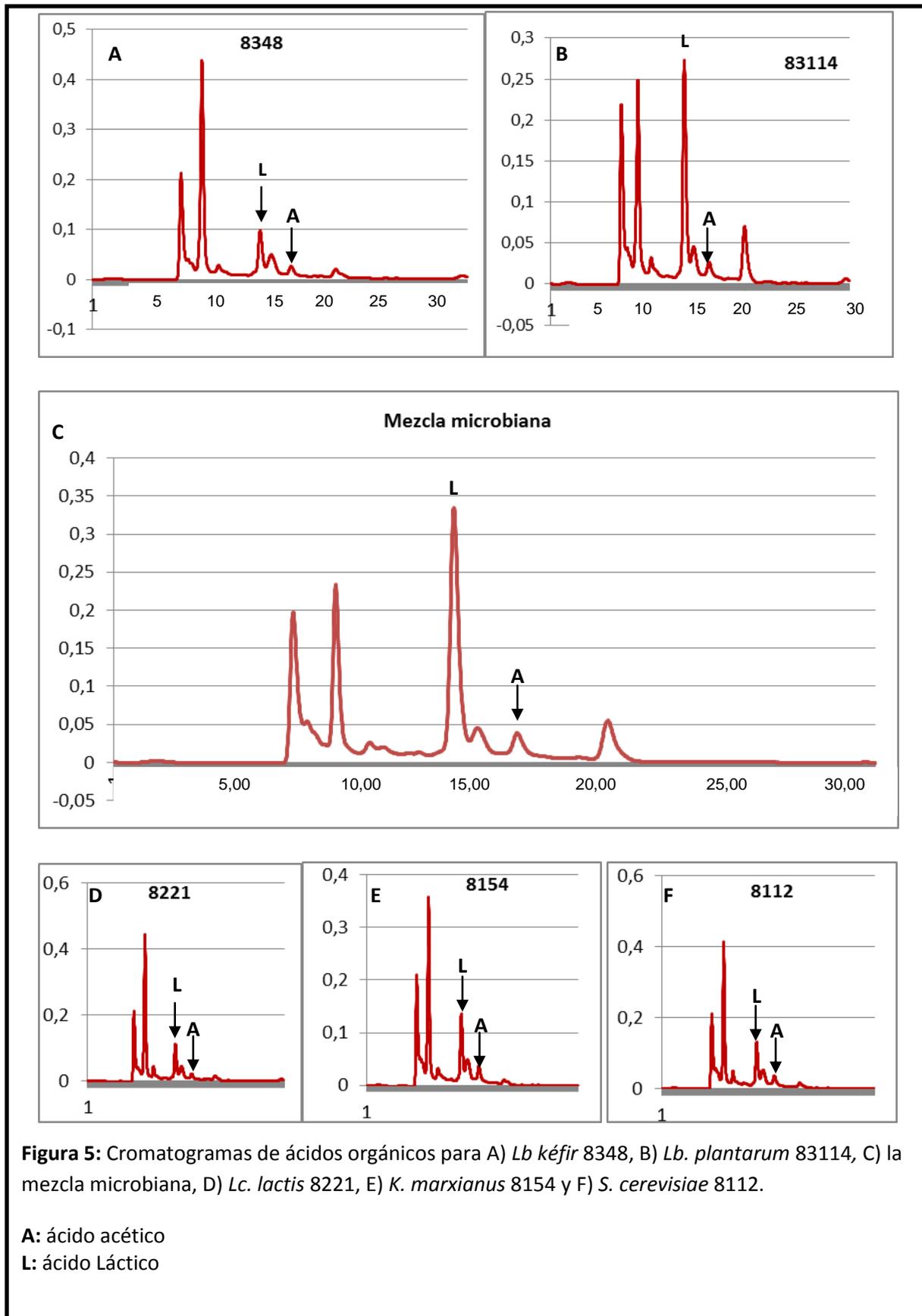
Como puede verse en la Figura 5 ninguna de las muestras se detectó ácido fórmico, ácido cítrico y ácido propiónico.

Respecto al ácido acético, se observó la presencia del mismo en todos los cultivos siendo predominante en la muestra de sobrenadante de leche fermentada por *K. marxianus* y *S. cerevisiae*, 0,35 y 0,25% respectivamente. A su vez, la producción fue aún mayor en la mezcla microbiana alcanzando una concentración de 0,60%.

Si observamos la producción de ácido láctico, a pesar de estar presente en todas las muestras en un rango del 0,5 al 1,5 %, vemos que la correspondiente a *Lb. plantarum* presenta la mayor cantidad, alrededor del 2,7%. Sin embargo la mezcla microbiana presentó una concentración de ácido láctico de 3,35% (Tabla5). Puede observarse en la tabla 4 que el contenido de ácido acético y ácido láctico en la leche fermentada por la mezcla microbiana es mayor al de la leche fermentada con gránulos de Kefir AGK1 (Garrote 2000). Esta diferencia probablemente se deba a que en el producto fermentado con la mezcla microbiana presenta una concentración de levaduras diez veces mayor a la del kefir como se indicó anteriormente.

A partir de estos resultados podemos inferir que todos los microorganismos estudiados producen ácido láctico y ácido acético,

en concordancia con lo observado por Tang et al, 2007, Pereira et al, 2010 quienes observaron la presencia de ácido láctico y ácido acético en quesos o en leches fermentadas por las especies utilizadas en la mezcla microbiana (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactobacillus brevis*, and *Lactobacillus plantarum*). Rosslund et al 2005 observaron un descenso rápido del pH por *Lb. casei* durante las primeras horas de fermentación que coincide con la producción de ácido láctico. Otros autores han encontrado valores de pH del orden de 4 para kefir (Bottazzi et al, 1994). Los ácidos acético y láctico son muy importantes ya que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas y por tanto son de mucha relevancia al momento de evaluar los efectos probióticos de los microorganismos (Nout et al, 1989, Svanberg et al 1992, Kakisu et al, 2007). Rosslund et al (2005) observaron que el ácido láctico se produce a velocidades diferentes según se tratara de lactobacilos o lactococos y las concentraciones finales varían mucho. Estos autores demuestran que un punto crucial en la rápida reducción del pH en las primeras horas de fermentación coincide con la producción de ácido láctico. También observaron que se producen cantidades moderadas de ácido acético durante la fermentación pero en concentración final mucho menor que la de ácido láctico. En concordancia con Rosslund et al (2005), nuestro estudio mostró un mayor contenido de ácido láctico que de ácido acético y en todos los casos la capacidad de producción de ambos ácidos se mantuvo en la mezcla microbiana.



**Tabla 5:** Porcentaje de ácido acético y ácido láctico producido por los diferentes microorganismos, la mezcla microbiana y en el kefir

<b>Microorganismos</b>	<b>Ácido acético (%)</b>	<b>Ácido Láctico (%)</b>
<i>K. marxianus</i>	0,35	1,32
<i>S. cerevisiae</i>	0,25	1,41
<i>Lb. kefir</i>	0,18	1,0
<i>Lb. plantarum</i>	0,12	2,70
<i>Lc. lactis subsp lactis</i>	0,09	1,02
Mezcla microbiana	0,60	3,35
Kefir con gránulo AGK1 (Garrote tesis doctoral 2000)	0,10	2,10

Como puede verse en la tabla 5, *Lb. kefir* produce un bajo contenido de ácido acético esto podría deberse a que en condiciones de limitación de hexosas, la síntesis de ácido acético puede llegar a ser dominante, de forma que un microorganismo homofermentativo puede mostrarse como heterofermentativo produciendo ácido acético, etanol y ácido fórmico como productos finales del metabolismo (Thomas et al., 1979 y de Vries et al., 1970).

### Determinación del contenido de etanol

Se evaluó el contenido de etanol por cromatografía gaseosa en la leche fermentada por la mezcla microbiana y se la comparó con kefir. Se estudiaron dos temperaturas de incubación 37°C y 30°C durante 24 horas. Los resultados se expresan en %v/v de etanol. El contenido de etanol para la mezcla microbiana incubada a 37°C fue sustancialmente mayor que cuando se incubó a 30°C. Se obtuvo un resultado similar para el kefir, siendo mayor la concentración de etanol cuando fue incubado a 37°C que a 30°C. Sin embargo la

producción de etanol a cada temperatura fue similar para ambas muestras (Tabla 6). Este estudio indica que la temperatura de incubación influye notablemente en la producción de etanol en ambos casos. Otros autores detallan el contenido de etanol y otros compuestos volátiles producidos por el yogurt (Papapostolou et al ,2008 y Gusel-seydim et al, 2000, Chen review 2010).

Existen diferencias acerca del contenido de etanol en el kefir que van desde el 0 al 2%. Saloff-Coste (1996) reportó entre 0,01 y 0,2% de etanol en kefir, mientras que Lin (1999) reportó un contenido de etanol de 0,17 a 0,25% en kefir de Taiwan.

**Tabla 6:** Contenido de etanol de leches fermentadas por la mezcla microbiana y por gránulo de kefir CIDCA AGK1 incubadas a 30°C o 37°C.

Muestra	Temperatura de incubación (°C)	Etanol (%v/v)
Kefir AGK1	37°C	0,061±0,001
	30°C	0,030±0,001
Mezcla microbiana	37°C	0,073±0,001
	30°C	0,033±0,001

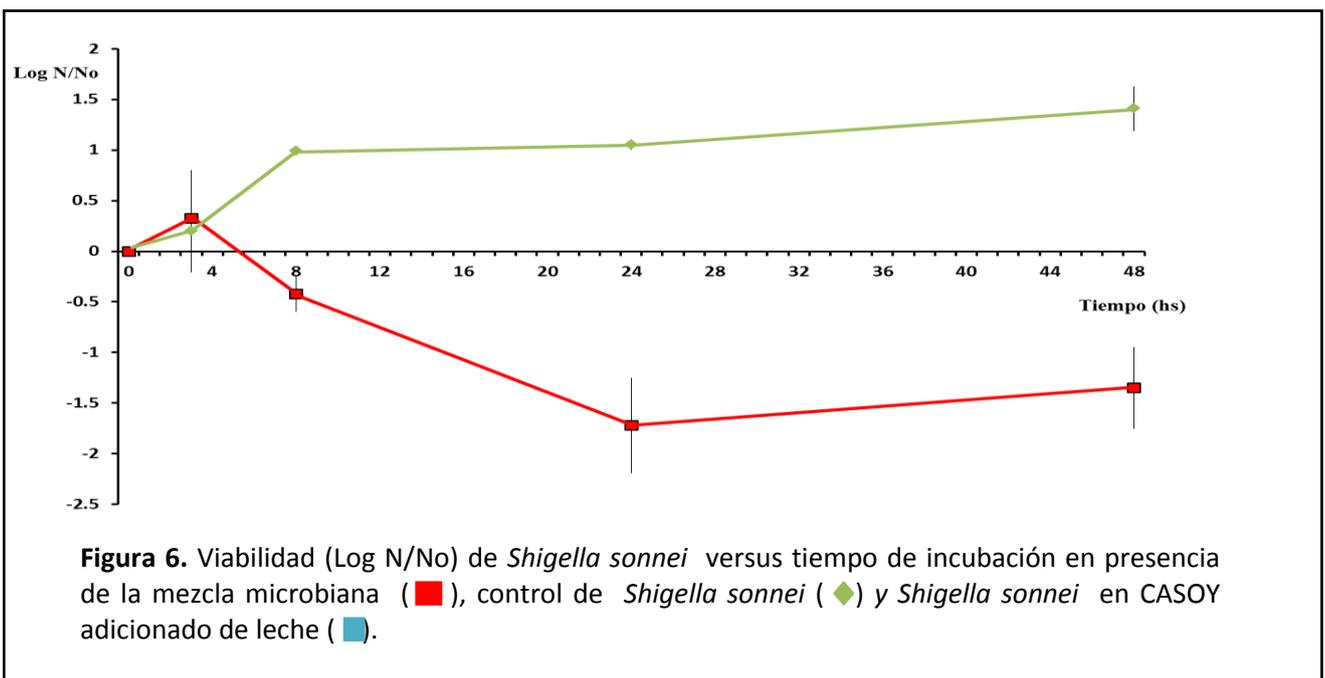
Los resultados se expresan en %v/v de tres determinaciones con su desviación estándar.

Los resultados descritos en este capítulo indican que la mezcla microbiana produce un leche fermentada con características semejante a la leche fermentada con gránulos de kefir tales como la concentración de microorganismos viable, el descenso del pH durante la fermentación, la producción de ácido láctico y acético y la baja concentración de etanol.

## Ensayo de inhibición de *Shigella*

A los efectos de conocer si la mezcla microbiana presenta características similares al Kefir en algunas de sus propiedades potencialmente probióticas, se realizó un ensayo de inhibición de *Shigella in vitro*.

La mezcla microbiana después de 24-48 h de incubación provocó una disminución 2 log en la viabilidad de *Shigella* (Figura 6). La misma figura muestra que el control no afectó la viabilidad de *Shigella*. Quintero Florez en su Tesis (2010) observó que la leche fermentada con gránulos de Kefir tiene un efecto bactericida frente a *Shigella*. Forestier et al (2001) observó que *Lactobacillus casei* subsp *rhamnosus* fue capaz de inhibir el crecimiento de *Shigella flexneri in vitro*. Sin embargo a diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo, Forestier observó que el nivel de bacterias viables se mantuvo constante, lo que indica que la *Shigella* fue inhibida en su crecimiento pero mantuvo su viabilidad. Nuestros resultados concuerdan con lo obtenido por Abo Amer (2007) quien observó la muerte de *Shigella in vitro* por sobrenadantes de diferentes cepas de *Lactobacillus acidophilus*.



El efecto bactericida de la mezcla microbiana sobre *Shigella* puede atribuirse a la presencia de ácidos, ya que se observó una disminución del pH (6,0 a 5,0) durante las primeras 24 h cuando *Shigella* se incubó con la mezcla microbiana en comparación con los controles. Por otro lado, cuando *Shigella* fue crecida en TBS acidificado a pH 5,0 con ácido láctico se observó una disminución de 4 log en la viabilidad en un plazo de 24 h de incubación. Como observamos en resultados anteriores, la mezcla microbiana produce ácido láctico y ácido acético los cuales podrían ser los responsables de la inhibición de *Shigella*. En este sentido Wen-Hsin et al (2007) observó que diferentes cepas de *Lactobacillus fermentum* inhibieron el crecimiento de *E. coli*, *Salmonella* spp, *Shigella sonnei* y que dicha inhibición estaba relacionada con la producción de ácidos orgánicos ya que cuando neutralizaba los sobrenadantes a pH 7, la actividad inhibitoria era insignificante. Varios autores reportan que existe un grupo de compuestos inhibitorios producidos por los probióticos, estos son ácido láctico, ácidos volátiles y bacteriocinas (Fuller, 1989 y Tagg 1976). Estudios *in vitro* realizados por Bhatia et al (1989) y Michetti et al (1999) propusieron que la producción de ácido láctico por *Lb. acidophilus* era responsable de la inhibición de patógenos gastrointestinales. En concordancia con los resultados obtenidos por otros autores también observamos la producción de ácidos por la mezcla microbiana (tabla 5), los cuales podrías ser los responsables de la inhibición de *Shigella*.

## Conclusiones

- ❖ Existe un pequeño estímulo del crecimiento de *Lb. plantarum* y *Lb. kefir* cuando son co-incubados con las levaduras *K. marxianus* y *S. cerevisiae*.
- ❖ No se encontró antagonismo entre los microorganismos.
- ❖ Se formuló una mezcla microbiana con microorganismos aislados de kefir que mantiene su viabilidad y acidifica la leche hasta un pH de 4.
- ❖ La mezcla microbiana produce ácido acético y ácido láctico durante la fermentación de la leche en concentración mayor a las obtenidas en la leche fermentada con gránulos de kefir.
- ❖ El contenido de etanol de la mezcla microbiana fue del mismo orden del obtenido para el kefir, aproximadamente 0,33%v/v.
- ❖ La mezcla microbiana ejerce un efecto bactericida frente a *Shigella sonnei* luego de 24 horas de incubación.

# CAPÍTULO II

Efectos de la mezcla microbiana  
contra la invasión de *Shigella*  
*sonnei* y *Shigella flexneri*

## Introducción

Los microorganismos del género *Shigella* son bacilos gram-negativos, no móviles, no esporulados, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos entero-invasivos que provocan la destrucción inflamatoria del epitelio intestinal dando lugar a la disentería bacilar y a una recto-colitis aguda. Estas patologías pueden causar complicaciones letales, sobre todo en recién nacidos y niños pequeños en la mayoría de las zonas empobrecidas del planeta.

*Shigella* invade las células M de la mucosa intestinal, allí activa la inmunidad de mucosa y se internaliza en los macrófagos residentes, causando apoptosis y liberación de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1). Posteriormente *Shigella* invade a las células epiteliales a través del dominio basolateral. En este punto se induce una reorganización del citoesqueleto de las células formándose filopodios y *ruffles* que engloban al microorganismo y lo internalizan originando una vacuola fagocítica (Jennison A. V. y Verma N. K. 2004, Kohler H. et al. 2002, Philpott D.J., et al. 2000, Tran Van Nhieu G. et al. 2000). Luego la bacteria es liberada al citoplasma en el cual rápidamente se multiplica y simultáneamente las células liberan citoquinas proinflamatorias IL-18 e IL-1 $\alpha$ . Éstas son citoquinas pro-inflamatorias que tienen como resultado, respectivamente, la activación de la respuesta inmune innata y el reclutamiento de células polimorfo nucleares (PMN) que infiltran el sitio de infección y desestabilizan el epitelio. Dicha pérdida de integridad de la barrera epitelial ayuda a que más bacterias ingresen al espacio subepitelial y tengan acceso a la cara basolateral de las células epiteliales (Jennison A. V. y Verma N. K. 2004). Una vez que *Shigella* está libre para

interactuar con la cara basolateral de los enterocitos provoca su propia endocitosis tras inducir la polimerización local de actina en el sitio de contacto.

En los estudios de interacción de *Shigella* con las células epiteliales, a menudo se utilizan líneas de células epiteliales poco diferenciadas y no polarizadas, tales como HeLa (Sasonetti et al, 1986) o células Hep-2 (Day et al, 1981). Un paso adelante en esta metodología fue posible cuando se conoció que la gentamicina, antibiótico aminoglucósido, es incapaz de atravesar la membrana celular, y por lo tanto las bacterias que son capaces de entrar en las células huésped sobreviven el tratamiento antibiótico de una monocapa infectada, lo que permite determinar claramente el número de *Shigellas* internalizadas en las células. Otros autores han desarrollado ensayos de invasión en células epiteliales diferentes, Caco-2 (Moumier et al, 1992), HT-29 y células TC-7 (Sperandio et al 2008).

Hasta el momento poco se conoce respecto al efecto de los probióticos frente a *Shigella*. Tien et al (2006) demostraron que *Lb. casei* modula la respuesta pro-inflamatoria que induce *S. flexneri* luego de la invasión sobre células epiteliales Caco-2. Otros autores han demostrado que una mezcla de *Lb. casei* y *Lb. acidophilus* protegen a ratones albinos de la acción letal de *S. sonnei* (Nader et al, 1992).

Si bien se conocen muchos estudios respecto a los efectos probióticos de BAL y levaduras sobre diferentes enteropatógenos, se conocen pocas evidencias tanto *in vivo* como *in vitro* frente a *Shigella*. Por tanto en este trabajo de tesis se propone estudiar el efecto de la mezcla microbiana y sus cepas puras frente a la invasión de células Hep-2 por *S. sonnei* y *S. flexneri*.

## Objetivos

- ❖ Estudiar el efecto de la mezcla microbiana y sus cepas aisladas sobre la invasión de células Hep-2 por *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri*.

## Materiales y Métodos

### 1-Cepas Utilizadas

Se utilizaron los microorganismos aislados de kefir: *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114, *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348, *Lactococcus lactis subsp lactis* CIDCA 8221, *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 y *Saccharomyces cerevisiae* CIDCA 8112. Estas cepas se crecieron y conservaron como se indica en el capítulo 1.

En todos los casos los cultivos se centrifugaron a 10000 g durante 15 minutos y se lavaron 2 veces con PBS pH 7.2 y se resuspendieron en DMEM (Dulbecco modified Eagle's minimal essential médium, Gibco, Grand Island, N.Y., USA). Todas las suspensiones se ajustaron de manera de obtener una concentración de  $10^8$  UFC/ml para bacterias y  $10^6$  UFC/ml para levaduras.

### 2-Mezcla microbiana

Esta se obtuvo a partir de los cultivos de los 5 microorganismos anteriormente mencionados. Todas las cepas se centrifugaron a 10000 g durante 15 min, se lavaron 2 veces con PBS y se juntaron en un mismo tubo resuspendiéndolas en 10 ml de DMEM. De esta manera se obtuvo un recuento final de  $10^8$  UFC/ml de bacterias y  $10^6$  UFC/ml de levaduras.

### 3-Microorganismos patógenos

Se utilizaron 2 cepas de *Shigella* correspondientes a las especies *Shigella sonnei* 45 y *Shigella flexneri* 72 (aislados hospitalarios

provenientes del Hospital de Niños Sor Maria Ludovica de La Plata, previamente caracterizadas por pruebas bioquímicas y PCR). Ambas cepas se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  en sacarosa 0.6M y se reactivaron en medio líquido dos veces consecutivas antes de cada ensayo. Se crecieron en caldo tripticasa soya (TSB) (Biokard Diagnostic, Beauvais, France. Anexo I) durante 18 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación. Para la obtención de la suspensión a utilizar, las bacterias se crecieron como se describió anteriormente y se centrifugaron a 15000g durante 20 min, y se resuspendieron en DMEM (Anexo I). Se ajustó a  $\text{DO}_{600}=0,5$  de manera de obtener  $10^8$  UFC/ml.

#### **4-Línea celular eucariota y condición de cultivo**

Para el ensayo de invasión se utilizaron células Hep-2 cuyo origen corresponde a carcinoma de laringe humano (Toolan, 1954). Las células se cultivaron en placas de 24 fosas durante 48 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  en atmósfera controlada ( $\text{CO}_2$  5%, 95% aire, Estufa de cultivo) obteniéndose un monocapa confluyente (Anexo II). Se utilizó Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; GIBCO, BRL, Life Technologies Rockville, MD, USA) suplementado con suero fetal bovino (PAA Laboratoties, GmbH, Pasching, Austria) al 12%, con 1% de aminoácidos no esenciales (GIBCO, BRL, Life Technologies Rockville, MD, USA) y antibióticos (12 UI/ml de penicilina y 12  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomina).

#### **5-Estudio de la invasión de células Hep-2 por *Shigella sonnei* 45 y *Shigella flexneri* 72.**

Se estudió la capacidad de invasión de *Shigella sonnei* 45 y *Shigella flexneri* 72 sobre la línea celular Hep-2.

Para el ensayo de invasión se determinó el número de bacterias internalizadas por las células. La monocapa celular crecida en placas de 24 fosas se lavó con PBS pH 7,2 y se puso en contacto con 500  $\mu$ l de la suspensión conteniendo  $1 \times 10^8$  UFC/ml de *S. sonnei* 45 o *S. flexneri* 72. Las células se incubaron durante 2,5 horas a 37°C en atmósfera controlada (5% CO<sub>2</sub>, 95% aire) sin agitación. Luego se lavaron 3 veces con PBS, se agregaron 500  $\mu$ l de DMEM sin suplementar adicionado con gentamicina 100  $\mu$ g/ml para provocar la muerte de las bacterias no internalizadas, y se incubaron durante 1,5 horas en atmósfera controlada. Posteriormente, a los efectos de lisis de las células para contar las bacterias internalizadas, se adicionaron 500  $\mu$ l de agua bidestilada estéril y se incubó 1 hora a 37° C. Se tomó todo el volumen de la fosa, se realizaron diluciones seriadas en triptona 0.1%, se sembraron en agar nutritivo y luego se incubaron a 37°C en aerobiosis durante 24 horas para determinar el número de microorganismos viables. Los resultados se expresaron como UFC/ml de *Shigella*.

## **6-Efecto de bacterias y levaduras aisladas de kefir frente a la invasión de *S. sonnei* 45 y *S. flexneri* 72.**

### **6.1-Co-incubación**

A fin de determinar los efectos de cada una de las cepas aisladas sobre la invasión de las células Hep-2 por *Shigella*, se prepararon las cepas potencialmente probióticas como se mencionó en el punto 1 de este capítulo de manera que la concentración de bacterias y levaduras fue de  $1 \times 10^8$  UFC/ml y  $1 \times 10^6$  UFC/ml respectivamente, y se co-incubaron con cada una de las cepas de *Shigella* en concentración  $1 \times 10^8$  UFC/ml durante una hora a 37 ° C con agitación a 180 rpm. A

continuación, las suspensiones se centrifugaron (3000 g durante 15 min) y los pellets se resuspendieron en un volumen igual de DMEM. La placa de 24 fosas conteniendo la monocapa celular se lavó tres veces con PBS y se incubó durante 2,5 horas (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) con 500 µl/fosa de las mezclas anteriores. Transcurrido este tiempo, las monocapas celulares se lavaron cuatro veces con PBS y se agregaron 500 µl de DMEM con 100 µg / ml de gentamicina. Después de 1,5 horas de incubación (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) se lavaron con PBS y se incubaron (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) con agua destilada estéril durante una hora. El recuento de *Shigella* internalizada se realizó en Agar nutritivo. Los resultados se expresaron como UFC/ml de *Shigella* internalizada.

## 6.2-Pre-incubación

Se estudió el efecto de la pre-incubación de las células con cada una de las cepas potencialmente probióticas frente a la invasión de *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri*. Para ello la monocapa celular se lavó tres veces con PBS y se incubó durante 1 h con las bacterias lácticas (1x10<sup>8</sup>UFC/ml) y levaduras (1x10<sup>6</sup>UFC/ml) a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se lavaron 3 veces con PBS. Se agregaron 500 µl de suspensión de *Shigella* y se incubaron durante 2,5 horas. Después de este tiempo, las monocapas celulares se lavaron cuatro veces con PBS y se incubaron con DMEM con 100 µg/ml de gentamicina. Después de 1,5 horas de incubación (37 ° C, 5% de CO<sub>2</sub>) se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron (37 ° C, 5% CO<sub>2</sub>) con agua destilada estéril durante una hora. Los resultados se expresaron como UFC/ml de *Shigella* internalizada.

## **7-Efecto de la mezcla microbiana frente a la invasión de *S. sonnei* 45 y *S. flexneri* 72**

Se estudió el efecto de la pre-incubación de las células con diferentes concentraciones de la mezcla microbiana (diluciones 1/100 y 1/1000 de la mezcla formulada en el punto 2) frente a la invasión de *S. sonnei* 45 o *S. flexneri* 72. Para ello, la monocapa celular se lavó tres veces con PBS y se incubó durante 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 min con la mezcla microbiana a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, y continuó con el protocolo ya descrito en el punto anterior. Los resultados se expresaron como UFC/ml de *Shigella* internalizada.

## **8-Marcación fluorescente del citoesqueleto**

Se incubaron durante 48 horas las células Hep-2 en placas de 24 fosas conteniendo discos de vidrio de 1 cm<sup>2</sup> estériles (Asistente, Glaswarenfabrik Karl Hetch KG, Sondheim, Alemania). Sobre estas células se realizaron los ensayos de invasión con *S. sonnei* 45 y *S. flexneri* 72 luego de la pre-incubación de las mismas con la mezcla microbiana, según se describió anteriormente. Luego de la incubación, las células fueron lavadas tres veces con PBS y se procedió a realizar la coloración de actina empleando faloidina-FITC según se describe a continuación (Minnaard et al., 2007):

Se fijaron las células contenidas en las fosas con paraformaldehído 3 % (p/v) en buffer PBS durante 2 min.

Se desechó el paraformaldehído y enjuagó 3 veces las células con PBS. En este punto pueden conservarse las muestras a 4° C durante 2 días.

Se incubaron las células durante 10 min a temperatura ambiente en presencia de PBS-NH<sub>4</sub>Cl (50 mM). De esta forma se saturan las funciones aldehído libres.

Se permeabilizó la membrana celular con 0,5 ml de solución de Tritón X100 0.2 % (v/v) en PBS durante 4 min.

Se descartó la solución de Tritón e incubaron las células 2 veces con PBS durante 10 minutos.

Se incubaron las células durante 10 min con PBS-gelatina 0.2 % (v/v).

Se extrajo el PBS-gelatina completamente y se agregaron 20 µl de solución (5 µg/ml) de faloidina conjugada con FITC (SIGMA, Inc. St. Louis, MO, USA) preparada en PBS-gelatina.

Se incubaron las células con la faloidina durante 45 min en cámara húmeda y al abrigo de la luz.

Se lavaron las células 3 veces con PBS e incubaron durante 10 min en PBS-gelatina.

Se extrajeron los vidrios, se escurrieron y se montaron invertidos sobre 2 µl de glicerol 50 % (v/v) azida de sodio 0.1 % (p/v) en PBS.

Se observó con microscopio de fluorescencia.

## 9-Microscopía electrónica de barrido (MEB)

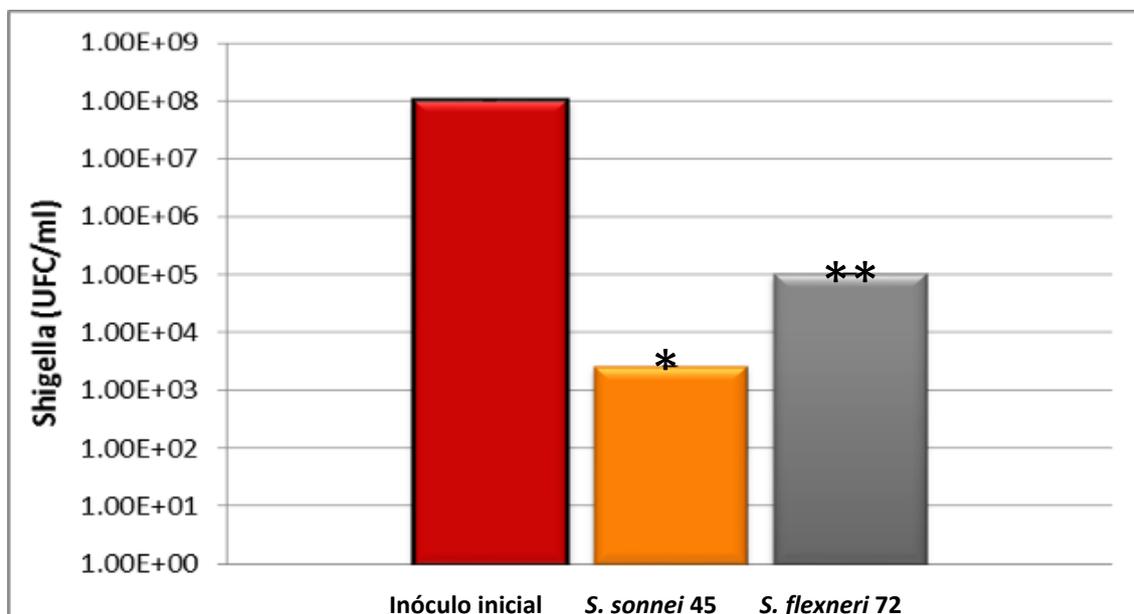
Para poder observar los efectos de *Shigella* sobre la estructura de las células Hep-2 y su capacidad de invasión, y los efectos luego de la pre-incubación con la mezcla microbiana, se crecieron las células sobre vidrios de 1 cm<sup>2</sup> (Asistente, Glaswarenfabrik Karl Hetch KG, Sondheim, Alemania) por fosa en placas de 24 fosas. Se realizó la pre-incubación de las células con la mezcla microbiana como se describió anteriormente. Se realizaron controles de células sin infectar y células infectadas con *Shigella*. Una vez concluido el

período de invasión y luego de la incubación con gentamicina, las células se lavaron una vez con PBS y luego se lavaron tres veces con PBS adicionado con glutaraldehído al 0,25% v/v. Las muestras se fijaron con glutaraldehído 2,5% (v/v) durante 3 horas a 4 ° C. Se deshidrataron con soluciones de concentración creciente de etanol (20, 50, 70, 90 y 100 %) en PBS. Por último, se realizó una deshidratación para evitar los efectos adversos de las fuerzas de tensión superficial mediante el método del punto crítico. En el punto crítico, el líquido remanente pasa directamente a la fase gaseosa evitándose así las fuerzas de deformación. Los vidrios se colocaron en isoamilacetato y se secaron con CO<sub>2</sub> líquido (BAITEC, modelo CP30). Las muestras se colocaron en tacos metálicos y se recubrieron con una película de oro durante 10 minutos al vacío (Jeol Fine Coat Sputter JFC-1100). Se observaron las muestras al microscopio electrónico de barrido (Jeol JSM-T100, Joel Ltd., Akishima Tokio, Japan).

## Resultados y Discusión

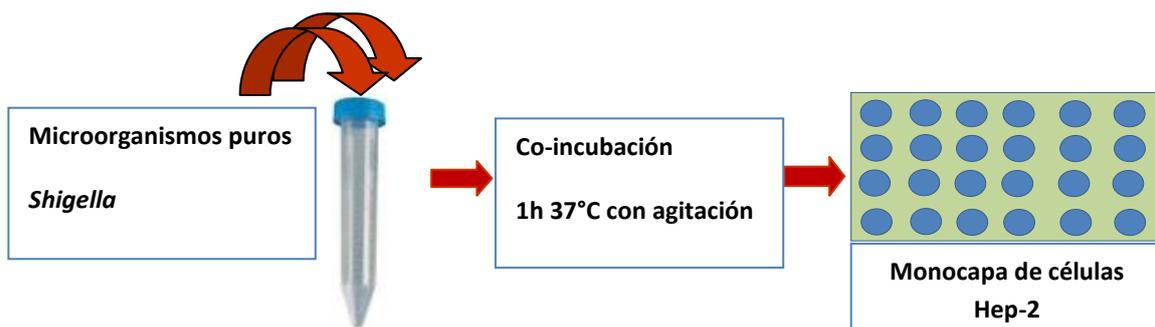
### Estudio de la invasión de células Hep-2 por *S. flexneri* 72 y *S. sonnei* 45.

Se estudió la capacidad de invasión de células Hep-2 por *S. sonnei* 45 y *S. flexneri* 72. Se partió de un inóculo de  $1 \times 10^8$  UFC/ml de *Shigella* y se realizó un recuento de las bacterias internalizadas como se indicó anteriormente. En la figura 1 se muestra que *S. sonnei* invade las células Hep-2 a razón de  $2 \times 10^3$  UFC/ml (lo que corresponde a un 0,0026% respecto al inóculo inicial), mientras que el número de *S. flexneri* internalizadas en las células Hep-2 fue de 0,022% de su inóculo inicial. Por lo tanto, la internalización de *S. flexneri* fue significativamente mayor que *S. sonnei* ( $p < 0,05$ ).



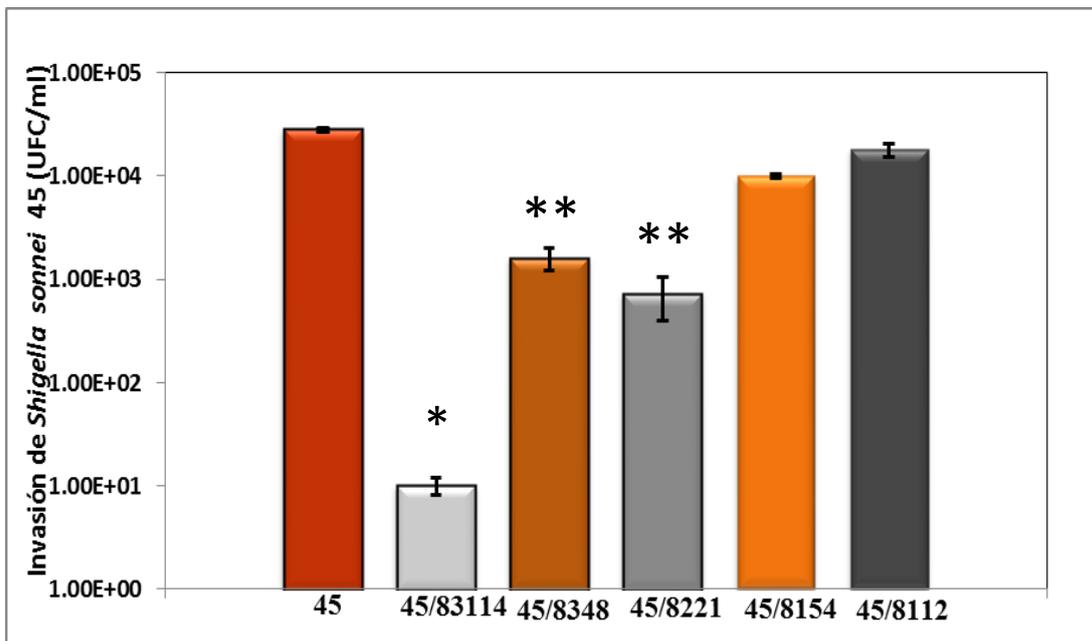
**Figura 1.** Invasión de células Hep-2 por *Shigella sonnei* 45 y *Shigella flexneri* 72. Número inicial de *Shigella* inoculada sobre la monocapa celular (■). Recuento de *Shigella sonnei* 45 que invadieron la monocapa de células Hep-2 (■). Recuento de *Shigella flexneri* 72 (UFC/ml) que invadieron la monocapa celular (■). Los asteriscos indican diferencia significativa respecto a la invasión de *Shigella* cuando no recibió ningún tratamiento ( $p \leq 0,05$ )

**Estudios de co-incubación:** Se co-incubaron cada uno de los microorganismos potencialmente probióticos: *Lb. kefir* CIDCA 8348, *Lb. plantarum* CIDCA 83114 y *Lc. lactis subsp lactis* CIDCA 8221, con una concentración determinada de *S. sonnei* 45 y *S. flexneri* 72 como se indicó en Materiales y Métodos, de acuerdo al siguiente esquema:



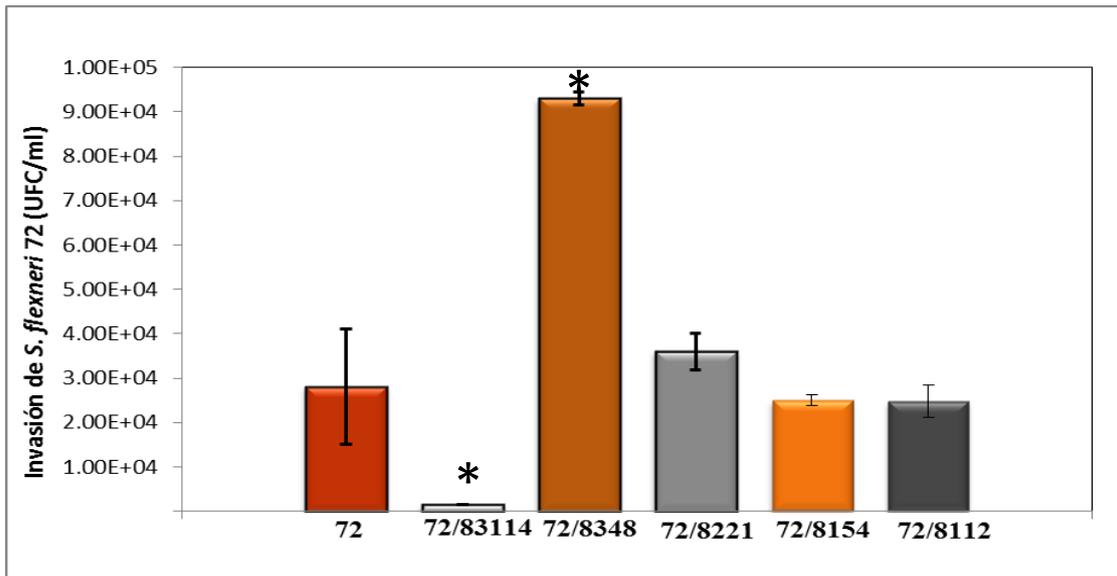
Como puede verse en la figura 2, cuando se realizó la co-incubación de *S. sonnei* 45 con  $1 \times 10^8$  UFC/ml de *Lb. plantarum* CIDCA 83114, *Lb. kefir* CIDCA 8348 y *Lc. Lactis* CIDCA 8221, el número de *Shigella* internalizada en las células Hep-2 disminuyó significativamente respecto al control. Tanto *Lb. kefir* CIDCA 8348 como *Lc lactis* CIDCA 8221 produjeron una reducción de la invasión, pero significativamente menor que la producida por *Lb. plantarum* CIDCA 83114. Las levaduras no tuvieron efecto significativo sobre la invasión de *Shigella*.

Sin embargo cuando se lleva a cabo el proceso de co-incubación de cada microorganismo con *S. flexneri* 72 (Figura 3), solo *Lb. plantarum* CIDCA 83114 fue capaz de disminuir significativamente la invasión. Cuando se co-incubó con *Lb. kefir* CIDCA 8348 se observó un aumento de la invasión de *S. flexneri* 72, mientras que *Lc. Lactis* CIDCA 8221 no alteró significativamente la invasión, al igual que las levaduras.



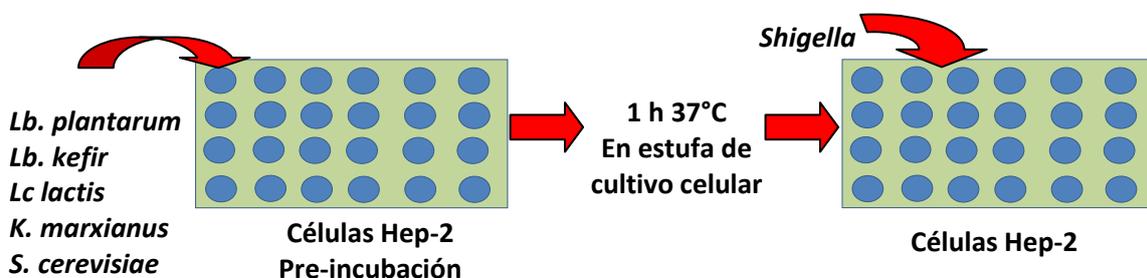
**Figura 2.** Invasión de células Hep-2 por *Shigella sonnei* 45. La *Shigella* fue co-incubada con *Lb. plantarum*, *Lb. kefir* y *Lc. lactis subp lactis* durante 1 hora a 37 °C en agitación, antes de ser agregadas a la monocapa. Recuento de *Shigella* que invadieron la monocapa de células Hep-2 control de invasión (■). Invasión de *Shigella* cuando fue co-incubada con *Lb. plantarum* (□). Invasión de *Shigella* cuando fue co-incubada con *Lb. kefir* (■). Invasión de *Shigella* cuando fue co-incubada con *Lc. lactis* (■). Invasión de *Shigella* cuando fue co-incubada con *K. marxianus* (■). Invasión de *Shigella* cuando fue co-incubada con *S. cerevisiae* (■). Los asteriscos (\*) indican diferencia significativa respecto a la invasión de *Shigella* cuando no recibió ningún tratamiento. El segundo asterisco indican diferencia significativas respecto al tratamiento con *Lb. plantarum* ( $p \leq 0,05$ ).

A su vez, se observó que el efecto inhibitorio de *Lb. plantarum* CIDCA 83114 es más marcado frente a *S. sonnei* 45 que frente a *S. flexneri* 72, coincidiendo con lo descrito por Kakisu en su Tesis Doctoral (2010).



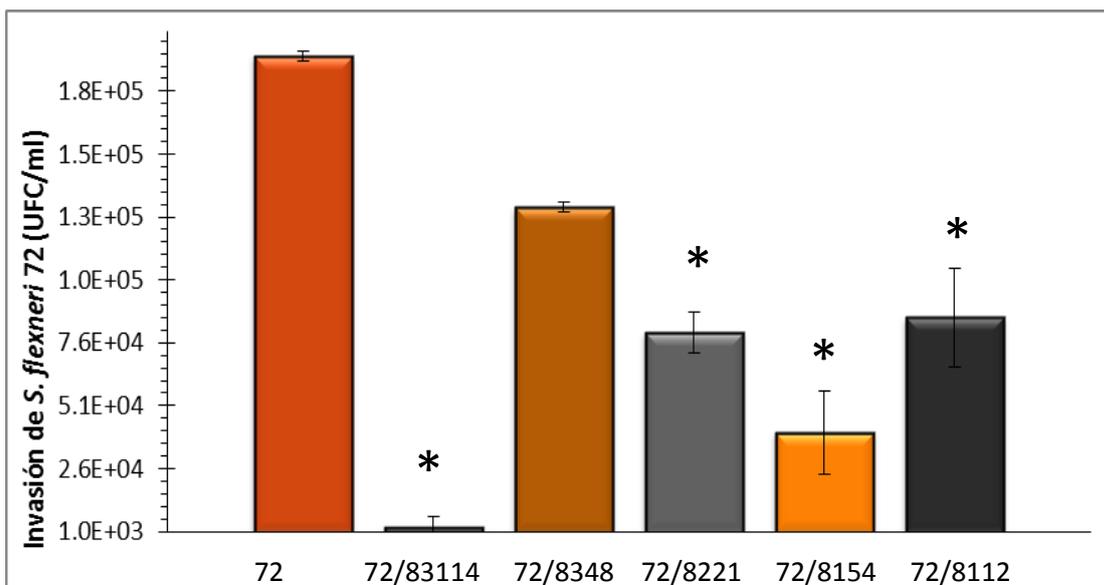
**Figura 3.** Invasión de células Hep-2 por *Shigella flexneri* 72. La *Shigella* fue co-incubada con *Lb. plantarum*, *Lb. kefir* y *Lc. lactis subp lactis* durante 1 hora a 37 °C en agitación, antes de ser agregadas a la monocapa. Recuento de *Shigella* que invadieron la monocapa de células Hep-2 sin ser tratada con los microorganismos (■). Invasión de *Shigella* cuando fue co-incubada con *Lb. plantarum* (□). Invasión de *Shigella* cuando fue co-incubada con *Lb. kefir* (■). Invasión de *Shigella* cuando fue co-incubada con *Lc. lactis* (■). Invasión de *Shigella* cuando fue co-incubada con *K. marxianus* (■). Invasión de *Shigella* cuando fue co-incubada con *S. cerevisiae* (■) Los asteriscos indican diferencia significativa respecto a la invasión de *Shigella* cuando no recibió ningún tratamiento ( $p \leq 0,05$ )

**Estudios de Pre-incubación:** Se pre-incubaron los microorganismos puros sobre células Hep-2 y posteriormente se inoculó la *Shigella* sobre la monocapa, según se indicó en Materiales y Métodos, de acuerdo con el esquema siguiente:



Cuando se analizaron los ensayos donde la monocapa de células Hep-2 se pre-incubó con los microorganismos puros, se observó que

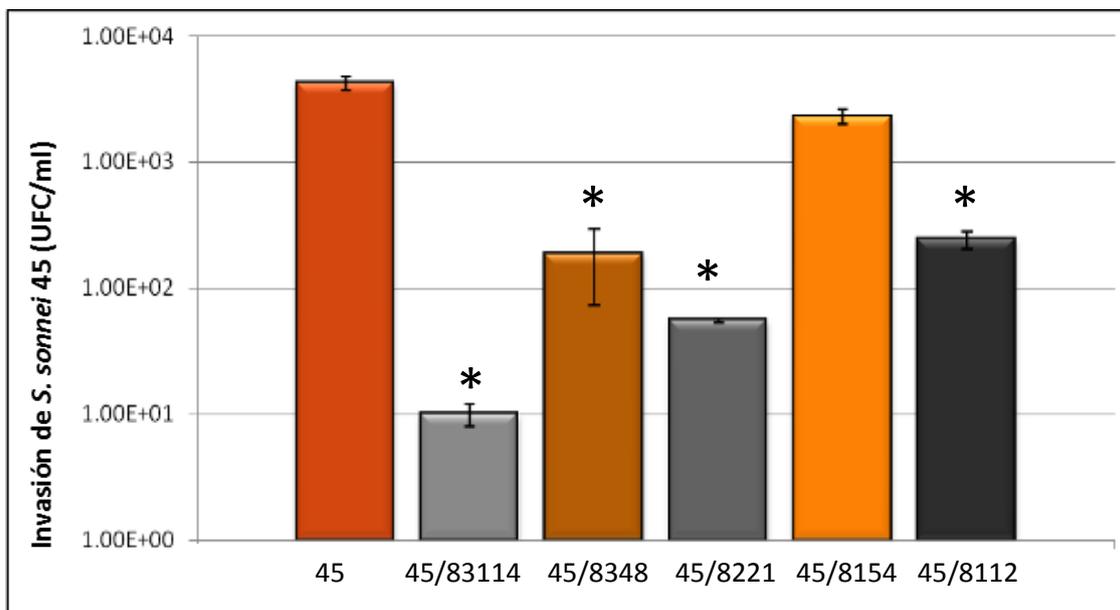
*Lb. plantarum*, *S. cerevisiae* CIDCA 8112, *Lc. Lactis* CIDCA 8221 y *K. marxianus* CIDCA 8154 protegieron en forma significativa a las células Hep-2 de la invasión de *S. flexneri* 72, mientras que la pre-incubación con *Lb. kefir* CIDCA 8348 no tuvo efecto significativo (Figura 4). Sin embargo la pre-incubación con *Lb. plantarum* CIDCA 83114 presentó una disminución drástica de la internalización de *Shigella*. La pre-incubación con *Lb. kefir* CIDCA 8348 no tuvo efecto significativo sobre la invasión de células Hep-2 por *Shigella flexneri* (figura4). Sin embargo, se observa que *Lc. lactis*, *K. marxianus* y *S. cerevisiae* disminuyeron significativamente la invasión de *Shigella flexneri*.



**Figura 4.** Invasión sobre las células Hep-2 por *Shigella flexneri* 72 sobre células Hep-2. La células Hep-2 fueron pre-incubada con *Lb. plantarum*, *Lb. kefir*, *Lc. lactis* subsp *lactis*, *K. marxianus* y *S. cerevisiae* durante 1 hora previa a la infección. Recuento de *Shigella* que invadieron la monocapa de células Hep-2 sin ser tratada con los microorganismos (■). Invasión de *Shigella* pre-incubando las monocapa con *Lb plantarum* (■). Invasión de *Shigella* pre-incubando las monocapa con *Lb. kefir* (■). Invasión de *Shigella* pre-incubando las monocapa con *Lc lactis* (■). Invasión de *Shigella* pre-incubando las monocapa con *K. marxianus* (■). Invasión de *Shigella* pre-incubando las monocapa con *S. cerevisiae* (■). Los asteriscos indican diferencia significativa respecto a la invasión de *Shigella* cuando no recibió ningún tratamiento

En la figura 5 puede verse el efecto de la pre-incubación de *Lb. kefir*, *Lb. plantarum*, *Lc. lactis* y *S. cerevisiae* sobre la invasión de las

células Hep-2 por *S. sonnei* 45. Si bien todos estos microorganismos mostraron una disminución de la invasión del orden de aproximadamente 1 log, *Lb. plantarum* CIDCA 83114 mostró el efecto más importante (aproximadamente 2 log). Cuando se pre-incubaron la células con *K. marxianus* CIDCA 8154 no se observó un efecto significativo sobre la invasión.



**Figura 5.** Invasión sobre las células Hep-2 por *Shigella sonnei* 45 sobre células Hep-2. La células Hep-2 fueron pre-incubada con *Lb. plantarum*, *Lb. kefir*, *Lc. lactis subp lactis*, *K. marxianus* y *S. cerevisiae* durante 1 hora previa a la infección. Recuento de *Shigella* que invadieron la monocapa de células Hep-2 sin ser tratada con los microorganismos (■). Invasión de *Shigella* pre-incubando las monocapa con *Lb plantarum* (■). Invasión de *Shigella* pre-incubando las monocapa con *Lb. kéfir* (■). Invasión de *Shigella* pre-incubando las monocapa con *Lc lactis* (■). Invasión de *Shigella* pre-incubando las monocapa con *K. marxianus* (■). Invasión de *Shigella* pre-incubando las monocapa con *S. cerevisiae* (■). Los asteriscos indican diferencia significativa respecto a la invasión de *Shigella* cuando no recibió ningún tratamiento ( $p \leq 0,05$ ).

La capacidad de diferentes microorganismos potencialmente probióticos de proteger cultivos celulares frente de microorganismos patógenos ha sido descrita por diferentes autores. Chen *et al.* (2007) encontraron que *L. crispatus* causa una reducción de la invasión de células Hela por *E. coli* y *Salmonella typhimurium*. Zhang

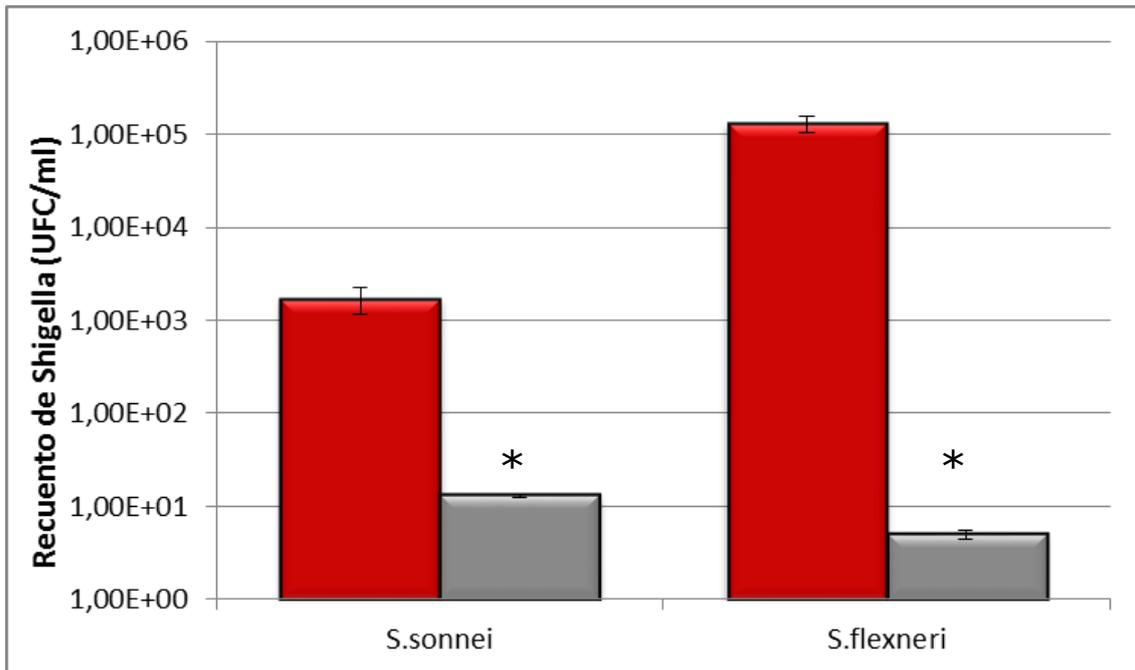
*et al.* (2010) encontraron efectos inhibitorios significativos de *Lb. casei*, *Lb. paracasei* y *Lb. rhamnosus* frente a la adhesión de *S. sonnei* en células HT-29.

Si comparamos los efectos de la co-incubación con los de la pre-incubación, vemos que algunos de los microorganismos protegen en ambos casos a las células Hep-2 de la invasión de *Shigella*. Sin embargo *Lb. kefir* CIDCA 8348 provoca un aumento de la invasión cuando es co-incubado con *S. flexneri* 72, a diferencia de lo que ocurre luego de la pre-incubación. Por lo tanto se eligió la pre-incubación para los experimentos siguientes.

De los resultados obtenidos se puede concluir que la mejor respuesta de protección se obtuvo en los ensayos de pre-incubación y que *Lb. plantarum* CIDCA 83114 presentó el efecto más sobresaliente, en concordancia con lo reportado por Kakisu en su Tesis Doctoral, quien observó que esta misma cepa protege a las células Hep-2 de la invasión de *Shigella* y que dicho efecto es debido a ciertas proteínas de las paredes del lactobacilo.

### **Efecto de la mezcla microbiana frente a la invasión de células Hep-2 por *S. sonnei* 45 y *S. flexneri* 72.**

Una vez evaluado los efectos de cada una de las bacterias y levaduras que forman parte de la mezcla microbiana, y considerando que la protección fue más notoria en los ensayos de pre-incubación, se evaluó el efecto de la mezcla microbiana cuando se adiciona sobre la monocapa celular y posteriormente se infecta con *Shigella sonnei* 45 y *Shigella flexneri* 72.



**Figura 6.** Invasión sobre células Hep-2 por *Shigella sonnei* 45 y *Shigella flexneri* 72. Recuento de *Shigella* que invadieron la monocapa de células Hep-2 (■). Invasión de *Shigella* luego de pre-incubar las células con la mezcla microbiana (■). Los asteriscos indican diferencia significativa respecto a la invasión de *Shigella* cuando no recibió ningún tratamiento ( $p \leq 0,05$ ).

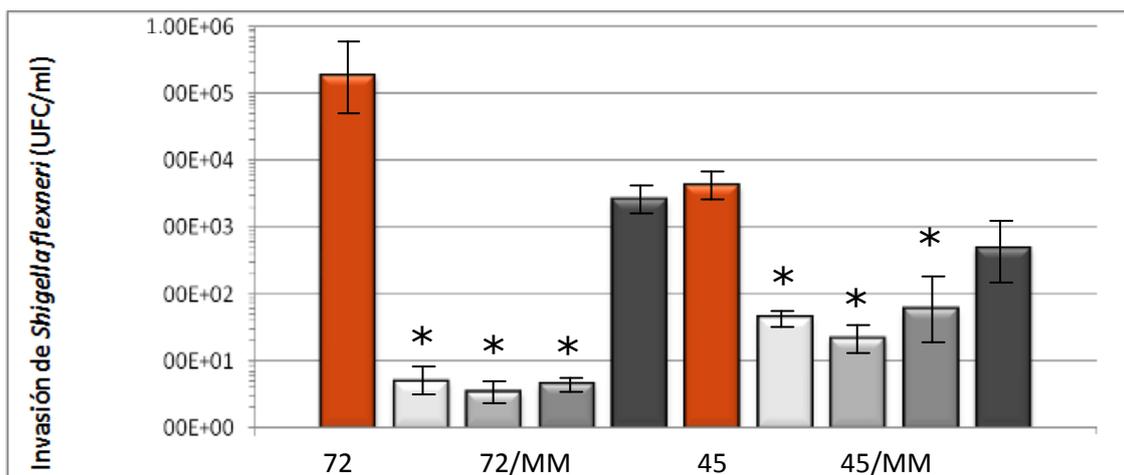
Cuando se pre-incubó la monocapa celular con la mezcla microbiana, se observó una disminución significativa de la invasión por *S. sonnei* 45 y *S. flexneri* 72 (Figura 6). El efecto protector de la mezcla microbiana fue aún mayor que el de cada una de las cepas aisladas (Figuras 3, 4, 5). Esto concuerda con lo estudiado por Moorthy *et al.* (2010) quienes demostraron un efecto sinérgico entre *L. rhamnosus* y *L. acidophilus* en la protección de las células Caco-2 frente a la adhesión e internalización de *Shigella*. Resultados similares fueron obtenidos por Forestier *et al.* (2001) quienes encontraron que *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* protege el epitelio intestinal de diferentes patógenos.

A fin de determinar el efecto de dosis de la mezcla microbiana ( $10^8$  UFC/ml de bacterias y  $10^6$  UFC/ml de levaduras) sobre la protección contra la invasión por *Shigella*, se ensayaron 3 diluciones

diferentes, 1/10, 1/100 y 1/1000. Se observó un efecto de protección similar al obtenido por la mezcla microbiana sin diluir (Tabla 1). Es decir que concentraciones de bacterias de  $1 \times 10^5$  UFC/ml y levaduras  $1 \times 10^3$  UFC/ml fueron suficientes para ejercer el efecto protector.

**Tabla 1:** Número de *Shigella* internalizadas (UFC/ml) en células Hep-2 frente al tratamiento con la mezcla microbiana.

<i>Shigella</i>	Control	MM	MM (1/10)	MM (1/100)	MM (1/1000)
<i>S. sonnei</i> 45	$1,7 \times 10^3$	<10	<10	<10	<10
<i>S. flexneri</i> 72	$1,3 \times 10^5$	<10	<10	<10	<10



**Figura 7.** Invasión de *Shigella sonnei* 45 y *Shigella flexneri* 72 sobre células Hep-2. Recuento de *Shigella* que invadieron la monocapa de células Hep-2 (■). Invasión de *Shigella* luego de pre-incubar las células con la mezcla microbiana (MM) durante 60 min (□). Invasión de *Shigella* luego de pre-incubar las células con la mezcla microbiana (MM) durante 30 min (▤). Invasión de *Shigella* luego de pre-incubar las células con la mezcla microbiana (MM) durante 15 min (▥). Invasión de *Shigella* luego de pre-incubar las células con la mezcla microbiana (MM) durante 5 min (■). Los asteriscos indican diferencia significativa respecto a la

Simultáneamente, se estudió el efecto del tiempo de pre-incubación sobre la capacidad protectora de la mezcla microbiana. Se observó efecto protector cuando la monocapa fue pre-incubada durante 15, 30 y 60 min, sin encontrarse diferencias significativas

entre las distintas condiciones. Este efecto inhibitorio dejó de observarse cuando se disminuyó el tiempo de pre-incubación a 5 min (Figura 7).

En vista de los resultados encontrados hasta aquí, se puede concluir que basta con una dilución 1/1000 de la mezcla microbiana y 15 min de pre-incubación sobre las células Hep-2 para que inhibir la invasión por *Shigella*.

Con el objetivo de dilucidar qué combinación de entre las cepas que constituyen la mezcla microbiana es la que más aporta el efecto de la mezcla microbiana frente a la invasión de *S. flexneri*, se probaron diferentes combinaciones de las mismas. Para ello se utilizaron diferentes mezclas de los microorganismos que constituyen a la mezcla microbiana, obteniéndolos de idéntica forma que dicha mezcla. Como puede verse en la tabla 2, todas las combinaciones tuvieron algún efecto sobre la invasión de *Shigella flexneri*, sin embargo dos de las mezclas, *Lb. plantarum* 83114/*S. cerevisiae* 8112 y mezcla microbiana sin *Lb. plantarum* 83114, presentaron efectos similares que los producidos por la mezcla microbiana completa. Las mezclas de *Lb. kefir* 8348/ *Lc. lactis* 8221; *Lb. kefir* 8348/*K. marxianus* 8154; *Lb. plantarum* 83114/*S. cerevisiae* 8112/*Lc lactis* 8221 y *Lb. kefir* 8348/ *K marxianus* 8154/*Lc lactis* 8221 redujeron significativamente la invasión de *S. flexneri* 72, aunque la reducción fue menor que con la mezcla microbiana completa. Al comparar los resultados de 83114/8112 y 83114/8112/8154 se observa que al agregar la levadura *K marxianus* 8154, se pierde el efecto protector, lo cual sugiere algún tipo de antagonismo. Sin embargo es notable que ese antagonismo desaparezca cuando hay otros microorganismos de la mezcla microbiana presentes (Tabla 2).

**Tabla 2:** Número de *Shigella flexneri* internalizada cuando se pre-incubación las células Hep-2 con diferentes mezclas de los microorganismos que constituyen la mezcla microbiana.

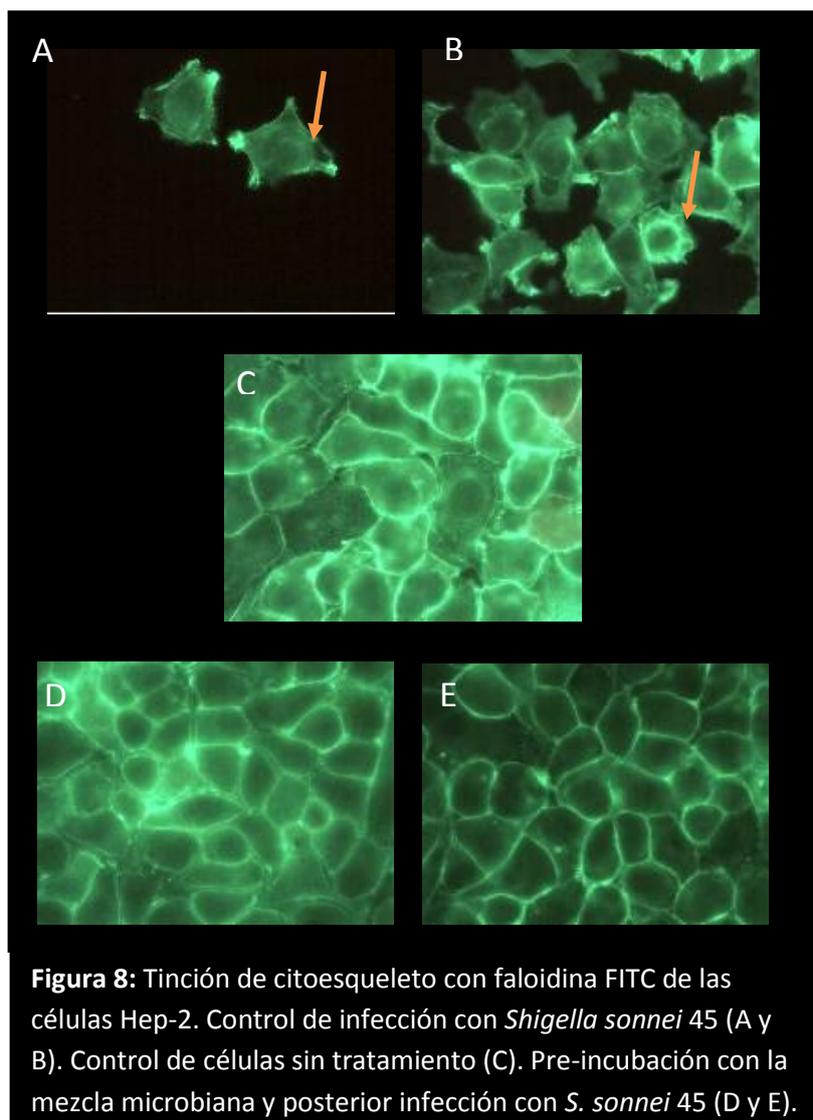
MICROORGANISMOS	NÚMERO DE SHIGELLA INTERNALIZADAS (UFC/ml)
<i>Shigella flexneri</i>	4.0E+05 ± 2,6E+4
<i>Lb. plantarum</i> 83114/ <i>S. cerevisiae</i> 8112	<10
<i>Lb. plantarum</i> 83114/ <i>K. marxianus</i> 8154	7.5E+04 ± 3,4E+3
<i>Lb. plantarum</i> 83114/ <i>Lb. kefir</i> 8348	5.0E+04±2,8E+2
<i>Lb. plantarum</i> 83114/ <i>Lc lactis</i> 8221	1.7E+04±5,2E+3
<i>S. cerevisiae</i> 8112/ <i>Lb. kefir</i> 8348	8.5E+04±6,2E+2
<i>S. cerevisiae</i> 8112/ <i>Lc lactis</i> 8221	1.0E+05±1,2E4
<i>S. cerevisiae</i> 8112/ <i>K. marxianus</i> 8154	1.5E+05±3,2E4
<i>K. marxianus</i> 8154/ <i>Lc lactis</i> 8221	6.8E+04±3,2E+3
<i>K. marxianus</i> 8154/ <i>Lb. kefir</i> 8348	1.0E+03±3E+2
<i>Lb. kefir</i> 8348/ <i>Lc lactis</i> 8221	9.5E+02±5,80
<i>Lb. plantarum</i> 83114/ <i>S. cerevisiae</i> 8112/ <i>K. marxianus</i> 8154	1.3E+05±7,2E3
<i>Lb. plantarum</i> 83114/ <i>S. cerevisiae</i> 8112/ <i>Lc lactis</i> 8221	5.2E+02±8,70
<i>Lb. kefir</i> 8348/ <i>Lc lactis</i> 8221/ <i>K. marxianus</i> 8154	1.0E+03±3,1E2
<i>Lb. kefir</i> 8348/ <i>Lc lactis</i> 8221/ <i>S. cerevisiae</i> 8112/ <i>K. marxianus</i> 8154	<10
Mezcla microbiana	<10

## Marcación fluorescente del citoesqueleto

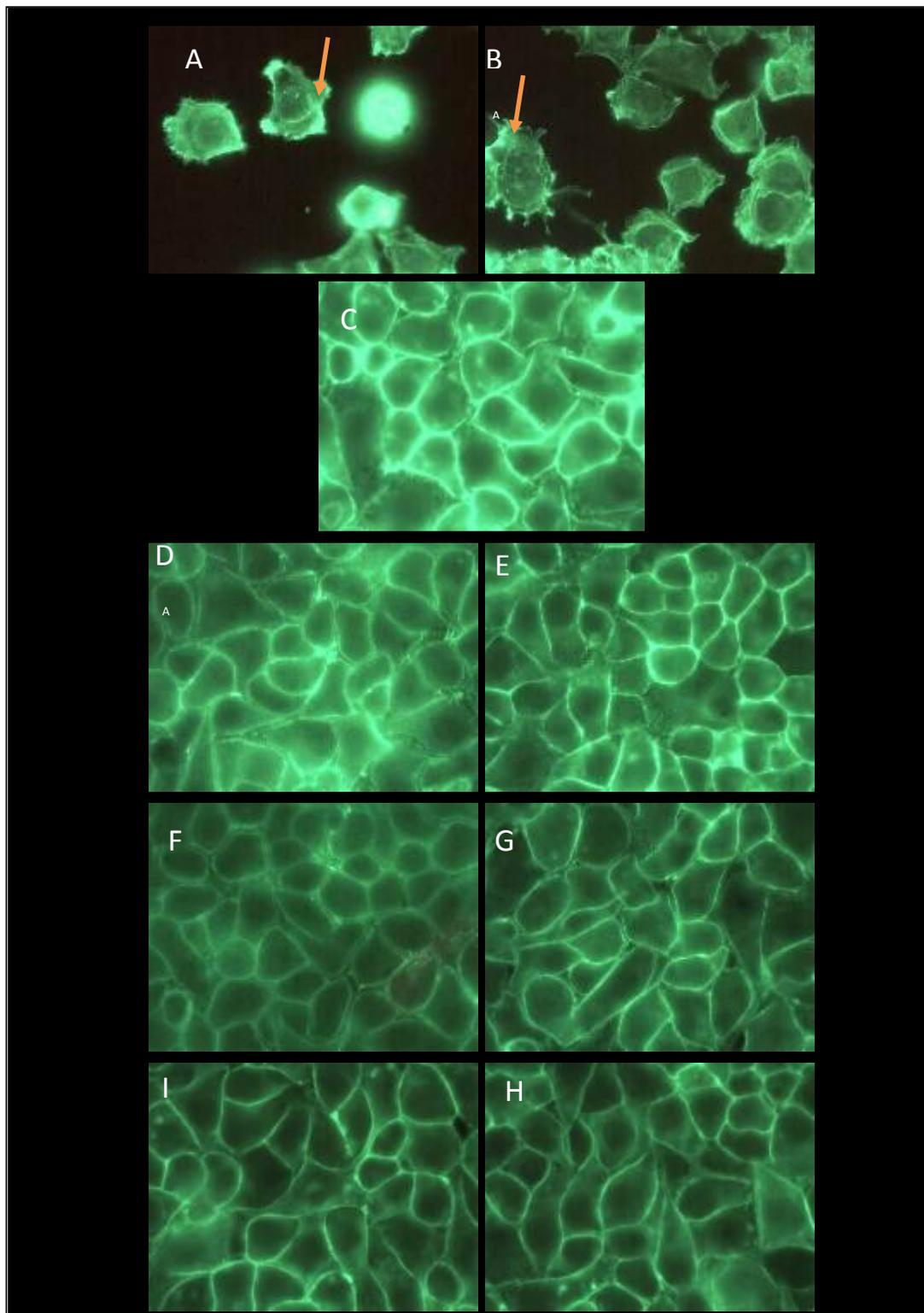
Se estudió la estructura celular mediante la tinción fluorescente del citoesqueleto con faloidina conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FTIC-faloidina). Esta tinción pone en evidencia la dimensión de la lesión provocada por *S. sonnei* 45 y *S. flexneri* 72 sobre las células Hep-2. En la figura 8 B y C se puede observar el desprendimiento celular causado por el efecto de la *S. sonnei* 45 o *S. flexneri* 72. En particular se observan zonas de mayor intensidad de luz la cual revela una desorganización y prolongación de elementos del citoesqueleto celular (flechas naranjas).

Cuando la monocapa se pre-incubó con la mezcla microbiana ( $10^8$  UFC/ml de bacterias y  $10^6$  UFC/ml de levaduras) se observó una notable protección de la integridad de la monocapa celular y de las células (Figura 8 D y E) equivalente al estado de la monocapa del control de células sin infección con *Shigella* (Figura 8 H, I y A). Idéntico resultado se obtuvo cuando la monocapa se pre-incubó la dilución 1/1000 y 1/100 de la mezcla microbiana y luego fue infectada (Figura 8 F y G).

En conclusión, se observó que tanto la integridad de la estructura celular como el desprendimiento de la monocapa se ven afectadas cuando las células se ponen en contacto con *S. sonnei* 45 o *S. flexneri* 72, y que la mezcla microbiana ejerce un notable efecto protector contra la lesión provocada por este patógeno.



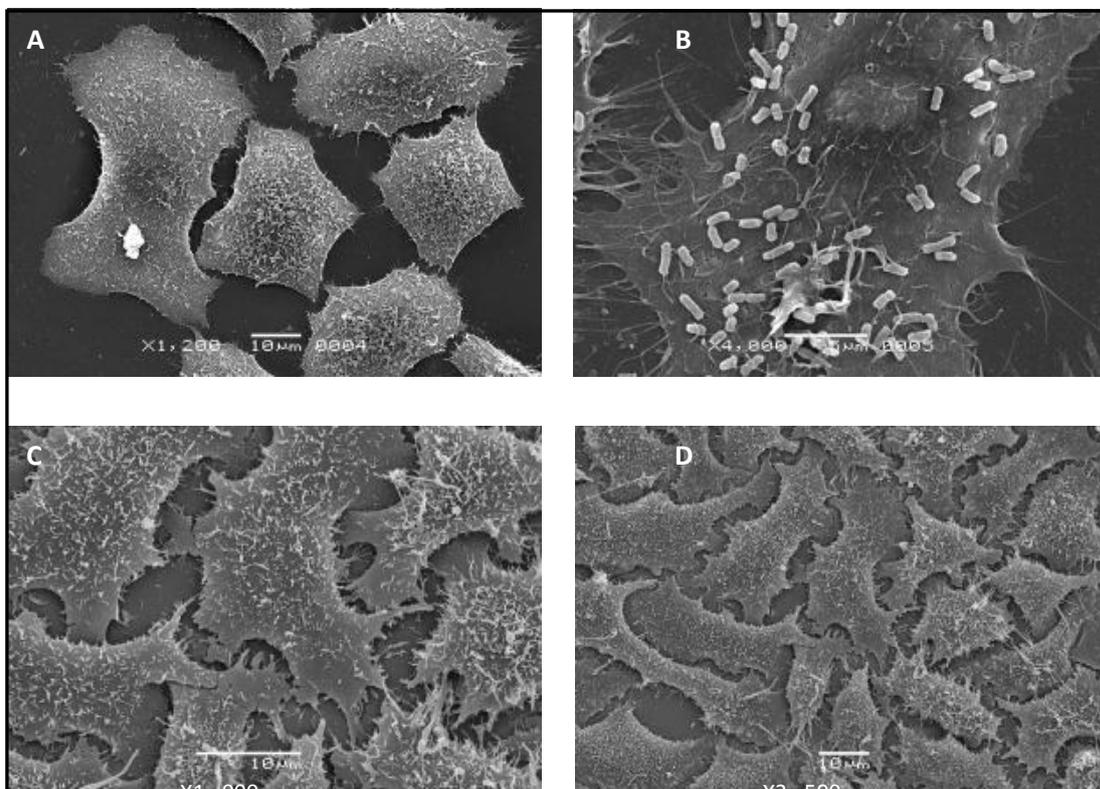
**Figura 8:** Tinción de citoesqueleto con faloidina FITC de las células Hep-2. Control de infección con *Shigella sonnei* 45 (A y B). Control de células sin tratamiento (C). Pre-incubación con la mezcla microbiana y posterior infección con *S. sonnei* 45 (D y E).



**Figura 9:** Tinción de citoesqueleto con faloidina FITC de las células Hep-2. Control de infección con *Shigella flexneri* 72(A) y (B). Control de células sin tratamiento (C). Pre-incubación con la mezcla microbiana y posterior infección con *S. flexneri* 72 (D) y (E). Pre-incubación con dilución 1/100 (F) y 1/1000(G) y posterior infección con *S. flexneri*. Control de células pre-incubadas con mezcla microbiana y en dilución 1 /100 (H) e 1/1000 (I) no infectadas.

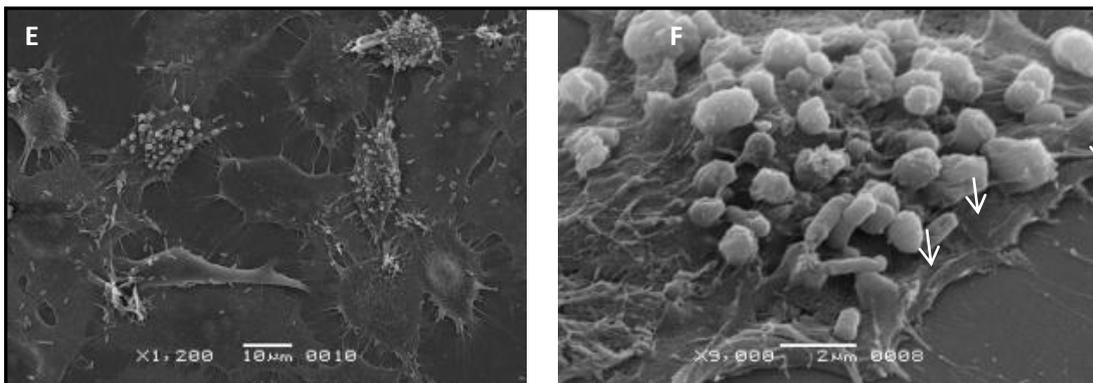
## Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para examinar el estado de las células con mayor resolución se obtuvieron imágenes por microscopía de barrido. En la figura 9 (A; B) se observan los efectos causados por la suspensión de *S. flexneri* 72 ( $10^8$  UFC/ml), donde se puede observar el deterioro de la integridad de la monocapa y de la morfología celular, donde se manifiesta el desprendimiento y la retracción celular, pérdida de las ciliadas de la superficie y deformación de las células. En la figura 9A se observa un marcado cambio en la morfología provocando retracción y redondeo, como así también un amplio grado de desprendimiento celular. En la figura 9B se observa en mayor detalle los efectos de desorganización estructural causada por *Shigella*, así como las bacterias adheridas a la superficie celular. En la figura 9 (C; D) se puede ver un control de células Hep-2 sin tratamiento.



**Figura 9.** Microscopía electrónica de barrido de células Hep-2. Células Hep-2 luego de incubar con *Shigella flexneri* 72 (A; B). Control de células Hep-2 (C; D).

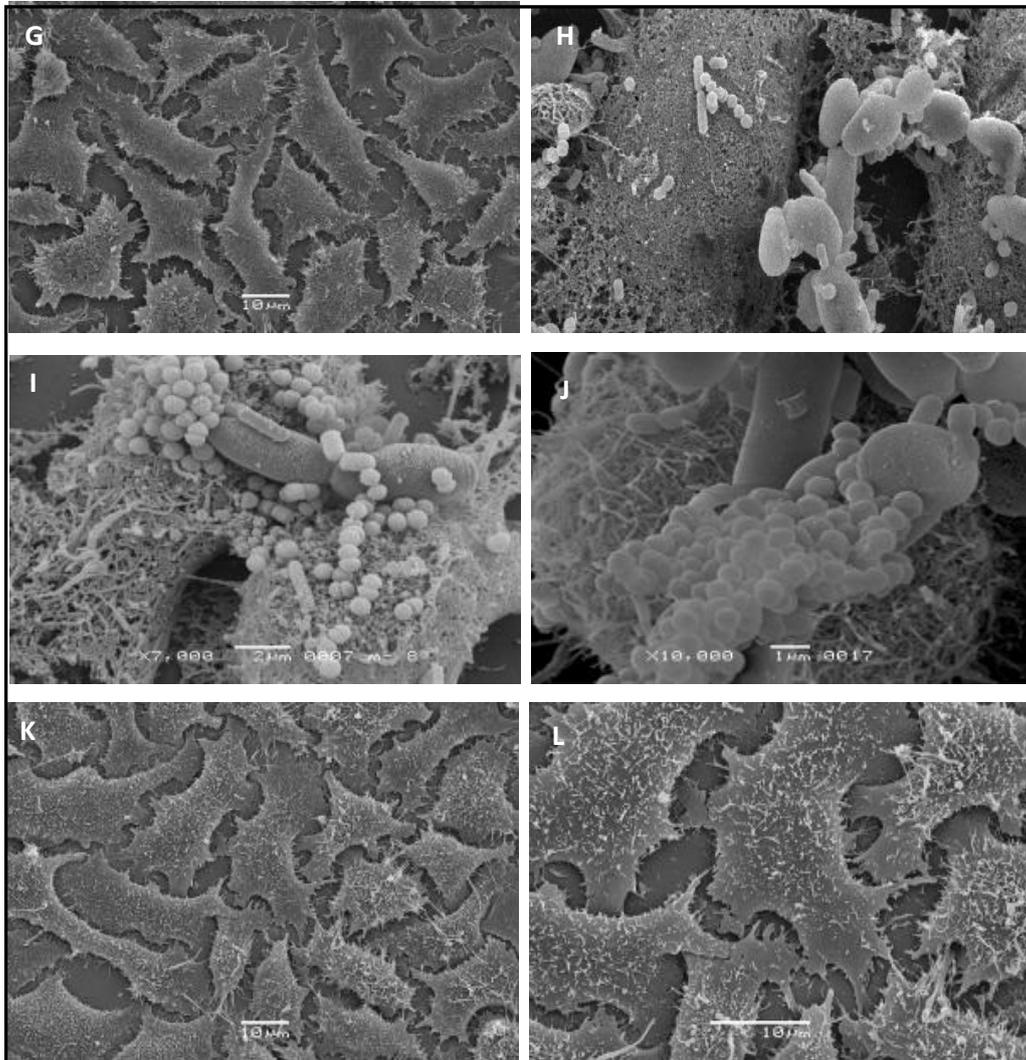
El contacto de *Shigella* con las células eucariotas desencadena un reordenamiento de los filamentos de actina y promueve la internalización por medio de un evento macropinocítico, lo que conduce a la formación de ruffles y protrusiones denominadas filopodios, que envuelven a la bacteria para su internalización (Van Nhieu *et al.* 1999; Adam *et al.* 1995) En la figura 10 (E; F) pueden observarse los ruffles junto al amplio daño sobre las células Hep-2. Estos ruffles son prolongaciones de la células inducidos por *Shigella* que le permiten su internalización y posterior infección. Esto concuerda con lo observado por Fernández (2010) quien encontró estas estructuras sobre las células Hep-2 cuando era tratadas con *S. flexneri* 72.



**Figura 10.** Microscopia electrónica de barrido de células Hep-2. Células Hep-2 luego de incubar con *Shigella*, desarrollo de ruffles (E; F).

Cuando las células son pre-incubadas con la mezcla microbiana se observó una notable protección de la monocapa de las células Hep-2 contra la lesión por *Shigella*. Puede verse en la figura 11 (G; H; I; J) la conservación de la morfología celular y de la integridad de la monocapa. La figura 11 (K; L) muestra el control de células sin tratamiento. En las figuras 11 (I; J) puede verse claramente el ordenamiento de la mezcla microbiana, levaduras en forma de limón

en estrecha relación con los cocos y entre ellas los bacilos en forma de varillas.



**Figura 11:** Microscopia electrónica de barrido de células Hep-2. **G-** células Hep-2 pre-incubadas con la mezcla microbiana e infectadas con *Shigella* 1000X. **H-** células Hep-2 pre-incubadas con la mezcla microbiana e infectadas con *Shigella* x5000. **I-** y **J-** Mezcla microbiana pre-incubada sobre las células Hep-2 con un aumento de x7000 y x10000 respectivamente. **K-** y **L-** Control de células pre-incubada con la mezcla microbiana con aumento de x1000 y x2500

En conclusión, la mezcla microbiana es capaz de proteger a las células de las lesiones morfológicas y estructurales que provoca la infección por *Shigella*.

## Conclusiones

- ❖ Las cepas *Shigella sonnei* 45 y *Shigella flexneri* 72 invaden a las células Hep-2, siendo esta última más invasiva que *S. sonnei* 45.
- ❖ Ambas *Shigella* provocaron daños en la integridad de la monocapa celular.
- ❖ La pre-incubación de la monocapa con las bacterias y levaduras puras que constituyen la mezcla microbiana presentó un mayor efecto protector que la co-incubación frente a la infección con *Shigella*.
- ❖ El efecto de protección fue más notorio frente a la invasión con *S. sonnei* 45 que cuando se utilizó *S. flexneri* 72.
- ❖ La pre-incubación de las células Hep-2 con la mezcla microbiana protegió a las células contra la invasión de *S. sonnei* y *S. flexneri*.
- ❖ El efecto protector de la mezcla microbiana fue superior al provocado por cualquiera de sus cepas en forma aislada.
- ❖ EL efecto protector de la mezcla microbiana fue dependiente del tiempo de pre-incubación.
- ❖ La pre-incubación de la monocapa con la mezcla microbiana protegió a las células de las lesiones morfológicas provocadas por la *Shigella* y evitó la desorganización de la red de actina.
- ❖ Algunas de las combinaciones de los microorganismos puros diferentes a la mezcla microbiana, presentaron efecto protector sobre las células Hep-2.

# CAPÍTULO III

Efecto de la mezcla  
microbiana sobre la actividad  
citotóxica de *Clostridium difficile*

## Introducción

*C. difficile*. Una vez instalado en el intestino, se desarrolla produciendo como principales factores de virulencia dos toxinas, toxina A (TcdA) y toxina B (TcdB). Las infecciones causadas por este patógeno conducen a cuadros que van desde diarrea, colitis, colitis pseudomembranosa fulminante (CPM), megacolon tóxico hasta puede conducir a la muerte del paciente (Elmer, 1996, Dallal 2002). Las diarreas asociadas a *C. difficile* (DACD) comprenden entre el 20 y 50% de las diarreas asociadas a antibióticos y el 10% de las diarreas nosocomiales (Mylonakis et al., 2001).

La citotoxina (TcdB) provoca la despolimerización de la actina, con posterior destrucción del citoesqueleto celular tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*. La toxina A tiene efectos fundamentalmente enterotóxicos en animales (Chávez-Olarte et al., 1997; Cheng et al., 1997). A pesar de que ambas toxinas parecen interaccionar de manera sinérgica en la patogenia de la enfermedad, las cepas negativas para la enterotoxina A aún son capaces de producir enfermedad. Para tratar de comprender mejor los mecanismos de interacción entre *C. difficile* y el hospedador que conllevan a la colonización, se han empleado modelos *in vitro* que utilizan diferentes líneas celulares en cultivo como Caco-2, Hela y HT29, células productoras de mucus HT29-MTX y fibroblastos. (Paredes- Sabja et al 2011, Ma et al 2011, Eveillard et al 1993).

Existe un creciente interés en los probióticos para el tratamiento de diarreas por antibiótico (DA) e infección por *C. difficile*. La justificación para el uso de probióticos es que el uso de antibióticos puede dar lugar a una perturbación de la microflora intestinal normal, que es uno de los factores clave en la patogénesis de la infección (Surawicz et al, 1989). Un ensayo clínico reciente demostró que un preparado probiótico constituido por *Lactobacillus*

tiene efecto protector contra DA y la diarrea asociada a *C. difficile* (Hickson et al, 2007.). Existen varios mecanismos posibles por los cuales los probióticos, incluyendo *Lactobacillus*, ejercen efectos preventivos en la DA. Estos incluyen la síntesis de sustancias antimicrobianas (Beausoleil et al, 2007; Alander et al, 1997; Coconnier et al, 1997), la competencia por los nutrientes necesarios para el crecimiento de patógenos, inhibición competitiva de la adherencia de los patógenos, y la modificación de toxinas o receptores de la toxina (Ruszczyński et al, 2008).

Por otro lado *L. rhamnosus* tiene actividad inhibitoria contra una amplia gama de bacterias, incluyendo *C. difficile* (Silva et al, 1987). Algunos autores observaron que *L. rhamnosus* impide DA en niños (Szajewska et al, 2001). Otros estudios demuestran que *L. plantarum* y *Lactobacillus GG* son eficaces en la reducción de la tasa de recurrencia de diarrea causada por *C. difficile*, y en la desaparición de los síntomas tempranos asociados a esta diarrea. (Pochapin,2000; Wullt et al, 2003).

Los probióticos actúan mejorando la constitución de la microflora normal contribuyendo al efecto de barrera contra los microorganismos patógenos. Incluso hay evidencia de que los probióticos son capaces de proteger la integridad de la unión estrecha entre enterocitos (Bruewer et al, 2003), o bloquear los sitios de inserción de los patógenos (incluyendo *C. difficile*) o sus toxinas (Buts, 2008; Bruewer et al, 2008). Existen evidencias de que ciertos probióticos son capaces de destruir las toxinas A y B de *Clostridium difficile* (Castagliuolo et al, 1996) (Lynn y McFarland, 2009).

Entre las levaduras, se ha demostrado que *S. boulardii* es capaz actuar de diferentes maneras para proteger al huésped contra los microorganismos patógenos. Este efecto protector se ha observado en presencia de aproximadamente  $8 \times 10^5$  UFC/ml de *S. boulardii*, pero los mecanismos involucrados no siempre han sido dilucidados.

Un mecanismo podría ser la degradación de las toxinas bacterianas por las enzimas proteolíticas de la levadura (Czerucka D, 1999; Castagliuolo et al 1996). Los resultados de algunos experimentos *in vitro* utilizando células tratadas con diferentes extractos de levadura, muestran que *S. boulardii* podría inhibir la adherencia de *C. difficile* a las células. Esto se debe a que una enzima proteolítica asociada a la pared celular podría ser responsables de la destrucción de las adhesinas de *C. difficile* y también de los receptores de la superficie celular. Sin embargo, la hipótesis de impedimento estérico por la levadura sobre la adherencia de *C. difficile* en las células Vero no podría ser descartado (Tasteyre et al, 2002).

## Objetivos

- ❖ Estudiar la acción antagónica de la mezcla microbiana y de cada una de sus cepas puras frente a las toxinas de *Clostridium difficile*

## **Materiales y Métodos**

### **1-Cepas puras y mezcla microbiana**

Se utilizaron las cepas aisladas de kefir, los medios de cultivo y las condiciones de almacenamiento descritos en el capítulo I. Las cepas se crecieron en forma individual y una vez alcanzada la fase estacionaria se centrifugaron a 10000 g durante 15 minutos y se lavaron 2 veces con PBS pH 7.2 y resuspendidas en DMEM. Todas las suspensiones fueron ajustadas de manera de obtener una concentración de  $10^8$  UFC/ml para bacterias y  $10^6$  UFC/ml para levaduras. La mezcla microbiana se obtuvo a partir de resuspender a todos estos microorganismos en 10ml de DMEM, obteniéndose una concentración final de  $10^8$ UFC/ml de bacterias y  $10^6$ UFC/ml de levaduras.

### **2-Obtención de sobrenadante de la mezcla microbiana y sus cepas puras.**

La mezcla microbiana o sus cepas puras crecidas en 500ml los medios indicados en el capítulo 1, se centrifugaron a 10000g durante 15 min, y se inocularon en 50ml de BHI. Se incubaron 1 hora a 37°C. Luego se centrifugaron nuevamente a 10000g durante 15min, para obtener los sobrenadantes a utilizar. Estos sobrenadantes se filtraron en condiciones asépticas a través de membrana de 0,22  $\mu$ m de diámetro de poro. Estos sobrenadantes se utilizaron en los ensayos de citotoxicidad.

### 3-Microorganismos patógenos

Se utilizó un aislado clínico de *Clostridium difficile* 117 productor de toxina A y toxina B (TcdA+/TcdB+). El aislamiento se realizó en el hospital Muñis de la provincia de Buenos Aires a partir de heces de paciente con diarrea compatible con infección por *Clostridium difficile*. La cepa se conservó a -80°C en sacarosa 0.6M y se reactivó en medio líquido BHI (Brain Heart Broth Biokar Diagnostic, Beauvais, France) suplementado con cisteína, dos veces consecutivas antes de cada ensayo. *C. difficile* se creció a 37°C durante 18 horas en anaerobiosis. Se centrifugó el cultivo a 15000g durante 20 min descartando el pellet y conservando el sobrenadante que contiene las toxinas de *C. difficile*.

### 4-Línea celular eucariota y condición de cultivo

Para la determinación de la actividad citotóxica se utilizaron células Vero. Esta línea celular corresponde a fibroblastos provenientes de riñón de mono. Esta línea celular presenta un crecimiento rápido, obteniéndose confluencia en 48 horas. Esta línea celular es muy sensible a las toxinas y por ello se utilizan como modelo para ensayos de citotoxicidad de *C. difficile* (Popoff, 1987). Las células se cultivaron en placas de 48 fosas durante 48 horas a 37°C en atmósfera controlada de CO<sub>2</sub> 5% (Estufa de cultivo) obteniéndose un monocapa confluyente. Se utilizó Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM; GIBCO, BRL, Life Technologies Rockville, MD, USA) suplementado con suero fetal bovino (PAA Laboratoties, GmbH, Pasching, Austria) al 12%, con 1% de aminoácidos no esenciales (GIBCO, BRL, Life Technologies Rockville, MD, USA) y antibióticos (12 UI/ml de penicilina y 12 µg/ml de estreptomina).

### **5-Estudio de la actividad citotóxica del sobrenadante de *C. difficile*.**

Se realizaron diluciones seriadas a la mitad (1/2) del sobrenadante de *C. difficile* en medio DMEM sin suplementar. Se lavaron las células Vero crecidas en placa de 48 fosas dos veces con PBS estéril y se adicionaron 100 µl de cada dilución. Se incubaron las células a 37°C durante 20 horas en estufa con atmósfera controlada (CO<sub>2</sub> 5%, aire 95%). Como control negativo de citotoxicidad, a dos fosas de cada placa se le adicionaron 100 µl de DMEM sin suplementar. Luego de la incubación las placas fueron lavadas 3 veces con PBS. Se adicionó formol al 2 % (v/v) para fijar las células que quedaron adheridas. Posteriormente se tiñeron con solución de cristal violeta al 0,013% (v/v) en formol al 2% (v/v) y etanol al 5% (v/v) en PBS. Se extrajo el colorante de las células por adición de etanol al 50% durante 2 horas y se determinó la absorbancia a 590 nm. El valor de la absorbancia es proporcional al número de células que permanecieron adheridas a la placa. El daño causado por las toxinas fue evaluado a través del porcentaje de células desprendidas, con respecto a las células que permanecieron adheridas en las fosas control sin tratamiento.

### **6-Estudio de la mezcla microbiana y sus cepas puras frente a la actividad citotóxica de *C. difficile*.**

Se estudió la actividad citotóxica del sobrenadante de *C. difficile* sobre las células Vero, en presencia de las cepas puras de *L. kéfir* 8348, *L. plantarum* 83114, *Lc. lactis subsp lactis* 8221, *K. marxianus* 8154, *S. cerevisiae* 8112 (10<sup>8</sup> UFC/ml para bacterias y 10<sup>6</sup>UFC/ml para levaduras) o de sus sobrenadantes, y de la mezcla microbiana. Se co-incubaron sobre las células diluciones seriadas a la mitad (1/2) del sobrenadante de *C. difficile* y sobrenadante de las cepas puras o

la mezcla microbiana al 100%, 50%, 25% y al 10% en BHI fresco. Se incubaron las células a estufa gaseada (CO<sub>2</sub> 5% aire 95%) a 37°C durante 20 horas. Se determinó la actividad citotóxica mediante tinción con cristal violeta de las células que quedaron adheridas. Los resultados se expresan como porcentaje de células no desprendidas.

### **7-Estudio de las características de los metabolitos del sobrenadante de *Lactococcus lactis* subsp *lactis*.**

A fin de estudiar la naturaleza del o los metabolitos presentes en el sobrenadante de *Lactococcus lactis*, este fue tratado en un equipo Amicon (Amicon ultrafiltration Stirred Cell 8050, Millipore Corporation US) equipado con una membrana de celulosa regenerada (Ultracell PLGC04310, MWCO 10000, Millipore Corporation, US). Se utilizó una celda de ultrafiltración de 50 ml de capacidad. Este equipo permite obtener dos fracciones una donde se encuentran los metabolitos con peso molecular mayor a 10000Da y otro de menor a dicho peso molecular. Se utilizaron ambas fracciones para el ensayo de co-incubación con sobrenadante de *C. difficile* sobre células Vero. Por otro lado se separó la fracción de mayor peso molecular en columnas vivaspin cuyo valor de corte corresponde a 100KDa

Por otro lado se trató el sobrenadante completo de *Lc. lactis* a 100°C durante 15 min., y se evaluó su efecto sobre la actividad biológica de *C. difficile*.

### **6-Marcación fluorescente del citoesqueleto**

Se realizó la tinción del citoesqueleto como se describió en el capítulo II para evaluar la dimensión de la lesión de las células Vero por el sobrenadante de *C. difficile* sobre la red de actina del citoesqueleto.

## Resultados y Discusión

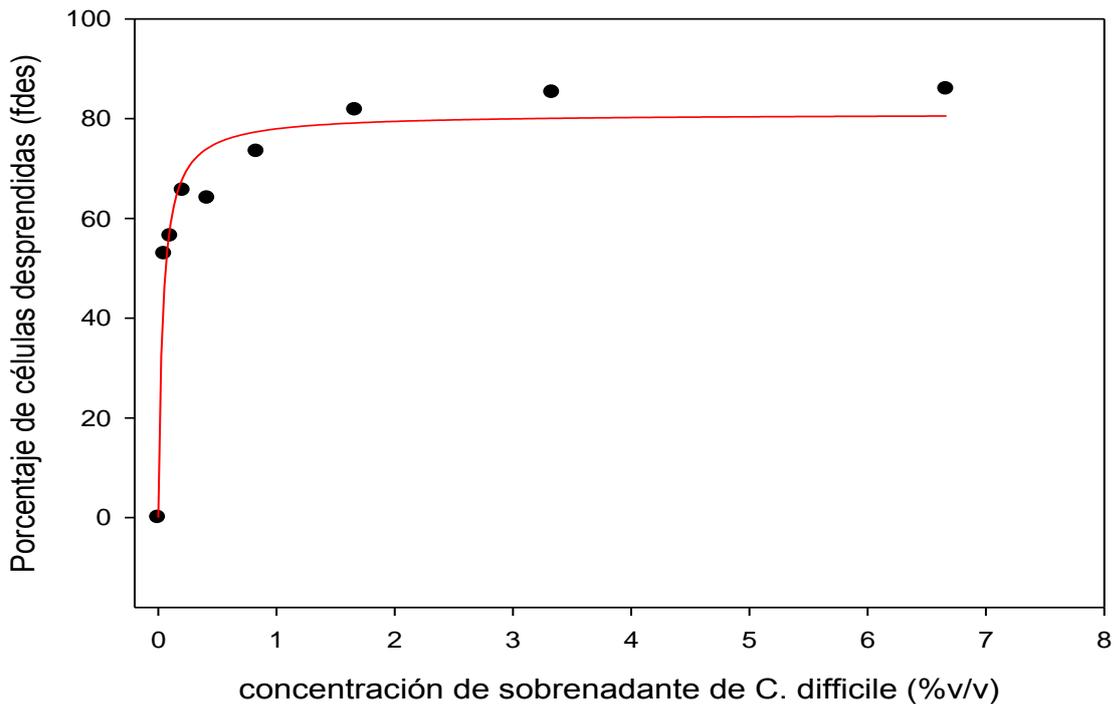
### Estudio de la actividad citotóxica de *C. difficile*

Se determinó la actividad citotóxica de *C. difficile* sobre las células Vero. Para ello se evaluaron la cantidad de células presentes en la fosa que contenía DMEM sin suplementar y las tratadas con sobrenadante de *C. difficile* mediante tinción con cristal violeta. La actividad biológica se expresa como el porcentaje de células desprendidas, de acuerdo con la siguiente expresión:

$$f_{desp} = 100 \left( 1 - \frac{(Am - Ao)}{(Ab - Ao)} \right) \quad Ec1$$

Donde  $Am$  es la absorbancia a 590nm de la muestra a evaluar,  $Ao$  es la absorbancia de la muestra leída en la fosa que no contenía células (control de lavado) y  $Ab$  Absorbancia de las células incubadas con DMEM sin suplementar.

En la figura 1 se observa el porcentaje de células desprendidas en función de la concentración de sobrenadante de cultivo de *C. difficile* 117. Cuando la concentración de sobrenadante supera el 1% no se observa un cambio apreciable en el porcentaje de desprendimiento de las células, esto es debido a que a partir de ese punto se ha desprendido aproximadamente el 90 % de las células Vero. En el intervalo de concentraciones entre 0 y 1% podemos ver como aumenta la fracción de células desprendidas a medida que aumenta la concentración de sobrenadante de *C. difficile*.



**Figura 1.** Actividad biológica de sobrenadante de *C. difficile*. Porcentaje de células desprendidas en función de la concentración de sobrenadante (%v/v). Curva ajustada por modelo hiperbólico  $Fd = \frac{a C}{b + C}$

La curva de la figura 1 se ajustó mediante un modelo matemático a partir del cual se calculó la dosis de desprendimiento 50 (DD<sub>50</sub>). La DD<sub>50</sub> corresponde a la concentración de sobrenadante que produce el desprendimiento del 50% de las células que se hallan adheridas a la placa. Este modelo matemático corresponde a un comportamiento hiperbólico cuya ecuación es:

$$Fd = \frac{a C}{b + C} \quad \text{Ec2}$$

Donde Fd es el porcentaje de células desprendidas y C es la concentración de sobrenadante expresada como %v/v. Los parámetros a y b son las constantes de la ecuación y se determinaron mediante el programa de cálculo "Sigmaplot 10" (Trejo et al 2010). Una vez determinados estos parámetros (a y b), se calculó la dosis

citotóxica 50 ( $D_{50}$ ) del sobrenadante de *C. difficile* 117 cuando el porcentaje de desprendimiento es del 50 % ( $Fd=50$ ).

**Tabla 1:** Cálculo de los parámetros a y b mediante la ecuación 2, y determinación de la dosis 50.

<b>C. difficile</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>DD<sub>50</sub></b>
117	81,9634±2,9081	0,0394±0,0096	0,063±0,01

### Efecto de la mezcla microbiana y sus cepas aisladas frente a la actividad citotóxica de *C. difficile*.

Cuando se estudiaron los efectos de los microorganismos puros o la mezcla microbiana frente a la actividad biológica de *C. difficile* 117 no se obtuvieron diferencias significativas respecto al control con sobrenadante de *C. difficile* en ninguno de los casos (tabla 2). Considerando estos resultados se estudiaron los efectos de los sobrenadantes de la mezcla microbiana y sus cepas puras frente a la citotoxicidad de *C. difficile* 117. En la figura 2 se muestra el porcentaje de células desprendidas en función de la concentración de sobrenadante de *C. difficile* 117 en presencia de los sobrenadantes de la mezcla microbiana y sus cepas aisladas. Los sobrenadantes de *L. kéfir* 8348, *L. plantarum* 83114, *S. cerevisiae* 8112 y *K. marxianus* 8154 no contrarrestaron el efecto citotóxico de *C. difficile* 117. Como se observa en la figura 2 algunas de las curvas de actividad biológica en presencia de los sobrenadantes de los microorganismos, se encuentran superpuestas a la curva control de citotoxicidad. Sin embargo el sobrenadante de la mezcla microbiana y de *Lc. lactis* produjeron una neutralización del efecto citotóxico sobre las células. Es decir no hubo desprendimiento de las células al igual que en el control que contenía DMEM sin suplementar. En la tabla 3 muestra el

efecto de los sobrenadantes de los microorganismos puros y la mezcla microbiana, se observan los parámetros a y b de la ecuación de porcentaje de desprendimiento y el cálculo de la dosis 50.

**Tabla 2:** Cálculo de los parámetros a y b a partir de la ecuación hiperbólica. Determinación de la dosis 50. Efecto de los microorganismos puros sobre la toxina de *C. difficile*.

<b>cepas</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>D<sub>50</sub></b>
<b><i>C. difficile 117</i></b>	81,9634±2,9081	0,0394±0,0096	0,063±0,01
<b><i>L. plantarum</i></b>	81,9724±2,9281	0,0395±0,0096	0,063±0,01
<b><i>L.kefir</i></b>	81,0632±2,8181	0,0384±0,0100	0,065±0,01
<b><i>Lc. lactis</i></b>	81,8653±2,8981	0,0393±0,0102	0,064±0,01
<b><i>S. cerevisiae</i></b>	81,9623±2,9081	0,0394±0,0096	0,063±0,01
<b><i>K. marxianus</i></b>	80,9543±2,8174	0,0395±0,0102	0,063±0,01

El efecto producido por el sobrenadante de *Lc. lactis* fue idéntico al producido por la mezcla microbiana. Por tanto puede estimarse que el efecto de la mezcla microbiana frente a la citotoxicidad de *C. difficile 117* es debido a los productos metabólicos de *Lc. lactis 8221*. Banerje et al (2009) quien describieron que el sobrenadante libre de células de *L. bulgaricus* reduce la citotoxicidad producida por *C. difficile* ATCC 9689. Estos autores postulan como hipótesis que el efecto del sobrenadante de *L. bulgaricus* es debido a la presencia de uno o más péptidos bioactivos liberados por el lactobacilo durante su crecimiento. Según describen, estos péptidos podrían escindir en forma proteolítica a las toxinas o a los receptores de toxina, o bien podrían bloquear los receptores.

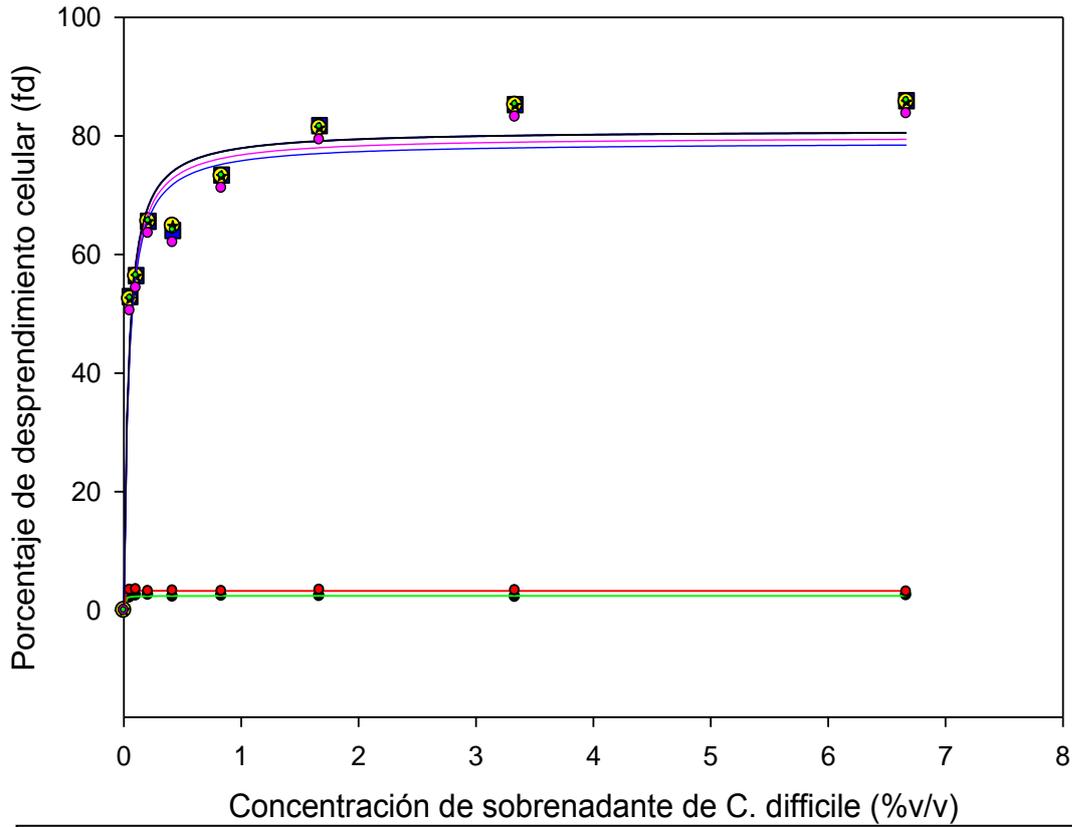


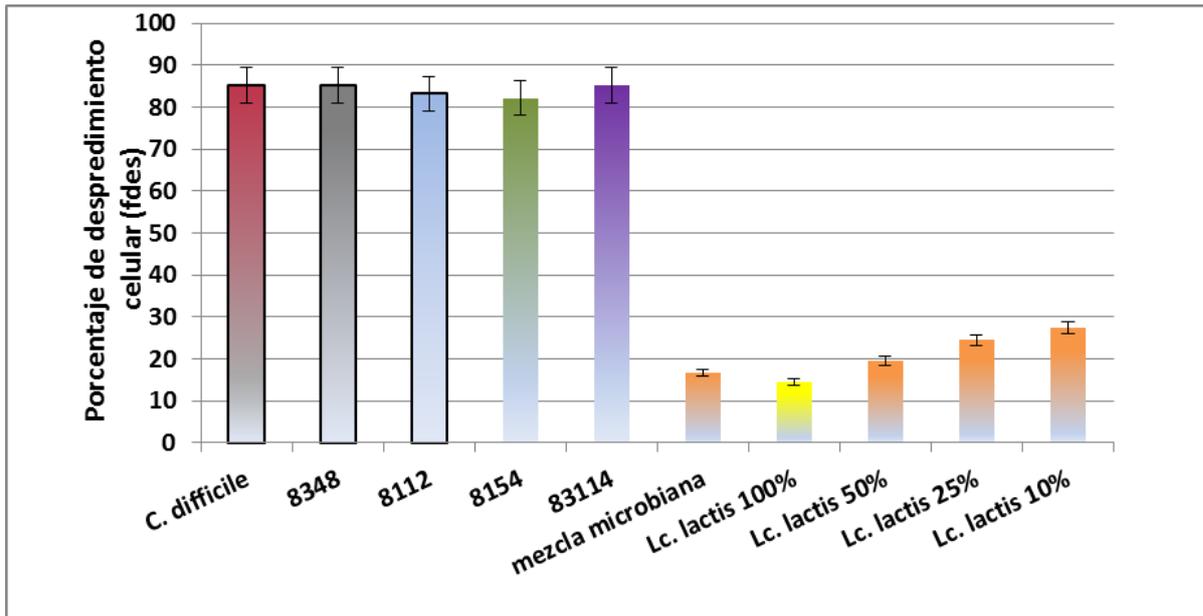
Figura 2. Actividad biológica de sobrenadante de *C. difficile*. Fracción de células desprendidas en función de la concentración de sobrenadante de *C. difficile* (%v/v) -●-. Curva ajustada por modelo hiperbólico  $Fd = \frac{aC}{b+C}$ . Sobrenadante de *L. plantarum* 83114 -▲-. Sobrenadante de *L. kefir* 8348 -●-. Sobrenadante de *Lc. lactis subsp lactis* 8221 -●-. Sobrenadante de *K. marxianus* 8154 -■-. Sobrenadante de *S. cerevisiae* 8112 -●-. Sobrenadante de mezcla microbiana -●-.

Tabla 3: Efectos de los sobrenadantes de los microorganismos puros frente a las toxinas de *C. difficile*. Cálculos de los parámetros a y b de la ecuación hiperbólica. Determinación de la dosis 50.

Sobrenadantes	a	b	D <sub>50</sub>
<b><i>C. difficile</i> 117</b>	81,9634±2,9081	0,0394±0,0096	0,063±0,01
<b><i>L. plantarum</i> 83114</b>	81,0262±2,9347	0,0394±0,0100	0,063±0,01
<b><i>L. kefir</i> 8348</b>	80,9634±2,8191	0,0394±0,0096	0,063±0,01
<b><i>S. cerevisiae</i> 8112</b>	79,8938±2,9115	0,0404±0,0102	0,068±0,01
<b><i>K. marxianus</i> 8154</b>	78,9423±2,9073	0,0413±0,0105	0,071±0,01

A fin de determinar un efecto de dosis se utilizaron diluciones del sobrenadante de *Lc. lactis subps lactis* 8221 en BHI fresco de manera de obtener concentraciones de 100%, 50%, 25% y 10% v/v. Cuando se fija la concentración del sobrenadante de *C. difficile* a 3, 5%, se observó que el sobrenadante de *Lc. lactis* disminuyó el desprendimiento celular en un 70% aproximadamente respecto al control. A medida que se diluye el sobrenadante de *Lc. lactis* el porcentaje de desprendimiento va en aumento. Al diluir el sobrenadante de *Lc. lactis* de manera que su concentración es del 10%, el porcentaje de desprendimiento aumenta significativamente respecto al tratamiento con el sobrenadante de *Lc. lactis* 100%. Sin embargo, aún en la concentración más diluida del sobrenadante de *Lc. lactis*, se mantiene el efecto protector frente a la citotoxicidad de *C. difficile* al disminuir el desprendimiento celular entre un 60% y un 70% (figura 3).

Estos metabolitos podrían actuar clivando la toxina o bien impidiendo que se entre en contacto con las células. Este estudio muestra que a medida que se diluyen estos metabolitos, el efecto protector disminuye. Si bien los efectos protectores de la mezcla microbiana se le pueden atribuir a *Lc. lactis*, es importante destacar que la presencia de los microorganismos restantes no afecta sinérgicamente ni antagónicamente a los metabolitos de *Lc. lactis*. Los metabolitos liberados por *Lc. lactis* son capaces de proteger a las células Vero de la toxina de *C. difficile*.

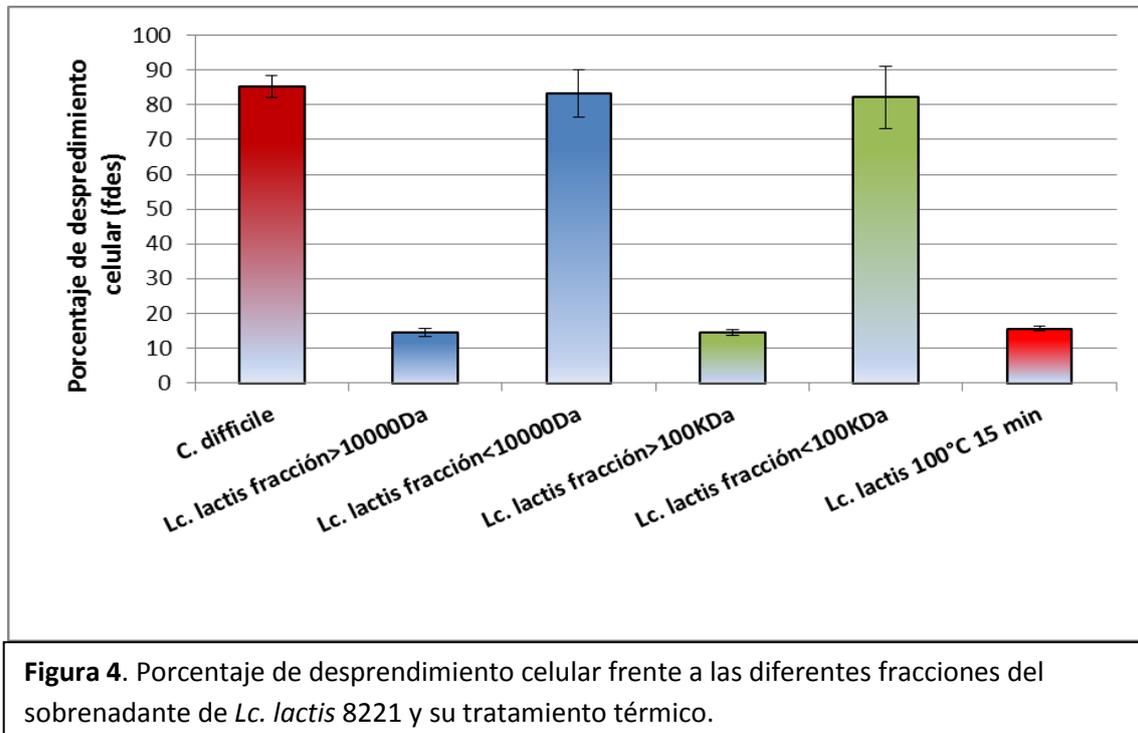


**Figura 3.** Porcentaje de desprendimiento celular (fdes) en función de los Sobrenadante de *L. plantarum* 83114 -■-. Sobrenadante de *L. kefir* 8348 -■-. Sobrenadante de *Lc. lactis subsp lactis* 8221 -■-. Sobrenadante de *K. marxianus* 8154 -■-. Sobrenadante de *S. cerevisiae* 8112 -■-. Sobrenadante de mezcla microbiana -■-. Sobrenadante de *Lc. lactis subsp lactis* 8221 100% -■-. Sobrenadante de *Lc. lactis subsp lactis* 8221 50% -■-. Sobrenadante de *Lc. lactis subsp lactis* 8221 25% -■-. Sobrenadante *Lc. lactis subsp lactis* 8221 10% -■-. Para una concentración de sobrenadante de *C. difficile* de 3,5%v/v -■-

### Efectos de las diferentes fracciones de sobrenadante de *Lactococcus lactis* sobre la actividad citotóxica de *C. difficile*.

Considerando que el sobrenadante de *Lc. lactis subsp lactis* 8221 actúa disminuyendo el efecto citotóxico de *C. difficile*, se estudió con mayor profundidad las características de los metabolitos que presenta dicho efecto. Cuando se evaluaron las dos fracciones del sobrenadante de *Lc. lactis* 8221 obtenida por pasaje a través por una membrana de celulosa, sólo la fracción mayor a 10000Da mantuvo el efecto protector frente a las toxinas de *C. difficile* (figura 4). La fracción menor a 10 KDa se comportó como el control de toxina, es decir no tuvo efecto protector contra la actividad biológica de las toxinas. Como puede verse en la figura 5 cuando se separó la fracción de 10 KDa en dos fracciones de mayor y menor peso molecular que 100 KDa, solo la fracción de mayor peso molecular

preservó el efecto. A su vez, cuando a esta fracción mayor 10 KDa se le realizó un tratamiento térmico a 100°C durante 15min perdió su efecto. Esto da idea de una desestabilización térmica del metabolito causante de la protección frente a la actividad citotóxica (Figura 4)



**Figura 4.** Porcentaje de desprendimiento celular frente a las diferentes fracciones del sobrenadante de *Lc. lactis* 8221 y su tratamiento térmico.

Castagliuolo et al (1996) informó que una serinproteasa de 54 kDa de *S. boulardii* digiere la toxina A de *C. difficile* *in vitro*. Posteriormente demostró que dicha proteasa, además de la escisión de la toxina A, posee actividad enzimática contra la toxina B de *C. difficile* impidiendo su efecto sobre la mucosa intestinal. Se podría postular que *Lc. lactis* CIDCA 8221 produce una proteasa con actividad referida a destruir las toxinas de *C. difficile*. Esta hipótesis se está tratando de dilucidar experimentalmente. Existen reportes sobre la presencia de diferentes peptidasas o serino proteasas sintetizadas por *Lc. lactis* (Jeffrey E.1999, Poquet et al, 2000, Foucaud-Scheunemann y Poquet, 2003) sin embargo no hay antecedentes respecto a los efectos de estas proteasa sobre toxinas de *C. difficile*.

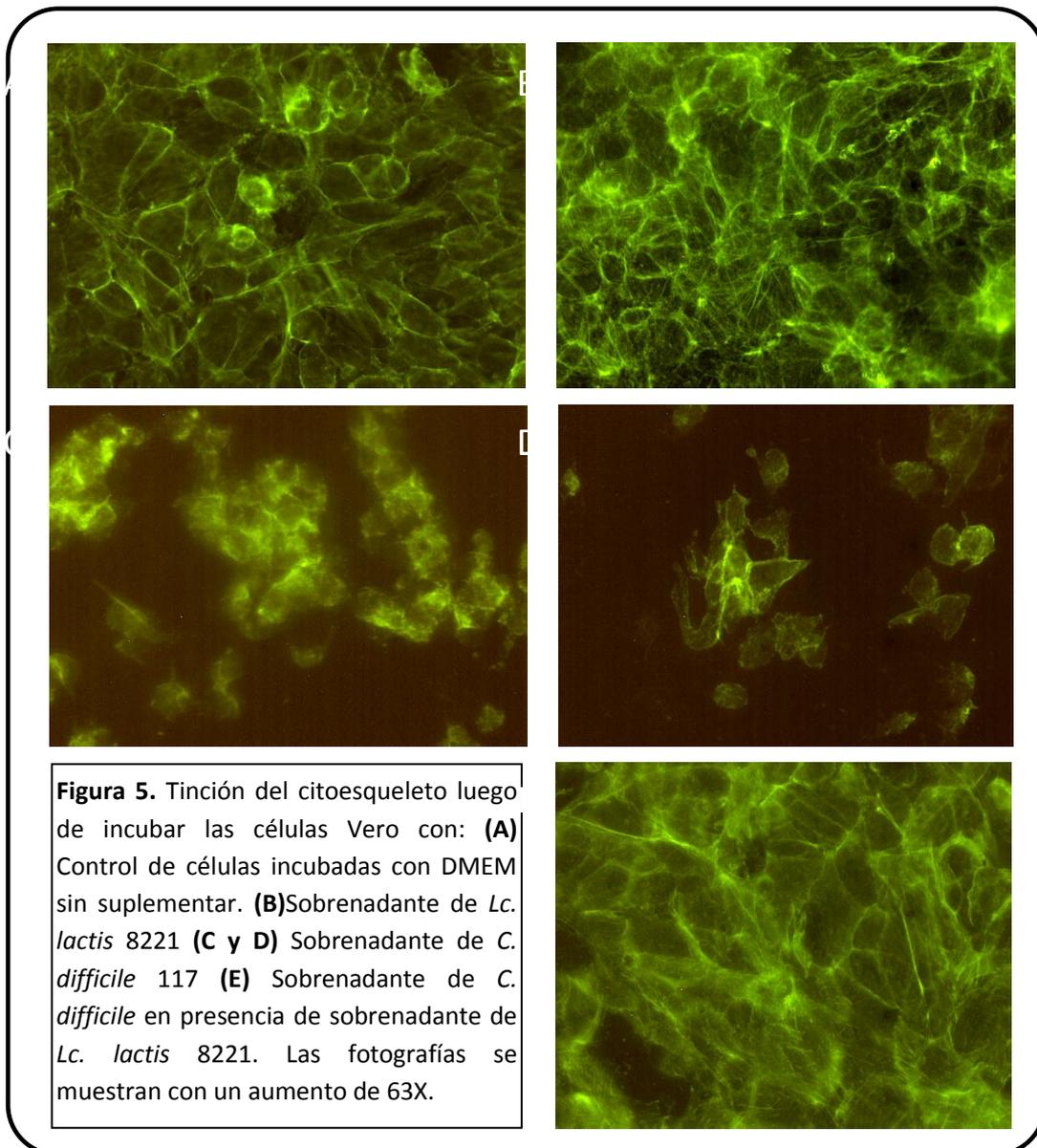
## Marcación fluorescente del citoesqueleto

Las moléculas Rho son blanco de las toxinas A y B de *C. difficile* las cuales glucosilan a la proteína comprometiendo la traducción de señales asociada con la apoptosis y mantenimiento de los filamentos de actina. La alteración de la actina conduce a la pérdida de la unión célula-célula incrementando la permeabilidad celular. Como consecuencia se observa un citoesqueleto colapsado produciendo redondeo y posterior muerte celular (Pothoulakis y Lamont 2001; Chang y Bartlett 1979; Fiorentini et al, 1990).

En la figura 5 se observa la tinción del citoesqueleto de las células Vero en presencia del sobrenadante de *C. difficile* puro y tratado con sobrenadante de *Lc. lactis*. El sobrenadante de *C. difficile* 117 tuvo efectos profundos sobre las células Vero. El efecto citopático abarca desde la desorganización de la red de actina hasta el redondeo y desprendimiento celular. El sobrenadante de *C. difficile* 117 provoca sobre las células una desorganización de la red de F-actina con la consiguiente pérdida de la unión estrecha entre células lo que muestra un marcado efecto citopático cuando se lo compara con el control de células sin tratar (figura 5D y 5B respectivamente). Sin embargo cuando se co-incuba el sobrenadante de *Lc. lactis* con el de *C. difficile* sobre las células Vero no se observa desorganización del citoesqueleto, siendo comparable al control sin tratar. Se mantiene la morfología celular, la unión entre células y la integridad de la monocapa (figura 5C y 5B). Por otro lado se evaluó el efecto del sobrenadante de *Lc. lactis* 8221 sobre las células (figura 5A) no observándose cambios respecto al control sin tratar (figura 5B).

De los resultados obtenidos se desprende que Los microorganismos o la mezcla microbiana no protegen a las células Vero de las toxinas de *C. difficile*. Sin embargo los sobrenadantes de la mezcla microbiana y *Lc. lactis* protegieron a las células de la

actividad citotóxica de *C. difficile*. Respecto a las características de los metabolitos responsable de este efecto se concluye que presenta un peso molecular mayos a 100KDa y que es lábil al calor, sin embargo, aún resta realizar más estudios para determinar su naturaleza. La estructura de la red de actina de las células Vero se mantuvo intacta cuando son tratadas con del sobrenadante de *Lc. lactis* independientemente de la actividad citotóxica de *C. difficile*.



En diferentes cepas de *Lc. lactis* se han descripto metabolitos de características proteicas entre los que se pueden mencionar, las

bacteriocinas, las nisinas y peptidasas. Las bacteriosinas generalmente actúan sobre el patógeno inhibiendo la producción de toxinas (Montville et al 1998, Chikindas et al 1993). Sin embargo las peptidasas sintetizadas por *Lactococcus lactis* desestabilizan a las proteínas que forman parte de la leche. Si bien no se le han adjudicado efectos probióticos, podría pensarse que alguna de estas peptidasas podrían ser capaz de clivar a las toxinas producidas por *C. difficile*. Estas peptidasas tienen pesos moleculares mayores a 300KDa. (Mistou 1994) Otros autores han descrito un sistema proteolítico en *Lactococcus lactis* con capacidad de proteolizar la leche (Mengjin et al 2010)

## Conclusiones

- ❖ La actividad citotóxica de *C. difficile* sobre las células Vero no se vió afectada por mezcla microbiana y los microorganismos puros.
- ❖ Los sobrenadantes de la mezcla microbiana y de *Lc. lactis* protegieron a las células vero de las toxinas de *C. difficile*.
- ❖ Los metabolitos presentes en el sobrenadante de *Lc. lactis* que provocan el efecto protector, tienen un peso molecular mayor a 100KDa y son lábiles al calor.
- ❖ El sobrenadante de *Lc. lactis* protegió a las células de las toxinas de *C. difficile* manteniendo la red de actina intacta.

# CAPÍTULO IV

Efecto de la mezcla microbiana  
frente la infección con *C.*  
*difficile (in vivo)*

## Introducción

*Clostridium difficile* es un patógeno humano, cuya importancia va en aumento. Causa infecciones gastrointestinales con síntomas que van desde la colonización asintomática a diarrea grave, colitis pseudomembranosa, o la muerte (Barbut et al 2007; Barlett et al 1977). *C. difficile* forma parte de la microbiota intestinal normal en un pequeño número de individuos sanos y algunos pacientes hospitalizados. La enfermedad se desarrolla en los individuos que reciben antibióticos debido a que estos fármacos alteran la microbiota entérica normal, permitiendo el crecimiento excesivo de estos microorganismos relativamente resistentes, o haciendo al paciente más vulnerable a la adquisición exógena de *C. difficile*. La enfermedad se desarrolla cuando el microorganismo prolifera en el colon y sintetiza sus toxinas en el mismo (Spencer 1998). La patogenicidad de *C. difficile* se ha atribuido en gran medida a dos exotoxinas, una enterotoxina (toxina A) y una citotoxina (toxina B) (Giannasca et al 1999; Kink et al 1998). La enterotoxina es quimiotáctica para los neutrófilos, con infiltración de polimorfonucleares en el íleon, lo que da lugar a la liberación de citoquinas. Asimismo, la toxina A ejerce un efecto citopático que altera la unión intercelular estrecha, incrementa la permeabilidad de la pared intestinal, y produce una ulterior diarrea. La citotoxina provoca la despolimerización de la actina, con posterior destrucción del citoesqueleto celular tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*. A pesar de que ambas toxinas parecen interactuar de manera sinérgica en la patogenia de la enfermedad, las cepas negativas para la enterotoxina A aún son capaces de producir enfermedad. Por otra parte, la producción de una o ambas toxinas no parece bastar para

provocar enfermedad; por ejemplo, el estado de portador de *C. difficile* y la presencia de concentraciones elevadas de toxinas son frecuentes en los niños pequeños, mientras que la enfermedad no lo es.

El diagnóstico de la infección por *C. difficile* se confirma mediante la demostración de la presencia de la enterotoxina o la citotoxina en una muestra fecal procedente de un paciente con síntomas clínicos compatibles con esta entidad. Asimismo, la presencia de la citotoxina se puede detectar mediante un análisis de citotoxicidad *in vitro* basado en células de cultivo. Otros factores de virulencia de *C. difficile* se resumen en la tabla 1.

**Tabla 1.** Factores de virulencia de *Clostridium difficile*.

<b>Factor de virulencia</b>	<b>Actividad biológica</b>
Enterotoxina (toxina A)	Produce quimiotaxis; induce la producción de citocinas con hipersecreción de fluido, produce necrosis hemorrágica.
Citotoxina (toxina B)	Induce la despolimerización de la actina con la pérdida del citoesqueleto celular.
Factor de adhesión	Interviene en la unión a las células colónicas humanas
Hialuronidasa	Produce actividad hidrolítica
Formación de esporas	Permite la supervivencia del microorganismo durante meses en el medio hospitalario

---

A pesar del tratamiento antibiótico adecuado, alrededor de 10-40% de los pacientes con diarrea antibiótica por *Clostridium difficile* (DACD) experimentarán recurrencia de la enfermedad, sobre todo con la misma cepa, lo que sugiere un fracaso para eliminar completamente el patógeno de la zona gastrointestinal. Los factores de riesgo de recaída incluyen una reducción de los Anticuerpos IgG contra la toxina A en el suero (Kyne, 2001; Katchar, 2007). Por ese motivo, en la prevención de las infecciones causadas por *C. difficile* se han empleado terapias alternativas, como la administración de probióticos. Los probióticos se encuentran en una gran gama de productos como yogures, las leches fermentadas, polvos y cápsulas. El uso de probióticos como complemento de los medicamentos es cada vez más utilizado, y existen datos relevantes que sustentan el uso de probióticos en enfermedades como la gastroenteritis pediátrica aguda (Szajewska, 2007; Szajewska, 2007), enterocolitis necrotizante, colitis ulcerosa (Alfaleh, 2008; Hedin, 2007; Kruis, 2004), y síndrome de intestino irritable (Kajander, 2008).

Dentro de los probióticos empleados para combatir la infección por *C. difficile* podemos mencionar a *Saccharomyces boulardii*, levadura que administrada 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).

Muchos de los mecanismos por los cuales ciertas bacterias probióticas antagonizan los efectos de patógenos aún no han sido dilucidados completamente. En el caso particular de *C. difficile*, como se mencionó anteriormente, se han empleado diferentes agentes probióticos en terapias preventivas. Aun así, no queda claro cuáles serían los mecanismos por los cuales dichas terapias probióticas ejercen su acción contra las infecciones por *C. difficile*.

Los estudios *in vivo* con modelos animales son los que ofrecen la mejor oportunidad para comprender la interacción dinámica entre el patógeno y el huésped.

Entre las especies más utilizadas para el estudio de las lesiones ocasionadas por la infección, espontánea o inducida con antibióticos, por *C. difficile* se destaca el hámster (Larson et al., 1978), el cobayo (Low et al., 1980), el ratón (Naaber et al., 1995), la rata (Czuprynski et al., 1983) y el conejo (Carman et al., 1984). Sin embargo, la especie más sensible a la infección por este patógeno es el hámster sirio (*Mesocricetus auratus*) el cual es capaz de desarrollar la enfermedad con la sola exposición a un ambiente contaminado por *C. difficile* (Rheg y Lu, 1982). Además, el hámster es considerado un modelo importante para la investigación de *C. difficile* (2, 18, 27) en parte porque muchos de los síntomas clínicos en seres humanos, como diarrea, daño histológico, y la recaída después de retiro del tratamiento, se pueden observar en este modelo. Existen pocos modelos disponibles para realizar estudios sobre *C. difficile* y posibles agentes protectores contra tal infección. El modelo en hámster inducido por clindamicina, imita los aspectos de la enfermedad en seres humanos y ha sido ampliamente utilizado para prueba de la virulencia. 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).

En el modelo inducido por clindamicina, los animales comienzan a desarrollar colitis, letargia y finalmente un cuadro de colitis fulminante que desencadena la muerte del animal a partir de los pocos días post infección con *C. difficile*. Esto no sólo depende de la dosis de infección, sino también de la toxigenicidad de la cepa de clostridio utilizada (Bartlett 1978). En ocasiones, las manifestaciones de la infección pueden comenzar con una cecitis hemorrágica, "cola húmeda" (un signo de diarrea en hámsters), pero los hámsters con frecuencia mueren precipitadamente luego de la infección (a menudo

sin signos de cola mojada), cuando son infectados con cepas altamente virulentas de *C. difficile* (Razaq et al 2007, Sambol et al, 2001). Dada la alta tasa de mortalidad, un aumento de la supervivencia es el principal objetivo del modelo.

## Objetivos

- ❖ Estudiar la capacidad de la mezcla microbiana de proteger contra la infección por *Clostridium difficile* en un modelo *in vivo*.

## Materiales y Métodos

### 1-Suspensiones de *C. difficile*

Se partió de un cultivo de 24 horas de la cepa 117 de *C. difficile* en caldo BHI. Se inocularon 500 µl de este cultivo en 50 ml de BHI fresco suplementado con cisteína al 0,05% y se incubaron a 37 °C en anaerobiosis durante 24 horas. El cultivo así obtenido se centrifugó durante 10 min a 12000 g. El sobrenadante se desechó y el pellet bacteriano se resuspendió en 4 ml de PBS estéril. Se realizó recuento en cámara de Neubauer y se ajustó la concentración de la suspensión a un valor de  $10^9$  microorganismos/ml.

### 2- Suspensión de la mezcla microbiana

Para obtener la suspensión de mezcla microbiana que sería administrada a los hamsters, se inocularon 10 ml de cultivo de cada una de las cepas que la constituyen en 1L de los medios correspondientes y se incubaron a 30°C durante 24 horas. Los cultivos así obtenidos se centrifugaron durante 10 minutos a 12000 x g a 4 °C y los sobrenadantes se descartaron. Los respectivos pellets bacterianos se lavaron 2 veces con buffer PBS estéril, centrifugando a 12000 g a 4 °C cada vez. Las bacterias finalmente se resuspendieron en 50 ml de PBS estéril más 5 ml de sacarosa 3M estéril como crioprotector. La suspensión resultante se distribuyó en criotubos estériles, los cuales se almacenaron a -80 °C hasta su utilización. En los frascos conteniendo el agua de bebida de los hamsters junto con las bacterias, al cabo de 24 horas no se observaron disminuciones significativas en el número de bacterias viables. Esto

aseguró la administración de una suficiente cantidad de microorganismos viables durante todo el estudio.

### **3.- Animales Empleados**

Los animales utilizados fueron hámsters (Outbred Syrian hamster, Golden, Cpz: SYR , *Mesocricetus Auratus* ) hembras de 45 a 60 días de edad, provenientes del Laboratorio Azul Diagnóstico, pertenecientes a la categoría de animales convencionales. Los mismos fueron trasladados al bioterio de experimentación de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas de La Plata. Los hámsters se mantuvieron durante el curso del experimento en un sistema bajo barreras para evitar contaminaciones cruzadas y externas. Todos los procedimientos efectuados fueron realizados de acuerdo a las normas internacionales para el trabajo con animales de experimentación. Los animales recibieron agua y alimento estéril *ad libitum*. Fueron mantenidos en un período de adaptación al nuevo bioterio durante 10 días previos a comenzar los protocolos de experimentación para lograr disminuir de esta forma el estrés causado por el transporte y las nuevas condiciones de alojamiento.

### **4-Inducción de enterocolitis por *C. difficile*.**

A fin de estudiar la respuesta de los animales a la administración de *C. difficile*, se infectaron los hamsters Outbred Syrian con la cepa 117, de acuerdo al protocolo descrito por Trejo en su Tesis Doctoral (2009). Para ello los animales fueron inicialmente sometidos a tratamiento con antibiótico (Larson et al, 1990). Cada animal recibió una única dosis intra-gástrica de 0,1 ml de solución de clorhidrato de clindamicina (ParaFarm, Argentina). La solución de antibiótico se preparó en PBS, a una concentración de 2mg/ml. Cuatro días después, los animales se infectaron con 0,1 ml de la suspensión de *C.*

*difficile* por vía intragástrica ( $10^8$  bacterias/animal). Se observó la evolución de los animales, evaluándose el peso, el desarrollo de diarrea y la supervivencia de los mismos. Los animales se sacrificaron al día 10 de iniciado el tratamiento con antibiótico.

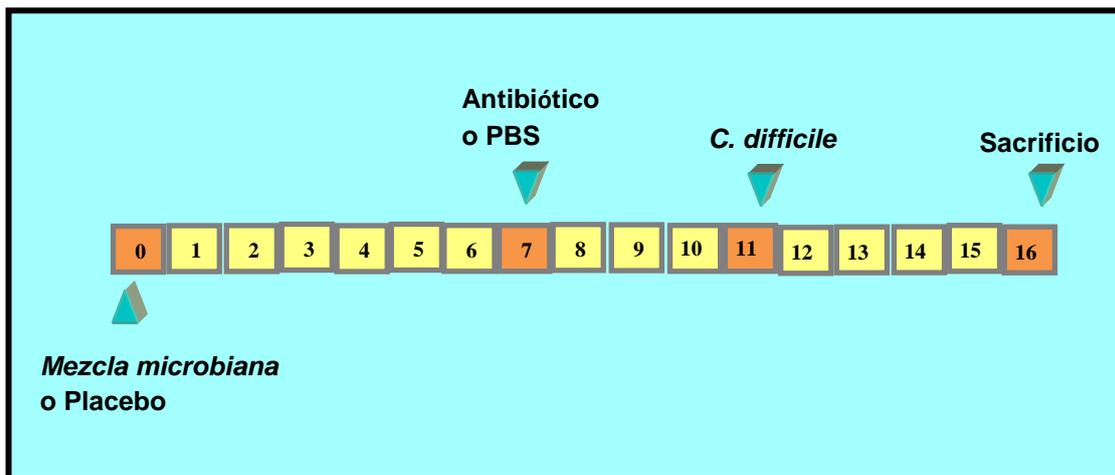
## 5 - Efecto protector de la mezcla microbiana sobre la infección por *C. difficile*.

Para estudiar el efecto de la mezcla microbiana sobre la infección de *C. difficile*, los animales se dividieron en lotes conteniendo cada uno 7 hamsters. La mezcla microbiana se administró en el agua de bebida, y se estudiaron diferentes diluciones (1/100, 1/500 y 1/1000) de la misma, cuya concentración inicial fue de  $1 \times 10^{11}$  UFC/ml de bacterias y  $1 \times 10^8$  UFC/ml de levaduras. Los animales recibieron los siguientes tratamientos: MM, administración de suspensión de mezcla microbiana en el agua de bebida (MM<sub>100</sub>, dilución 1/100; MM<sub>500</sub>, dilución 1/500 y MM<sub>1000</sub>, dilución 1/1000); MMI, administración de suspensión de mezcla microbiana (MMI<sub>100</sub>, dilución 1/100; MMI<sub>500</sub>, dilución 1/500 y MMI<sub>1000</sub>, dilución 1/1000) y posterior infección con *C. difficile* ( $1 \times 10^9$  UFC/animal, día 11); CI, administración de placebo (sacarosa 300mM) y posterior infección con *C. difficile* ( $1 \times 10^9$  UFC/animal, día 11); CA y C, administración de placebo (sacarosa 300mM) y posterior administración de PBS por vía intragástrica (día 11). Todos los animales, excepto el lote C, fueron tratados con 200 $\mu$ g de clindamicina al día 7 de iniciado el tratamiento, tal como se describió en el punto 4. En la Tabla 1 se resumen los tratamientos recibidos por cada uno de los lotes incluidos en el ensayo. Los resultados que se mostrarán oportunamente, corresponden a la realización de al menos dos experimentos independientes.

**Tabla 1:** Tratamiento empleado en cada lote de hamsters

Lote	Mezcla microbiana	Clindamicina 2%p/v	<i>C.difficile</i> 117
MM	X	X	--
MMI	X	X	X
CI	--	X	X
CA	--	X	--
C	--	--	--

Los animales sobrevivientes al día 16 de iniciado el experimento (5 días post-infección), se sacrificaron, evaluándose los principales marcadores de la infección. En todos los casos se evaluó el estado general de los animales, el cambio de peso, la aparición de diarrea y muerte. A continuación se resume el protocolo de experimentación:



## 6-Marcadores de la infección

Los principales signos evaluados para determinar el estado de los animales fueron diarrea leve o intensa según el tamaño de la aureola anal, el peso de los animales a lo largo del experimento y la supervivencia de los mismos. También se realizó el recuento de *C. difficile* en materia fecal. Para ello se realizaron diluciones seriadas de

la materia fecal de los animales en PBS y se sembraron en agar DMCR (Differential Medium Clostridial Reinforced, Britania S.A, Argentina). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 hs en anaerobiosis (AnaeroPack, Mitshubishi Gas Chemical Co, Inc). Se evaluó la morfología de la colonia y también se realizó una observación microscópica de las mismas.

## **7-Determinación de la actividad biológica**

Para determinar la presencia de toxinas en contenidos intestinales se realizaron ensayos de actividad biológica sobre células en cultivo. Para ello, durante la necropsia se tomaron muestras de los contenidos de ciego de los animales las cuales se diluyeron en igual volumen de buffer PBS, se mezclaron enérgicamente para favorecer la homogeneización y se filtraron por membrana de 0,45 µm. Los filtrados así obtenidos se estudiaron para determinar su actividad biológica según se describe a continuación.

Para la detección de toxinas se empleó el ensayo biológico sobre células Vero según se describe en el Capítulo III. Las células Vero se crecieron en placa de cultivo celular de 96 fosas durante 48 horas. Se prepararon diluciones seriadas 1/2 de los filtrados fecales en DMEM sin suplementar, y las mismas se agregaron a las fosas conteniendo las células. Las placas se incubaron en estufa con atmósfera de 5 % CO<sub>2</sub> y Determinó la citotoxicidad a partir de la coloración con cristal violeta como se describió en el capítulo III.

## **8-Estudios histológicos**

Durante la necropsia se extirparon muestras de ciego y se fijaron en etanol al 96°, se deshidrataron y se incluyeron en Histoplast (Biopack, Argentina). Se realizaron cortes histológicos de 3–5 µm de

espesor, los cuales se desparafinaron, hidrataron y se colorearon con Hematoxilina–Eosina para su observación microscópica.

### Coloración con hematoxilina eosina

#### Desparafinización

- ✚ Xileno (3 veces durante 5 minutos).
- ✚ Etanol absoluto (2 veces durante 2 minutos)
- ✚ Etanol 96° (2 veces durante 2 minutos)
- ✚ Agua destilada (1 minuto)

#### Coloración

- ✚ Colocar en solución de hematoxilina durante 5 min.
- ✚ Lavar con agua de canilla durante 3 minutos.
- ✚ Colorear con solución de eosina durante 30 seg.
- ✚ Sumergir en agua de canilla durante 30 seg.
- ✚ Deshidratar en etanol (96° durante 2 min; etanol absoluto: 2 veces durante 2 minutos).
- ✚ Montar en portaobjeto empleando bálsamo de canada.

Para la observación de los cortes histológicos se consultó a la Médica Patóloga Ma. de los Ángeles Bolla perteneciente al servicio de patología del Hospital Higa Rossi de la ciudad de La Plata.

## 9- Estudio de mieloperoxidasa

A fin de determinar el daño causado sobre los animales por el *C. difficile* y el posible efecto protector de la mezcla microbiana, se determinó la actividad enzimática de la mieloperoxidasa. Durante la necropsia de cada tratamiento se tomó una sección de 1 a 2 cm de tejido intestinal, se determinó la masa, se lavó con buffer PBS y se homogeneizó en buffer MPO (50 mM de acetato de sodio pH 5.4). Se colocaron 100 µl de la muestra más 50 µl del reactivo A (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 60 mM en buffer citrato 50 mM) más 50 µl del reactivo B (tetrametilbencidina

TMB 0,01M en HCl 0.1N). Se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción con 50 µl de ácido sulfúrico 2N. Se leyó la absorbancia a 405 nm centrifugando las muestras previamente.

Por otro lado se determinaron las proteínas totales por Bradford. Los resultados se expresan en actividad específica (actividad mieloperoxidasa/ mg de proteínas totales).

## Método de Bradford

### 1- Reactivo de Bradford:

Azul de coomasie G-250	5mg
Etanol	2,5ml
Ácido fosfórico	5ml
Agua	hasta 50 ml

Filtrar la solución antes de usar.

2- **Patrón de albúmina.** Disolver 10 mg de albúmina bovina en 10 ml de agua destilada.

## Método

- 1- Preparar una curva de calibración con el patrón de albúmina en un rango de 0 hasta 60 mg, de manera que el volumen final de cada tubo sea 300 µl.
- 2- Preparar tres diluciones de la muestra. Finalmente añadir 3 µl de reactivo de Bradford a todos los tubos. Agitar y proceder a leer la absorbancia a 595 nm.

## 10- Análisis Estadístico

Los resultados se expresaron como proporciones, es decir, números de eventos positivos del parámetro considerado respecto del número total de individuos en la población: Los resultados se analizaron utilizando el análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias significativas fueron establecidas mediante el test de Fisher

## Resultados y Discusión

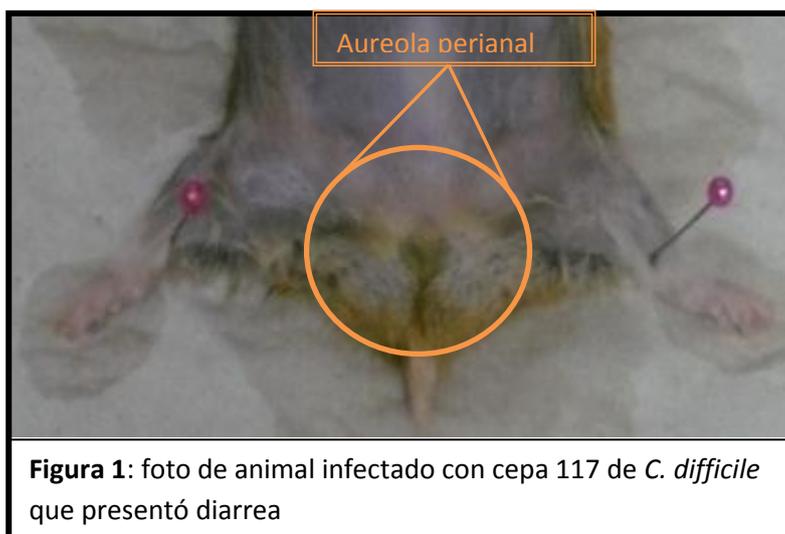
### 1-Inducción de enterocolitis por *C. difficile*

Al analizar los resultados obtenidos con el lote CI, se observó que a los 3 días posteriores a la infección con la cepa 117 de *C. difficile* los animales presentaron un descenso de peso de 10 a 15 g, y letargia, sólo uno de los 7 animales presentó diarrea. A los cinco días post- infección todos los animales del lote desarrollaron diarrea y 5 de ellos murieron, y el descenso de peso promedio fue de aproximadamente 20 g (Tabla 2).

**Tabla 2:** Evolución del peso promedio a lo largo del tratamiento de infección. El día 7 corresponde a la administración de antibiótico y el día 11 a la infección con *C. difficile*

Días	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>Pesos promedio (g) lote CI</b>	135.0	141.5	142.9	146.8	147.6	129.5	119.2	110.3
<b>Pesos promedio (g) lote C</b>	141.5	143	141.7	147	148.8	152.4	149.4	149.4

En la Figura 1 se muestra la fotografía de un animal que desarrollo diarrea intensa por infección con la cepa 117 de *C. difficile*.



Razag et al, 2007 describen que cuando los animales son tratados con clindamicina y luego infectados con cepas muy tóxicas de *C. difficile* o en dosis elevadas, el animal muere súbitamente sin manifestaciones de diarrea. Sin embargo cuando la infección, post- tratamiento con clindamicina, se realiza con cepas menos toxigénicas de *C. difficile*, se observa una aureola húmeda perianal, en corto plazo el animal muere (Ochsner et al, 2009). La cepa *C. difficile* 117 presenta un efecto citopático y una gran virulencia (Trejo, tesis doctoral, 2009). Esto es coincidente con nuestros resultados para la infección con la cepa 117. Es importante destacar que este comportamiento de los hamsters frente a la infección con la cepa de *C. difficile* 117 fue reproducible a lo largo de al menos 2 experimentos independientes.

## 2-Estudio de diferentes concentraciones de la mezcla microbiana frente a la infección por *C. difficile*

A fin de determinar el efecto de dosis, los grupos de animales que fueron tratados con la mezcla microbiana en dilución 1/100 presentaron una mortalidad de seis animales de un total de siete (6/7), una proporción aún mayor a la correspondiente al lote de control de infección (5/7) a los 5 días post-infección.

Los animales que se trataron con la dilución 1/500 y que luego fueron infectados con *C. difficile*, presentaron una mortalidad del 71% (5/7) un porcentaje similar al grupo de infección. Sin embargo en el grupo tratado con la mezcla microbiana en dilución 1/1000 y luego infectada con *C. difficile*, el porcentaje de animales muertos fue del 14 % (1/7) a los 5 días post-infección (Tabla 3). Por tanto los experimentos siguientes se realizaron administrando una dilución 1/1000 de la mezcla microbiana, de manera que la concentración final fue de  $1 \times 10^8$  UFC/ml bacterias y  $1 \times 10^5$  UFC/ml levaduras.

**Tabla 3:** Fracción de animales con diarrea y exánimes para las diferentes dosis de mezcla microbiana a los 5 días post-infección.

Tratamiento	Fd	Fm
Control de infección (iii)	6/7	5/7
MM <sub>100</sub> Mezcla microbiana 1/100 (i)	7/7	6/7
MM <sub>500</sub> Mezcla microbiana 1/500 (ii)	5/7	5/7
MM <sub>1000</sub> Mezcla microbiana 1/1000 (iii)	0/7	1/7
Sin tratamiento(iii)	0/7	0/7

Fd: fracción de animales que presentaron diarrea

Fm: fracción de animales muertos

i: representa el número de experimentos independientes para cada caso

### 3-Efecto protector de la mezcla microbiana sobre la infección por *C. difficile*

Como se mencionó anteriormente, los animales correspondientes al grupo tratado con *C. difficile* 117 (lote CI) comenzaron a presentar síntomas de letargia, malestar, deshidratación y diarrea luego del tercer día post-infección. Al quinto día post-infección se evaluó el

número de animales muertos y de animales con diarrea mediante la observación de la zona perianal, independientemente del estado fisiológico. En esta etapa se evidenciaron signos de deshidratación y letargia, la mortalidad del lote CI fue del 71% (5/7), con una proporción de animales con diarrea del 87% (6/7) (Tabla 4). En la evaluación de los mismos parámetros para aquellos animales tratados previamente con la mezcla microbiana MMI se observó que solo un animal desarrolló diarrea a lo largo del tratamiento 14% (1/7). Todos los animales tratados con esta mezcla vivieron hasta el final del tratamiento. Cuando se realizó la necropsia se observaron características similares a los animales centinelas (lote C), es decir sin signos de diarrea ni infección. Características idénticas se observaron en los animales tratados con la mezcla microbiana y que no fueron infectados con *C. difficile* (lote MM).

**Tabla 4:** Fracción de animales muertos y con diarrea para los distintos tratamientos.

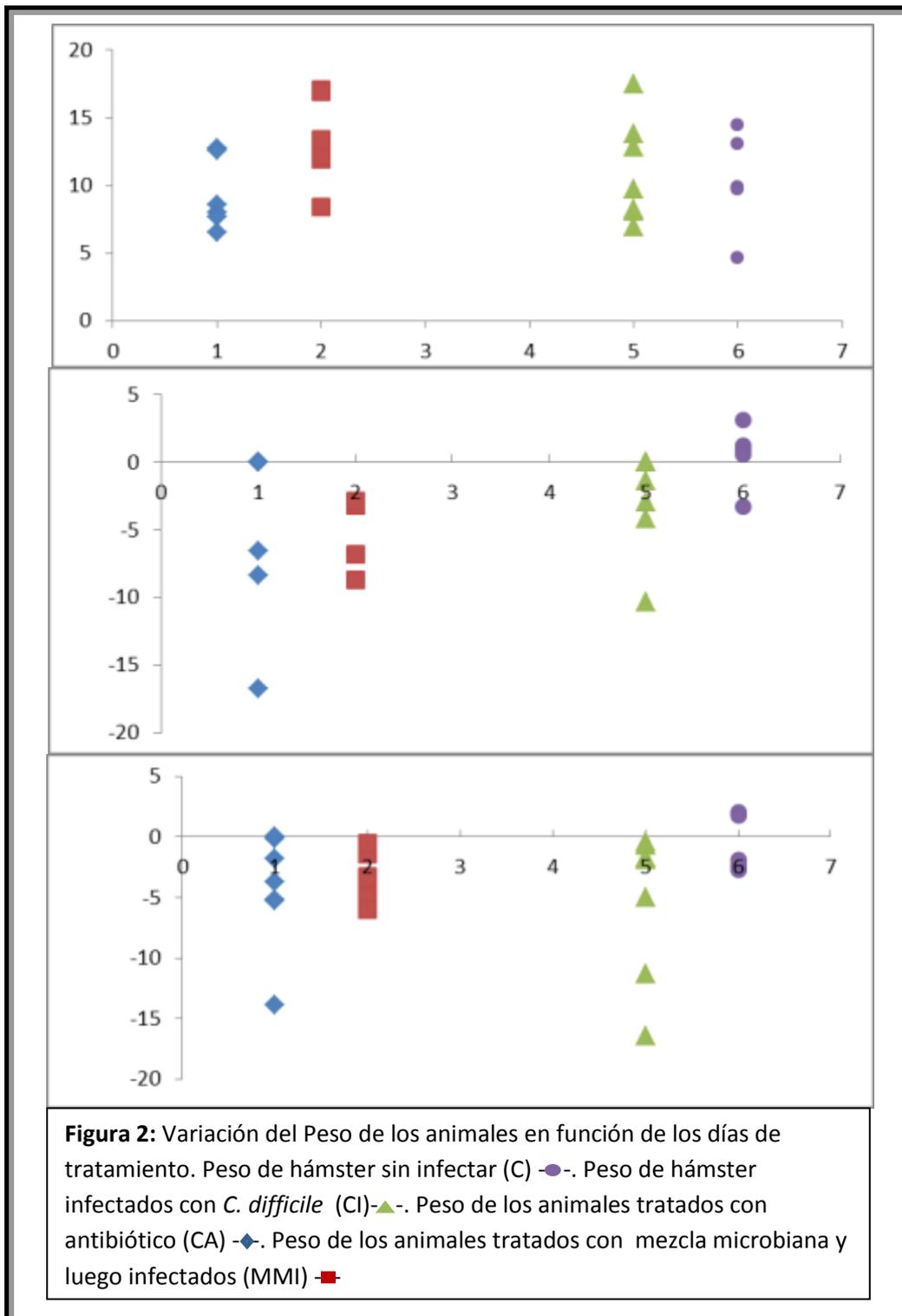
<b>Tratamiento</b>	<b>Fd</b>	<b>Fm</b>
Infectados <i>C. difficile</i> 117 (CI)	6/7	5/7
Control sin Antibiótico (C)	0/7	0/7
Mezcla microbiana+ATB+Infección (MMI)	1/7	0/7
Mezcla microbiana+ATB (MM)	0/7	0/7
Control de antibiótico (CA)	5/7	2/7

Fd: fracción de animales con diarrea

Fm: fracción de animales muertos

Con respecto al efecto del tratamiento con antibiótico, los controles a los cuales se les administró clindamicina pero no fueron infectados (lote CA), presentaron diarrea y el 28% de ellos murieron antes de finalizar el tratamiento (Tabla 4). Sin embargo, los animales tratados

con antibiótico y mezcla microbiana (lote MM) no desarrollaron diarrea ni murieron a lo largo del tratamiento. Por lo tanto puede deducirse que la mezcla microbiana ( $1 \times 10^8$  UFC/ml bacterias y  $1 \times 10^5$  UFC/ml levaduras) no solo protege de la infección con *C. difficile*, sino que también protege frente a la diarrea inducida por el tratamiento antibiótico.

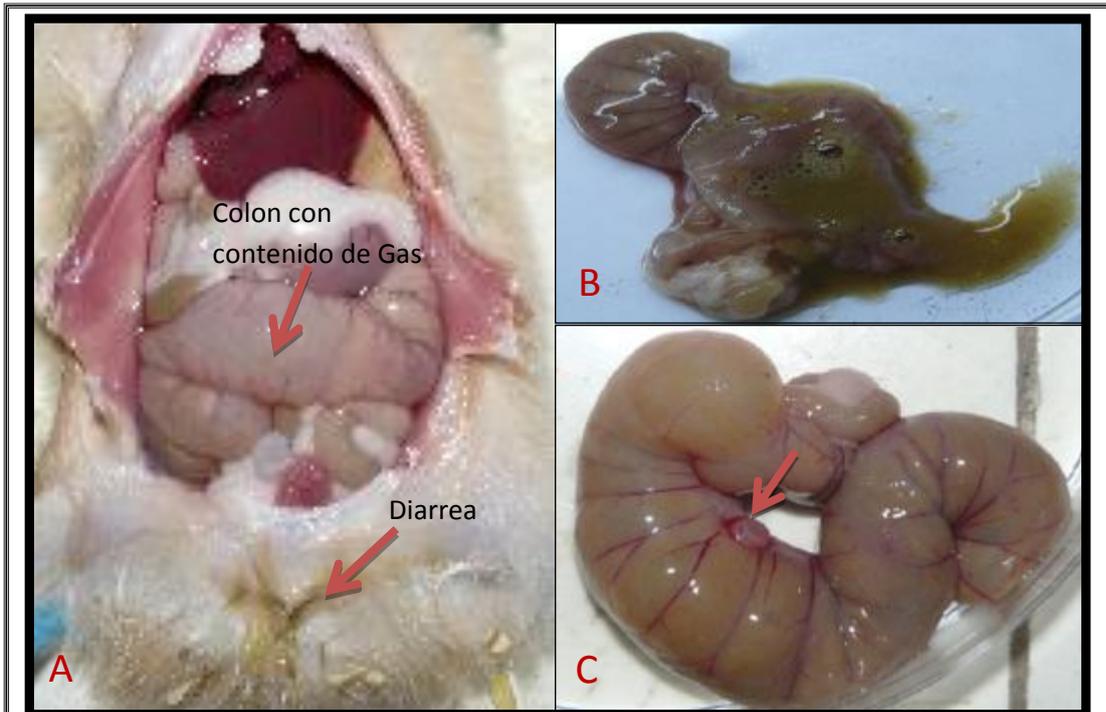


Como se mencionó anteriormente, un importante parámetro del deterioro del animal debido a la infección por *C. difficile* es el descenso de peso. La Figura 2A corresponde a los pesos de los animales al décimo día de iniciado el tratamiento; la Figura 2B, a los 3 días post-infección y la Figura 2C, a los 5 días post-infección.

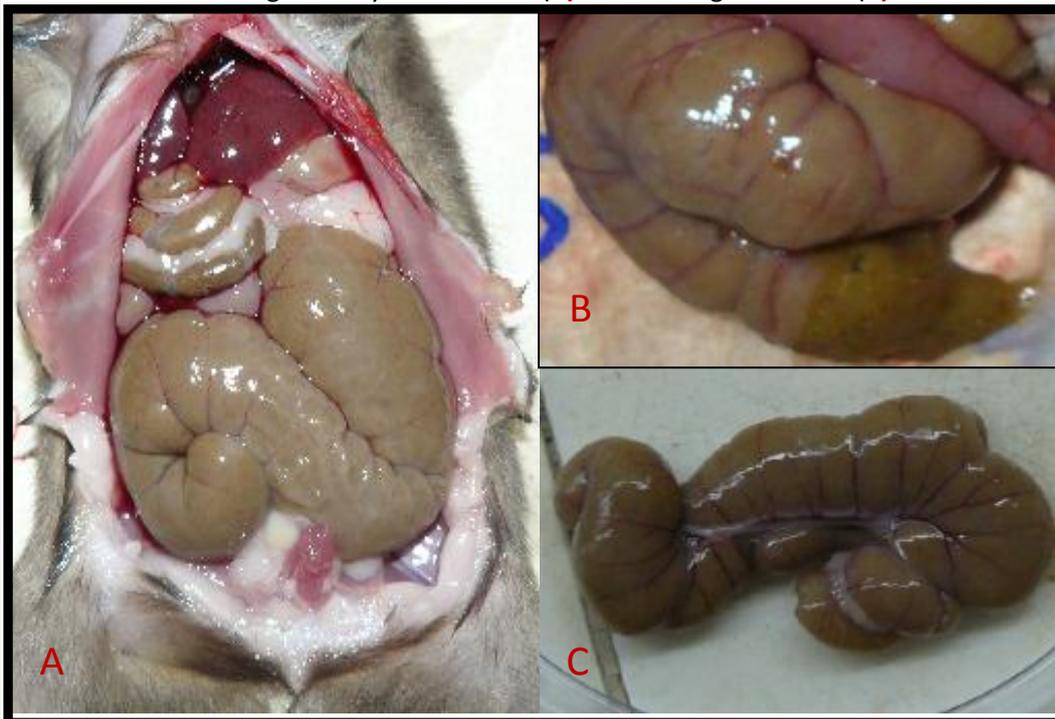
Se puede observar que a los 10 días de comenzado el tratamiento y antes de la infección todos los animales presentaron un aumento de peso de entre 10 y 20 g/ animal.

Luego de la infección, los animales que no fueron tratados con la mezcla microbiana (CI) presentaron un descenso de peso de aproximadamente 15 gramos, mientras que aquellos que recibieron tratamiento y fueron infectados (MMI) descendieron alrededor 5 g, de manera similar a lo ocurrido con el grupo centinela (C). Sin embargo los animales a los cuales se les administró antibiótico (CA) también sufrieron una disminución de peso del orden de 10 g. Los descensos de 10 a 15 g respecto al peso original de los lotes infectados con *C. difficile* o tratados con clindamicina respectivamente, da una idea del deterioro orgánico.

Durante la necropsia se observó enterocolitis, con gran inflamación del ciego e infiltrados hemorrágicos y una gran cantidad de gas (Figura 3). Al abrir el ciego se observó un contenido líquido amarillento, característico de la enterocolitis por *C. difficile*. En la Figura 3A se observa la cavidad abdominal de un hámster infectado correspondiente al lote CI. En la Figura 3B y 3C se puede observar el colon extraído del animal infectado de aspecto inflamado, de color rosado y con características hemorrágicas. Cuando el órgano es abierto en forma longitudinal se puede observar un contenido amarillento viscoso típico de enterocolitis. En la Figura 3A se observa la cavidad abdominal de un hámster infectado correspondiente al lote CI. En la Figura 3B y 3C se puede observar el colon extraído del animal infectado de aspecto inflamado, de color rosado y con



**Figura 3:** Colon de un animal infectado con *C. difficile* 117. Desarrollo de diarrea (A). Contenido intestinal gaseoso y amarillento (B). Colon congestionado (C).



**Figura 4:** Colon de un animal sano. A. Colon normal C. Contenido normal B. Materia fecal normal

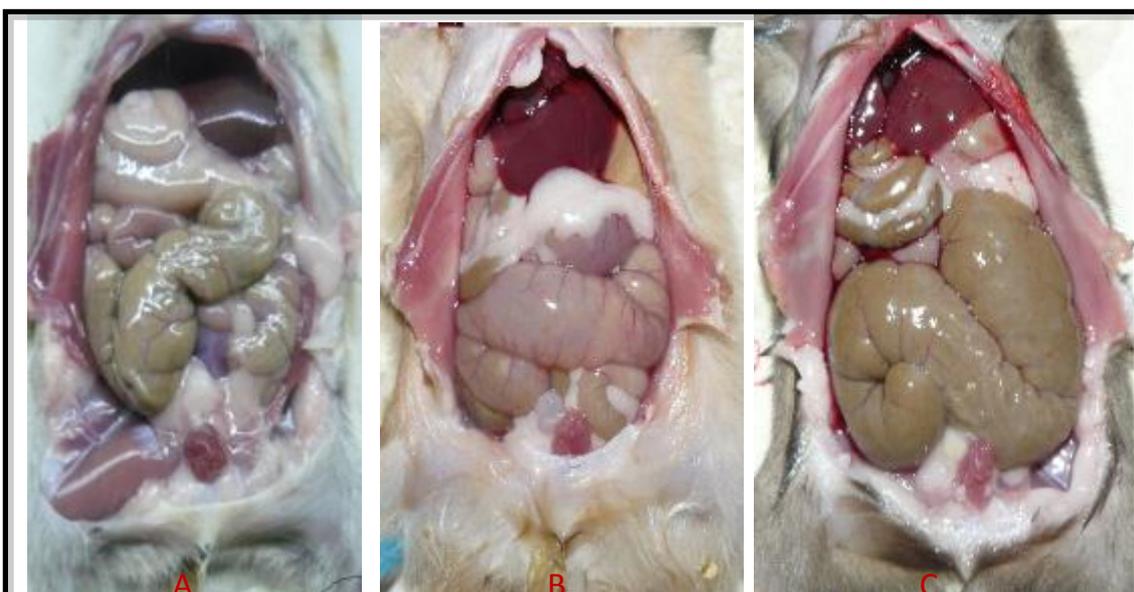
características hemorrágicas. Cuando el órgano es abierto en forma longitudinal se puede observar un contenido amarillento viscoso típico

de enterocolitis.

En la Figura 4A se aprecia el abdomen de un animal sin infectar. En la Figura 4B y C se puede ver un colon normal cuyo contenido fecal es de color marrón característico, y no se observa inflamación del tejido.

El tratamiento preventivo con la mezcla microbiana permitió disminuir de manera significativa la proporción de animales con enterocolitis producida por la infección por la cepa 117 de *C. difficile*. El tratamiento de los animales con la mezcla microbiana también fue efectivo frente a la diarrea por antibiótico. En este sentido Hickson et al (2007) en sus ensayos clínicos en humanos encontraron que un preparado probiótico de *Lactobacillus casei*, *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, impidió la diarrea causada por antibióticos y la diarrea asociada a *C. difficile*.

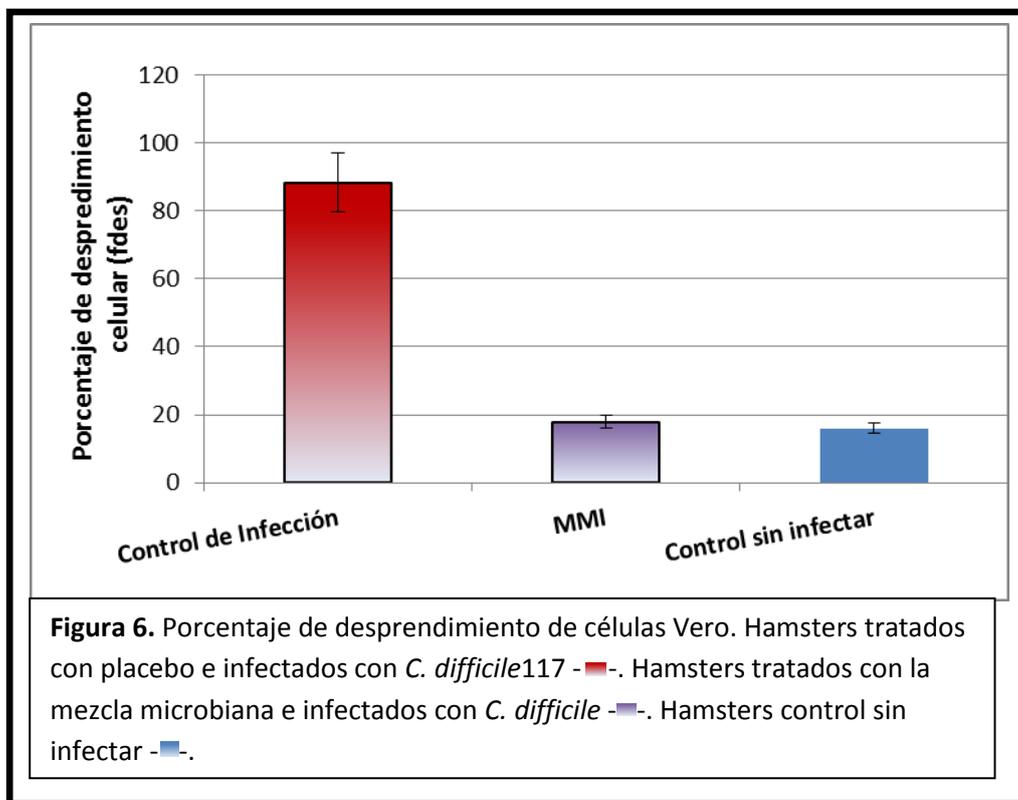
La Figura 5A corresponde a animales infectados con *C. difficile* y previamente tratados con la mezcla microbiana MMI. En la Figura 5B se muestra una fotografía de la cavidad abdominal de un animal infectado con *C. difficile* CI, donde se observa al ciego con gran contenido de gas. En la Figura 5C se muestra la cavidad abdominal de un animal control sin infectar.



**Figura 5:** Cavidad abdominal de hámster infectados con *C. difficile* previamente tratado con la mezcla microbiana (A). Animal infectado con *C. difficile* (B). Control sin infección (C).

#### 4-Determinación de la actividad biológica

Para establecer si la disminución observada en el desarrollo de la enterocolitis por la administración preventiva de la mezcla microbiana se debió a la disminución en la actividad biológica de las toxinas, la misma fue evaluada *in vitro* a partir de filtrados fecales obtenidos de los contenidos del ciego. En base a los resultados obtenidos, se determinaron los porcentajes de células desprendidas cuando la concentración del extracto de materia fecal fue del 5%v/v (Figura 6).



Los filtrados provenientes de animales pertenecientes al grupo control sin infectar (C) no mostraron actividad biológica asociada a las toxinas de *C. difficile*. La totalidad de los filtrados fecales pertenecientes al grupo infectado y tratado con placebo (CI) mostraron actividad biológica. Sin embargo, en el grupo infectado y tratado con la mezcla microbiana (MMI) no se detectó actividad biológica en sus correspondientes filtrados fecales.

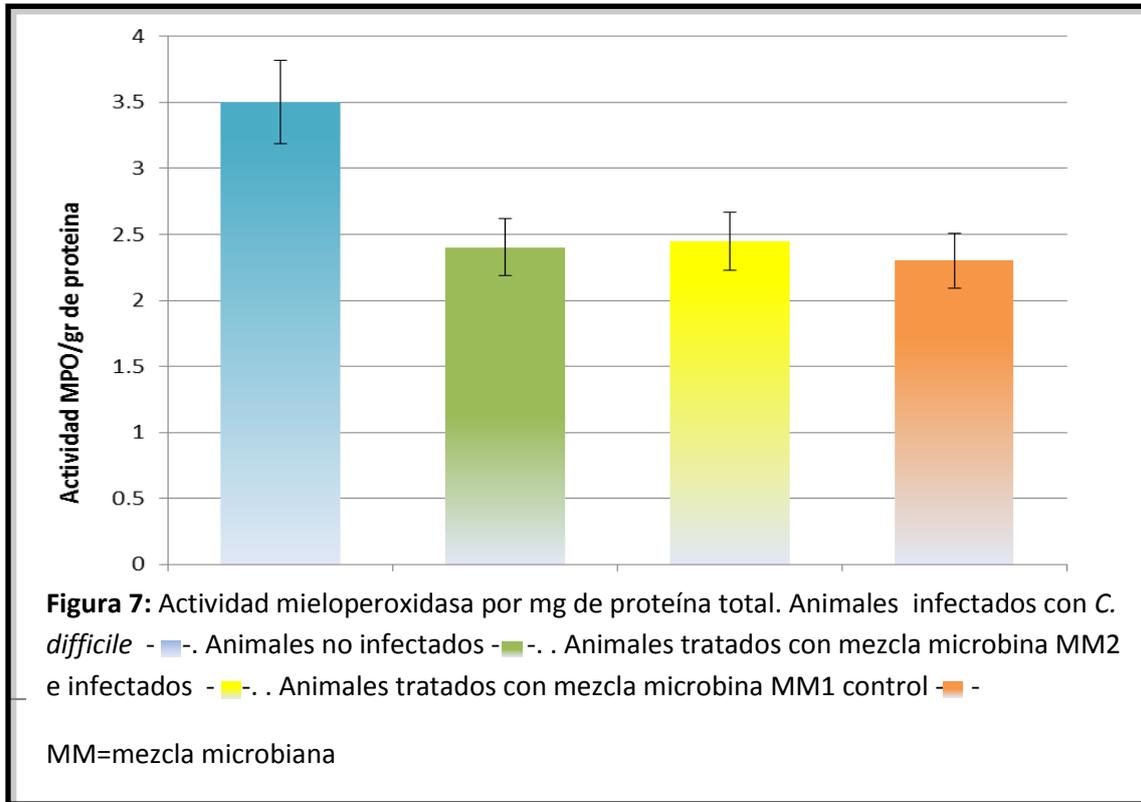
Estos resultados demuestran que la actividad biológica de los contenidos fecales se ve significativamente disminuida en el grupo tratado con la mezcla microbiana respecto del grupo infectado tratado con placebo. Esto podría deberse a una disminución en la capacidad de *C. difficile* de producir o liberar toxinas en presencia de la mezcla microbiana. En este sentido, Trejo *et al.* (2010) demostraron que la co-incubación de *C. difficile* 117 con *Lactobacillus plantarum* o *Bifidobacterium*, produce una disminución en la producción de toxinas.

## 5-Estudio de mieloperoxidasa

La mieloperoxidasa (MPO, peróxido de hidrógeno oxidorreductasa) es una enzima ampliamente distribuida en el organismo y sus fuentes fundamentales las constituyen los leucocitos (neutrófilos y monocitos) y los macrófagos. El incremento de la actividad de la MPO se ha reportado en varios procesos patológicos y está asociada con un aumento del riesgo al estrés oxidativo, como en el caso de las enfermedades infecciosas (generales o locales), las enfermedades inflamatorias (artritis reumatoidea) y la isquemia/reperfusión. En estos casos se reporta un aumento significativo de la actividad de MPO, en proporción directa al número de neutrófilos infiltrados en el tejido, por lo que se puede utilizar su actividad como índice de migración leucocitaria y por lo tanto de estrés oxidativo (Márquez *et al.*, 1990; Svensson *et al.*, 1988; Komatsu *et al.*, 1992; Simpson *et al.*, 1988). A fin de determinar la lesión provocado por *C. difficile*, se puede considerar a la MPO como un marcador de inflamación.

En la Figura 7 se observa una elevada actividad MPO para los animales que fueron infectados con *C. difficile* (CI) lo cual indica un gran nivel de agresión. Sin embargo cuando los animales fueron tratados con la mezcla microbiana y luego infectados (MMI), la

actividad fue menor y similar a la que presentaron respectivos controles sin infectar (C y MM).

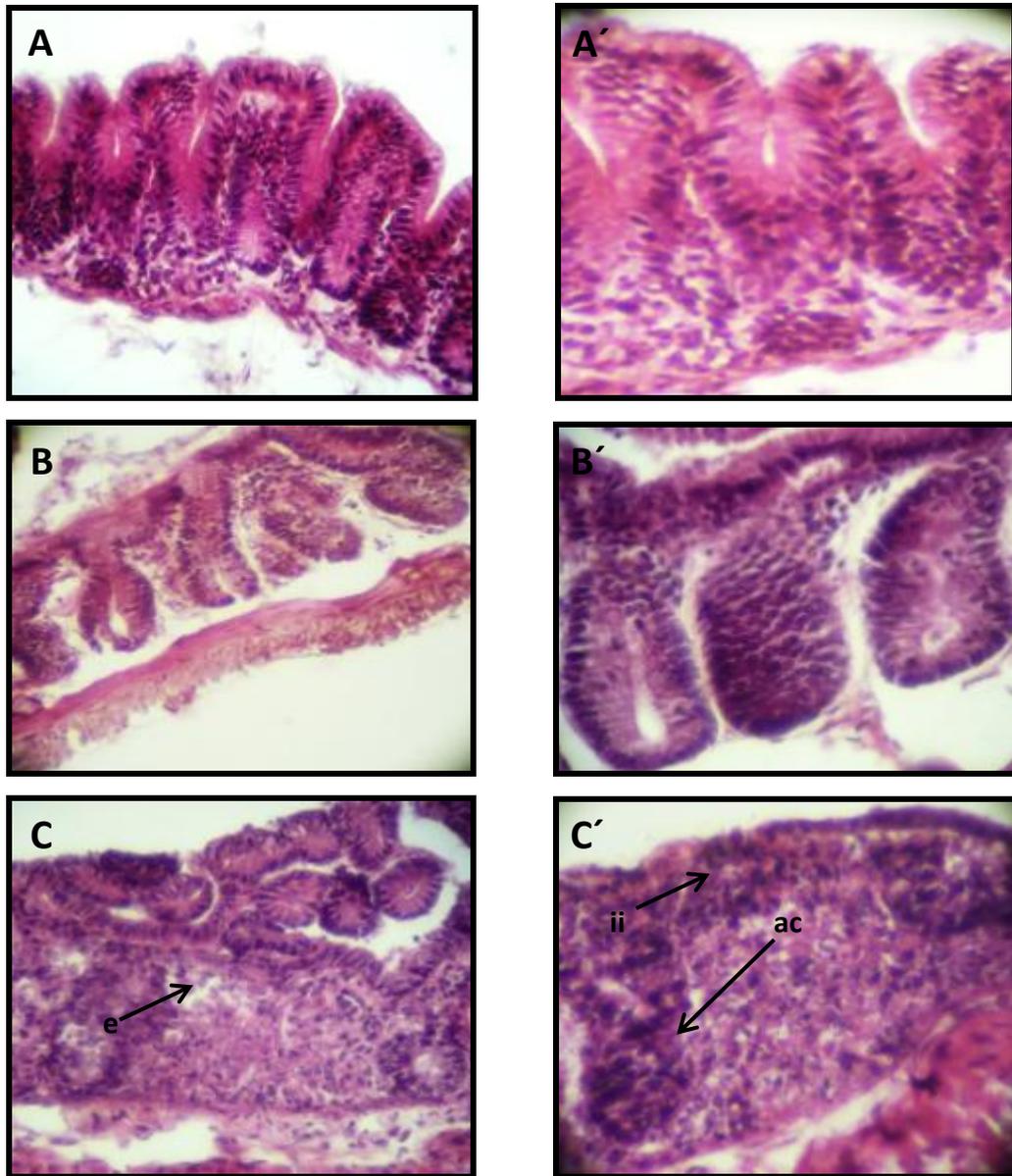


Por tanto, la mezcla microbiana es capaz de regular la actividad MPO cuando los animales son infectados por *C. difficile*. En este sentido, Kaur et al (2010) observaron que ratones tratados con antibiótico e infectados con *C. difficile* presentaron un elevado nivel de MPO con un gran daño histopatológico, mientras que la administración de *Lactobacillus acidophilus* a ratones tratados con antibióticos e infectados disminuyó la actividad de la MPO significativamente.

## 6-Estudios Histológicos

Los rasgos más notorios de la enterocolitis producida por *C. difficile* involucran inflamación y acumulación de líquido (edema) con aumento en el número de células en la submucosa (Keel y Songer, 2006). En la figura 8 se muestran diferentes cortes histológicos de

ciegos coloreados con Hematoxilina-Eosina, provenientes de los animales infectados con *C. difficile* (CI), tratados con la mezcla microbiana (MMI) y de animales sin infectar (C).



**Figura 8:** Histología del ciego, coloración con hematoxilina-eosina. Hamster sin infectar A,A'. Hámster tratado con la mezcla microbiana e infectado B,B'. Hámster infectado con *C. difficile* C,C'.  
e: edema. ii: infiltrado inflamatorio. ac: absceso cóptico

En la figura 8A se observa un corte transversal de ciego de animal control sin tratamiento a 10X, con características histopatológicas normales, conservándose el espesor de la mucosa.

La figura 8B correspondiente a un corte transversal de ciego de animal tratado con la mezcla microbiana e infectado con *C. difficile*, evidencia ligero engrosamiento de la mucosa por presencia de infiltrado inflamatorio linfocitario. La Figura 8C muestra una sección histológica de ciego de animal infectado con *C. difficile*, en la que se observa un marcado engrosamiento de la mucosa a expensas de edema (flecha) e infiltrado inflamatorio a predominio de polimorfonucleares neutrófilos con exocitosis y formación de abscesos crípticos. Estas características histológicas son compatibles con colitis aguda.

La figura 8A´ y 8B´ correspondientes a cortes histológicos de ciego de un animal control sin tratamiento y de un animal tratado con mezcla microbiana, respectivamente, con aumento de 40X, muestran la ausencia de infiltrado inflamatorio intraepitelial. En contraste, la figura 8C´ de un animal infectado sin tratamiento, muestra intenso infiltrado inflamatorio intraepitelial, con formación de absceso críptico (flecha) y destrucción glandular.

## CONCLUSIONES

- ❖ La mezcla microbiana fue capaz de prevenir la diarrea y enterocolitis producida por *C. difficile*.
- ❖ La concentración de la mezcla microbiana que protegió contra la infección por *C. difficile* fue la que contenía una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ml bacterias y  $1 \times 10^5$  UFC/ml de levaduras
- ❖ El efecto protector de la mezcla microbiana se asoció con una disminución en la producción de toxinas por *C. difficile*, lo cual se reflejó en una disminución significativa de la inflamación y de la infiltración celular a nivel intestinal.

# CAPÍTULO V

Conservación a largo plazo de la  
mezcla microbiana

## Introducción

La formulación de un producto multicepa potencialmente probiótico es de gran importancia para la prevención y el tratamiento de patologías debidas a microorganismos patógenos. Sin embargo uno de los desafíos más importantes es la conservación de estos productos a largo plazo. La posibilidad de optimizar las condiciones para obtener un producto almacenable a partir de cepas microbianas con características potencialmente probióticas y con capacidad de recuperar la viabilidad luego del almacenamiento sería el primer paso para aumentar la vida útil de un producto y evitar los cambios no deseados en su composición y propiedades que se producen durante la conservación. La liofilización es uno de los procedimientos más comúnmente utilizados para la preservación de las colecciones de cultivos microbianos y cultivos concentrados iniciadores. Sin embargo, durante la congelación y posterior deshidratación las células experimentan condiciones ambientales adversas, como baja temperatura y baja actividad acuosa, lo que reduce su viabilidad. En este sentido, el uso de crioprotectores ha demostrado mejorar las tasas de supervivencia de los diferentes microorganismos durante la conservación por congelación y liofilización (De Antoni *et al.* 1991; de Urraza y De Antoni, 1997; Carvalho *et al.* 2004; Blanquet *et al.* 2005). Se han descripto diferentes azúcares capaces de proteger a las bacterias entre los cuales encontramos a la lactosa, trehalosa y sacarosa. (Carvalho *et al.* 2002, 2003, 2004). Entre los sistemas proteicos, la leche o sus proteínas se emplearon comúnmente como crioprotectores (Abraham *et al.* 1990; Abadías *et al.* 2001; Blanquet *et al.* 2005; Otero *et al.* 2007).

Por otra parte, puesto que la seguridad de los probióticos es generalmente un tema de discusión en el área de la salud, es

necesario investigar no sólo los beneficios sino también los efectos secundarios potenciales de la administración de los microorganismos probióticos. Un indicador de seguridad es la ausencia de la translocación microbiana a través de la barrera epitelial y el paso a los sitios corporales estériles. Algunos autores describen un grado de translocación en huéspedes sanos (Pavan *et al.* 2003), cuando la integridad de la mucosa intestinal es interrumpido o cuando el sistema inmunológico es incapaz de controlar los microorganismos que podrían, una vez translocados, producir una infección local o llegar a la sangre causando sepsis (Berg, 1999).

El objetivo de este capítulo es, una vez desarrollada la mezcla microbiana constituida por microorganismos aislados de kefir, la evaluación de liofilización y la congelación para la conservación del producto en condiciones crio-protegidas. Una vez seleccionada la técnica de conservación se estudió el mantenimiento de las propiedades probióticas *in vitro* y la seguridad *in vivo* de la mezcla microbiana.

## Objetivos

- ❖ Determinar el método de conservación más adecuado para la mezcla microbiana.
- ❖ Evaluar los efectos probióticos luego de la conservación.
- ❖ Evaluar la inocuidad de la mezcla microbiana mediante estudios de translocación.

# Materiales y Métodos

## 1-Microorganismos y condiciones de cultivo

Los cultivos puros de los microorganismos potencialmente probióticos y *Shigella*, y los medios de cultivo correspondientes utilizados en este estudio son los descritos en el capítulo I.

## 2-Preparación de productos para la conservación

Cada microorganismo se cultivó de forma individual como se describió anteriormente. Los cultivos microbianos se cosecharon por centrifugación a 10000 g durante 15 min y se lavaron tres veces y se resuspendieron en solución salina estéril tamponada con buffer fosfato (PBS) de pH = 7,2 obteniéndose así las suspensiones microbianas. Para obtener la mezcla microbiana, una combinación de 1 ml de cada suspensión microbiana se centrifugó a 10000 g durante 15 min y se resuspendió en 1 ml de leche UHT estéril o de leche UHT conteniendo trehalosa (Mann Laboratorios de Investigación de la División de Becton Dickinson & Co,) en una concentración final de 300mM o sacarosa (Anedra, Argentina) en la misma concentración o PBS. La concentración final de bacterias y levaduras en la mezcla microbiana fue de  $10^9$  UFC/ml y  $10^6$  UFC/ml, respectivamente.

## 3-Liofilización y condiciones de almacenamiento

Las ampollas con 200  $\mu$ l de la mezcla microbiana, o las cepas puras; con o sin crioprotector fueron congeladas a  $-80$  ° C durante 8 horas y se liofilizaron durante 24 horas utilizando un liofilizador de placa HETO 7D4 Lab Equipment. Los microorganismos liofilizados se

almacenaron a 4 ° C durante diferentes períodos de tiempo entre 1 y 180 días. Inmediatamente después de la liofilización y en diferentes intervalos de tiempo de almacenamiento, se tomaron muestras al azar y se rehidrataron al volumen inicial con agua desionizada estéril y se realizó recuento en placa de microorganismos viables.

#### **4-Refrigeración, congelación y almacenamiento**

Se colocaron en criotubos 500 µl de la mezcla microbiana o sus cepas puras resuspendidas en leche UHT como crioprotector. Estos criotubos se dividieron en 3 grupos, el grupo 1 de almacenó a 4°C, el grupo 2 a -20°C y el grupo 3 a -80°C durante un período de 90 días. Se realizaron recuentos en placa de los microorganismos a diferentes intervalos de tiempo.

#### **5-Enumeración de microorganismos**

El número de microorganismos viables se determinó como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml). Diluciones seriadas de las muestras (de  $10^{-1}$  a  $10^{-9}$ ) se prepararon en 0,1% triptona y se sembraron en agar MRS, agar 1.1.1 y agar YGC (Biokard diagnóstico, Beauvais, Francia). Las placas se incubaron a 30 ° C durante 24-48 h en aerobiosis. La tasa de supervivencia se calculó en UFC/ml después de cada proceso de conservación, dividido por UFC/ml antes del proceso.

#### **6-Ensayo de inhibición de *Shigella* por la mezcla microbiana**

Se realizó el ensayo de inhibición *Shigella* por la mezcla microbiana liofilizada y fresca según se describió en el capítulo I. Se determinó el contenido de *Shigella sonnei* en agar nutritivo (Biokard

diagnóstico, Beauvais, Francia). Un cultivo *over-night* de *Shigella sonnei* de aproximadamente  $10^8$  UFC/ml se centrifugó a 3000 g durante 15 min, los pellets se suspendieron a un volumen igual en TSB. Diez ml de la mezcla microbiana liofilizada o fresca se resuspendieron en TSB se añadió el cultivo de *Shigella* en proporción 1:1 y se incubó a 37 ° C con agitación a 180 rpm. El recuento de *Shigella* se realizó a diferentes intervalos de tiempo (3, 8, 24, 48 h) como se indica. Como control se utilizaron, un cultivo de *Shigella* en TSB y TSB con 30% v/v de leche UHT.

## 7-Ensayo de translocación

Ratones hembras BALB/c de siete semanas de edad se alimentaron *ad libitum* diariamente con una dilución 1/100 en agua estéril de la mezcla microbiana liofilizada (aproximadamente  $10^9$  UFC/ml de bacterias y  $10^6$  UFC/ml por levaduras) durante 7 o 20 días consecutivos. El grupo control se alimentó con leche (diluida 1/100 en PBS). Cada grupo experimental consistió en 5 ratones alojados en jaulas, mantenido en ambiente controlado de temperatura y con 12 horas de ciclos oscuridad/luz. Todos los animales recibieron, al mismo tiempo una dieta balanceada estéril convencional.

Al final de cada periodo de alimentación, los ratones se sacrificaron en cámara de CO<sub>2</sub>. Se tomaron muestras de hígado, bazo y una porción de 3 cm de intestino delgado en forma aséptica. El hígado y el bazo se homogeneizaron en un 0,1% de agua de triptona estéril 0,1% (0,1 g/ml) y 100 µl de cada homogeneizado de órganos se sembró en agar VRBG (Biokard diagnóstico, Beauvais, Francia) para enterobacterias, 1.1.1 Agar para lactococos, agar MRS para lactobacilos, agar YGC de levaduras y Agar Nutritivo (AN). Las placas de VRBG y AN se incubaron en condiciones aeróbicas durante 24 horas a 37°C. Para los lactobacilos, levaduras y lactococos la

incubación fue de 24-48h a 30 °C. Se consideró que hubo translocación cuando se observaron colonias en las placas de agar, ya que el hígado y el bazo son los órganos que normalmente están desprovistos de microorganismos. Además, el contenido intestinal se lavó con 1 ml de PBS estéril, y diluciones seriadas de las muestras se sembraron en los medios de cultivo en idénticas condiciones a las expuestas anteriormente.

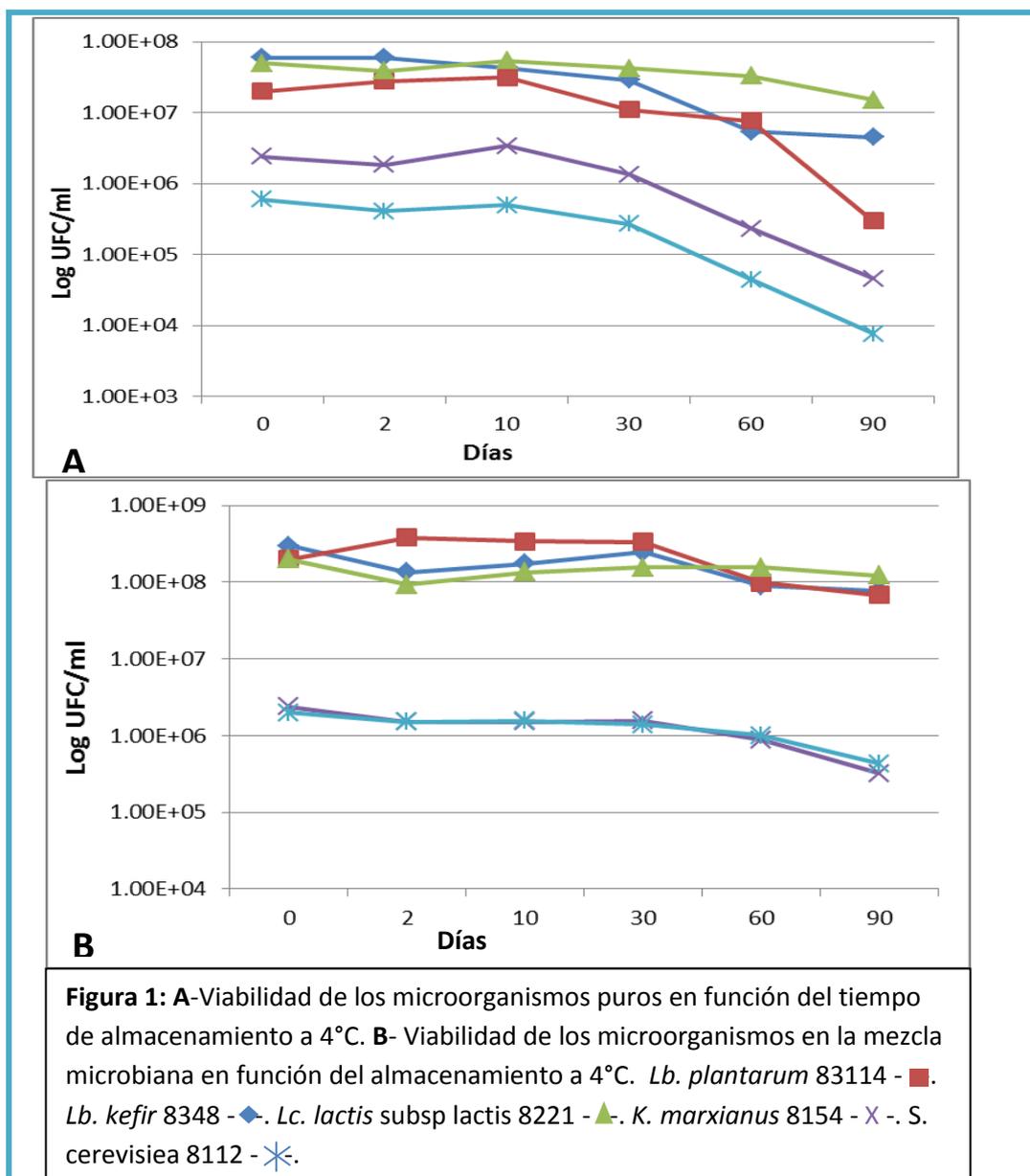
## **8-Análisis estadístico**

Las diferencias significativas en las tasas de supervivencia de los microorganismos se evaluaron estadísticamente mediante el uso de la prueba t de Student.

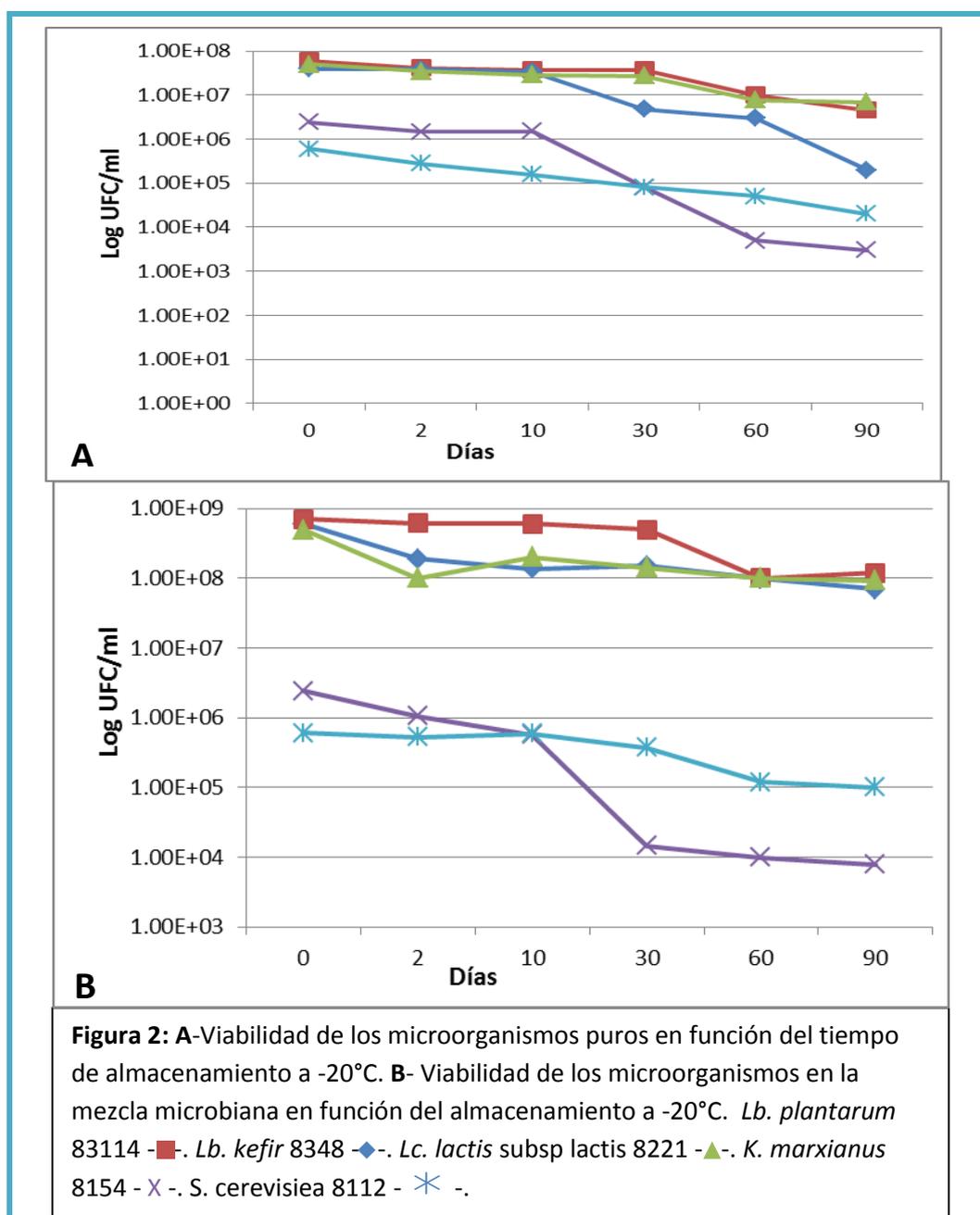
## Resultados y Discusión

### 1-Estudio de la conservación de las cepas puras a baja temperatura

Se estudió el efecto de la temperatura y almacenamiento a 4°C, -20°C y -80°C sobre la mezcla microbiana y sus cepas puras. Durante el almacenamiento a 4°C se observó que las todas las cepas puras se mantuvieron su viabilidad durante los primeros 30 días.

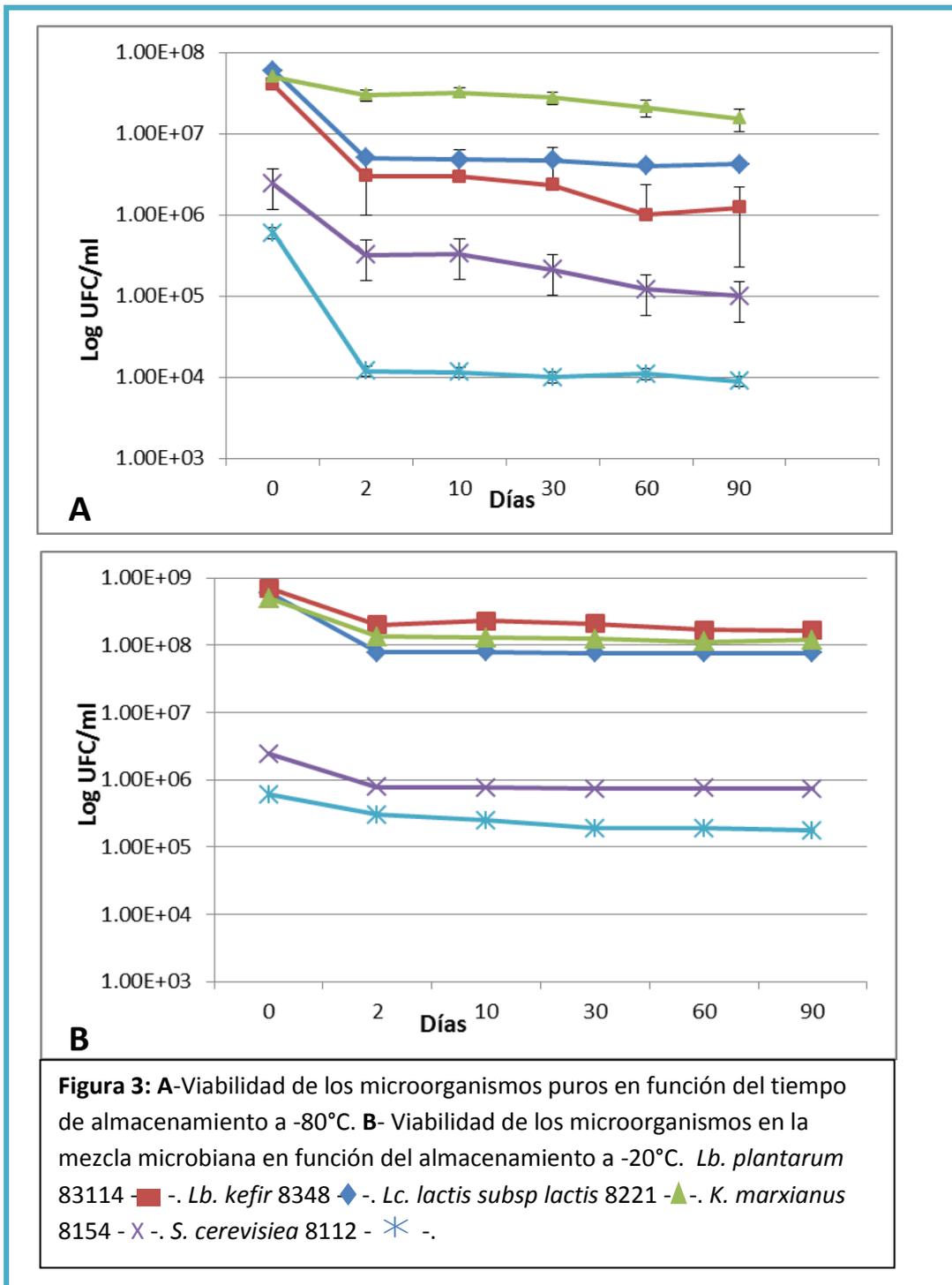


A partir de los 30 días las levaduras y *Lb. kefir* 8348 sufrieron una disminución de aproximadamente 1,5 log. Sin embargo las bacterias restantes sufrieron una disminución a partir de los 60 días de almacenamiento, *Lb. plantarum* 83114 disminuyó 1,5 log, *Lc. lactis* 8221 lo hizo en 0,5 log como puede verse en la figura 1A. Cuando la mezcla microbiana se conservó a 4°C no se observó disminución de la viabilidad de las bacterias. Sin embargo, en el caso de las levaduras se observó una leve disminución de aproximadamente 0,5 log luego de los 60 días de almacenamiento a diferencia de lo ocurrido cuando con las cepas (figura 1B).



La figura 2A muestra las UFC/ml de los microorganismos puros luego del almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$  para diferentes intervalos de tiempo. En esta figura puede observarse que la viabilidad de *Lb. kefir* 8348 y *K. marxianus* 8154 sufren una disminución de la viabilidad de 2,5 log luego de 10 días de almacenamiento siendo en ambos casos de aproximadamente 2,5 log. Si bien la viabilidad de *S. cerevisiae* 8112, *Lb. plantarum* 83114 y *Lc. lactis* 8221 disminuyó aproximadamente 1,5 log, este descenso fue menos brusco. Sin embargo en la mezcla microbiana el comportamiento fue sustancialmente diferente respecto a las cepas puras ya que todos los microorganismos excepto *K. marxianus*, sufrieron una disminución de la viabilidad de 1 Log. Cuando observamos el comportamiento de *K. marxianus* 8154 vemos que entre 10 y 30 días de almacenamiento sufre un descenso brusco de la viabilidad del orden de 2 log y luego de estos 30 días su recuento se mantuvo constante (figura 2B).

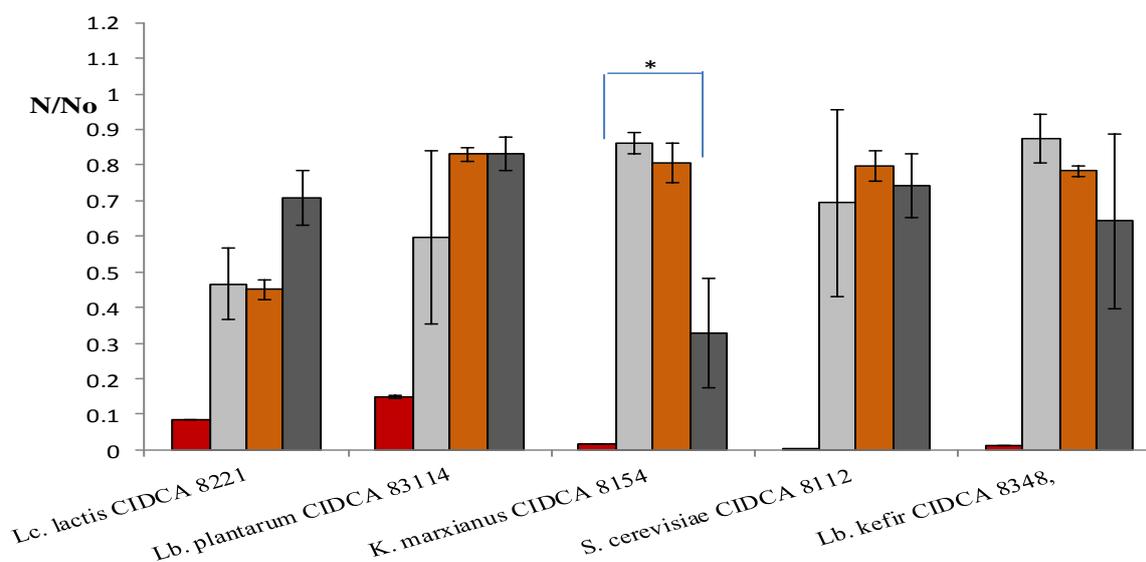
En la figura 3 se observa la viabilidad de los microorganismos puros y en la mezcla microbiana durante el almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A diferencia de lo observado hasta aquí, tanto el comportamiento de los microorganismos puros como de la mezcla microbiana es totalmente diferente. Si comparamos la conservación a  $4^{\circ}\text{C}$  o  $-20^{\circ}\text{C}$  con la conservación a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se observa una caída brusca inicial de aproximadamente 1 log y luego se mantiene constante el número de viables independientemente del tipo de microorganismo o si forma parte de la mezcla microbiana. Esto indica que, entre los métodos de refrigeración/congelación, la congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  es el mejor método de almacenamiento a largo plazo (figura 3).



## 2-Efecto de crioprotectores sobre la resistencia a la liofilización

Se estudiaron los efectos protectores de la leche y la leche suplementada con trehalosa o sacarosa a una concentración final de

300nM sobre la viabilidad de cada uno de los microorganismos en la mezcla microbiana. Las tasas de supervivencia de la mezcla microbiana liofilizada en leche UHT fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) para todos los microorganismos en comparación con los observados con los liofilizados en PBS (Fig 4). La adición de sacarosa o trehalosa no aumentó las tasas de supervivencia de los lactobacilos (*Lb. kefir* CIDCA 8348 y *Lb. plantarum* CIDCA 83114), *Lc. lactis* CIDCA 8221 y *S. cerevisiae* CIDCA 8112, mientras que la tasa de supervivencia de *K. marxianus* CIDCA 8154 disminuyó significativamente en presencia de 300nM de sacarosa en la mezcla microbiana ( $P < 0,05$ ; Fig. 4). Todos estos resultados en su conjunto, indican que la adición de azúcares a la leche UHT no mejoró la acción crioprotectora de la leche. Por lo tanto, la leche UHT sin adicionar se utilizó como crioprotector para todos los experimentos posteriores.



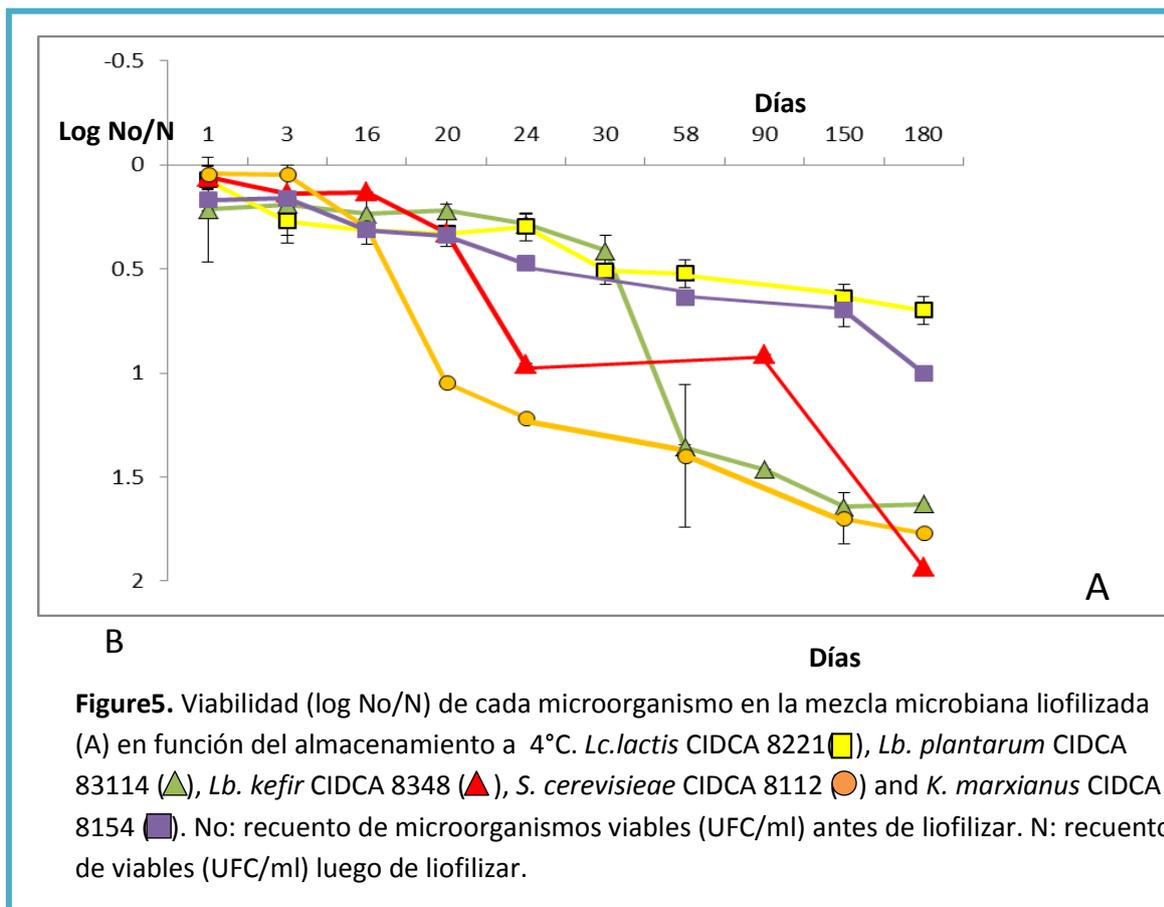
**Figure 4.** Viabilidad (N/No) de *Lc. lactis* CIDCA 8221, *Lb. kefir* CIDCA 8348, *Lb. plantarum* CIDCA 83114, *S. cerevisiae* CIDCA 8112 and *K. marxianus* CIDCA 8154 luego de liofilizar con PBS como crioprotector (■), leche UHT (□), leche UHT suplementada por 300mezcla microbiana trehalosa (■) o 300mezcla microbiana sacarosa (■). No: recuento de microorganismos (UFC/ml) antes de liofilizar. N: recuento de microorganismo viable (UFC/ml) después de liofilizar. En todos los casos, la supervivencia con el crioprotector es significativamente diferente a la supervivencia en PBS buffer ( $p < 0.05$ ). El asterisco índice diferencia significativa respecto a la leche adicionada de otro crioprotector.

Estos resultados coinciden con los reportados por Carvalho *et al.* (2002) quienes observaron que la adición de azúcares crioprotectores a la leche descremada, no mejoró la viabilidad de *Lb. plantarum* y *Lb. rhamnosus* durante el proceso de liofilización. Font de Valdez et al (1983) observaron que la adición de otros crioprotectores a la leche UHT no mejoraron la viabilidad de *Lb. thermophilus* luego de la liofilización. Una selección adecuada de crioprotectores resulta ser esencial para la supervivencia de los microorganismos luego de la liofilización (Fon de Valdez et al, 1985)

### **3-Efecto del almacenamiento sobre la mezcla microbiana y sus microorganismos puros liofilizados.**

Con el fin de estudiar la capacidad de cada microorganismo de la mezcla microbiana liofilizada de sobrevivir durante el almacenamiento, se analizaron las tasas de supervivencia a diferentes tiempos de almacenamiento a 4°C. Todos los microorganismos sufrieron una disminución de las tasas de supervivencia de entre 0,5 y 1 log después de 30 días de almacenamiento (Fig. 5A). Sin embargo, cuando se liofilizó la leche fermentada por la mezcla microbiana hubo una notable reducción de las tasas de supervivencia para todos los microorganismos (entre 1,5 y 4,5 log) después del mismo tiempo de almacenamiento (Fig. 5B).

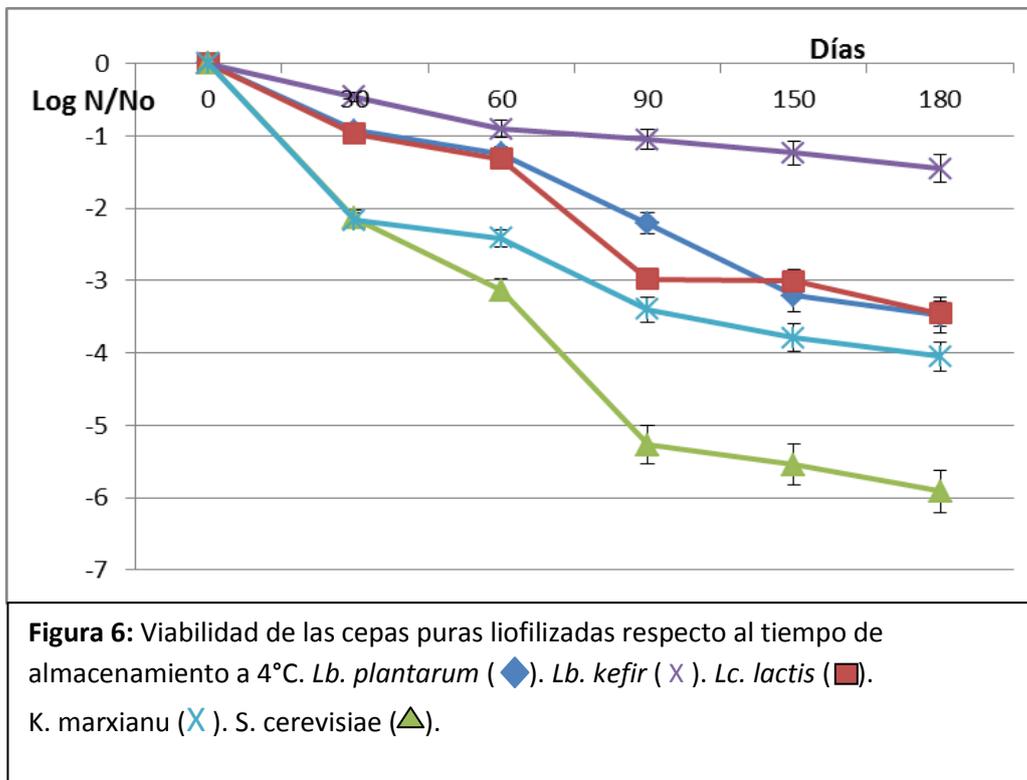
Entre 30 y 180 días de almacenamiento, la viabilidad de cada microorganismo en la mezcla microbiana disminuyó casi 2 log (Fig. 5A). Por tanto el método de liofilización es muy bueno para la conservación de la mezcla microbiana durante períodos largos de tiempo.



La capacidad de los microorganismos para seguir siendo viables y funcionalmente activos durante el almacenamiento a largo plazo es un requisito importante del potencial de cepas probióticas (Sanders et al, 2001). Por tanto en este estudio se observa que la mezcla microbiana liofilizada cumple con las características indicadas de viabilidad para evaluar sus características probióticas.

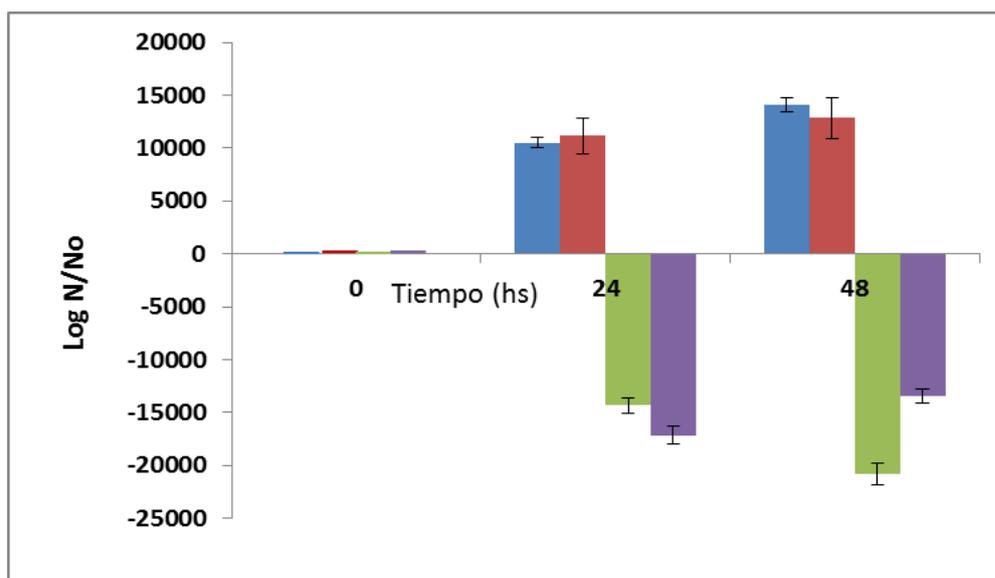
La figura 6 muestra la viabilidad de las cepas puras liofilizadas y conservadas a 4°C. La conservación de los liofilizados a 4°C durante 180 días provoca un descenso de aproximadamente 4 log para *K. marxianus*, *Lc. lactis* y *Lb. plantarum*. Sin embargo *S. cerevisiae* sufre una disminución de la viabilidad de 7 log, mientras que *Lb. kefir* lo hace solo en 1 log. Si comparamos estos experimentos con la viabilidad de los microorganismos en la mezcla microbiana, vemos que la viabilidad se ve mucho más afectada cuando los

microorganismos se liofilizan en forma pura que en la mezcla microbiana.



#### 4-*Shigella* ensayo de inhibición

La incubación a 37°C de *Shigella sonnei* ya sea con la mezcla microbiana liofilizada o fresca produce un efecto bactericida que es evidente después de 24 y 48 horas de incubación, ya que se observó una disminución de 2 log en la viabilidad de *S. sonnei* con ambos tratamientos (figura 7).



**Figura 7:** Viabilidad de *Shigella sonnei* en función del tiempo de incubación en presencia de la mezcla microbiana liofilizada y fresca. Viabilidad de *S. sonnei* en TSB (■) y TSB adicionado con leche (■). Viabilidad de *S. sonnei* en presencia de la mezcla microbiana liofilizada (■) y fresca (■)

Los controles que se realizaron sin mezcla microbiana no afectaron la viabilidad de *S. sonnei*. Estos resultados sugieren que la liofilización no tiene un efecto negativo en la capacidad de la mezcla microbiana para inhibir el crecimiento *in vitro* de *S. sonnei*. Durante las primeras 24 horas de incubación se observó un descenso de pH cuando *S. sonnei* se incubó en presencia de la mezcla microbiana liofilizada o fresca. Si bien los microorganismos de la mezcla microbiana no crecen en TSB, liberan al medio los ácidos débiles que conservan en su interior, ejerciendo un efecto bactericida sobre *Shigella*.

## 5-Estudio de translocación de microorganismos

Con el fin de evaluar la seguridad de la mezcla microbiana liofilizada, se realizó un ensayo de la translocación en ratones. La

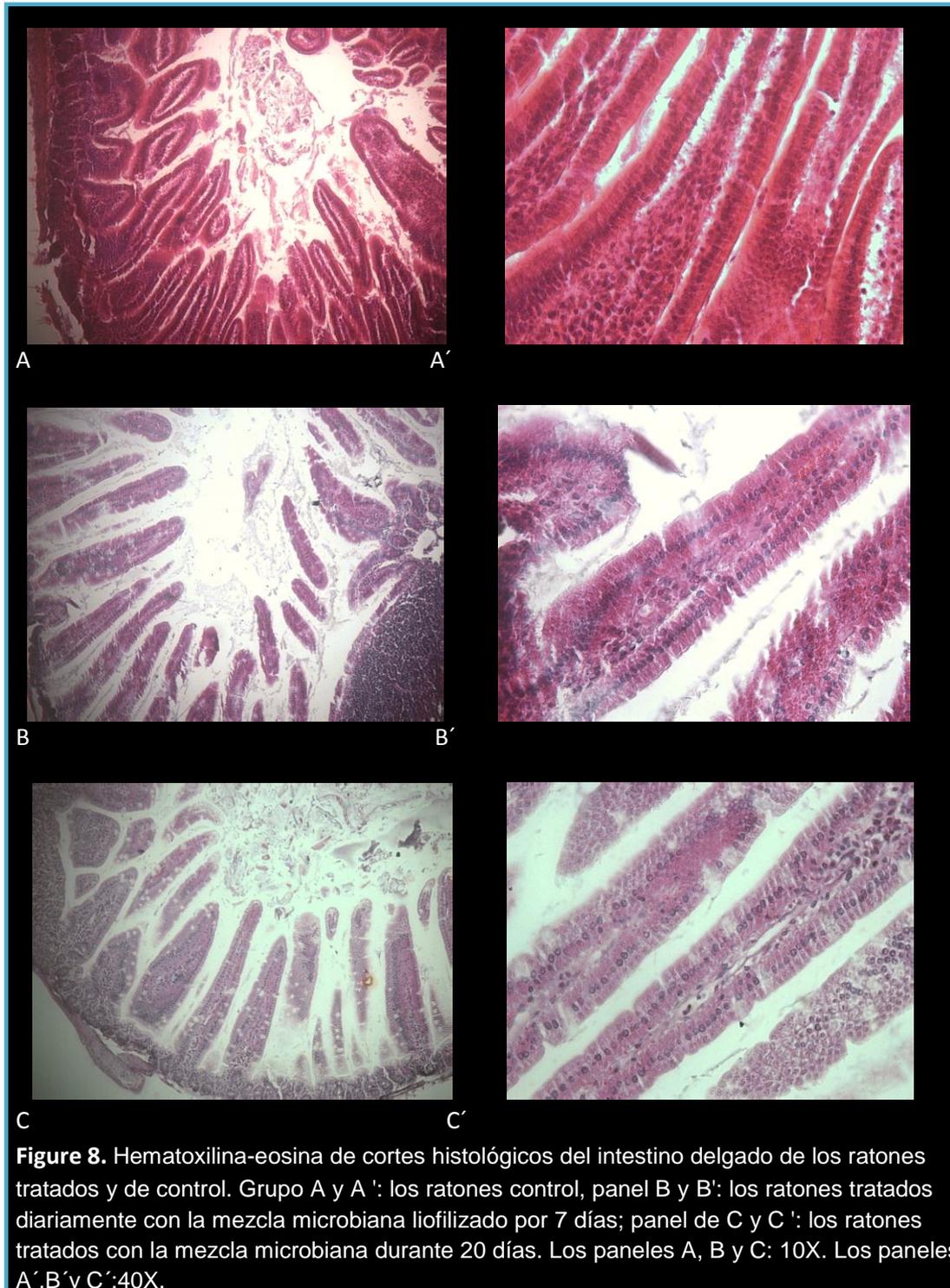
administración de la mezcla microbiana liofilizada durante 7 o 20 días no induce la translocación de microorganismos al hígado o el bazo, ya que no se detectaron colonias en ninguno de los cinco medios de agar seleccionado para este ensayo (tabla 1). Además, no se observó infiltrado inflamatorio en la observación microscópica con hematoxilina-eosina de cortes histológicos del intestino delgado de los ratones tratados y de control (Figura 8).

**Table 1.** Translocación de los microorganismos a bazo e hígado después de la administración ad libitum de la mezcla microbiana liofilizada a los ratones Balb / c por 7 o 20 días.

Organo	Recuento en UFC en diferentes medios de cultivo									
	Ratones control					Ratones tratados durante 7 o 20				
	MRS	YGC	VRBG	1.1.1	NA	MRS	YGC	VRBG	1.1.1	AN
Intestino†	>10 <sup>9</sup>	>10 <sup>7</sup>	(2,3±0,3)10 <sup>7</sup>	>10 <sup>9</sup>	(7,0±0,9)10 <sup>7</sup>	>10 <sup>9</sup>	>10 <sup>7</sup>	(2,8±0,3)10 <sup>7</sup>	>10 <sup>9</sup>	(7,4±0,4)10 <sup>7</sup>
Bazo‡	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Hígado‡	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10

† Los recuentos se dan en UFC por cm de intestino

‡ Los resultados se dan en UFC por 0,1g de órgano



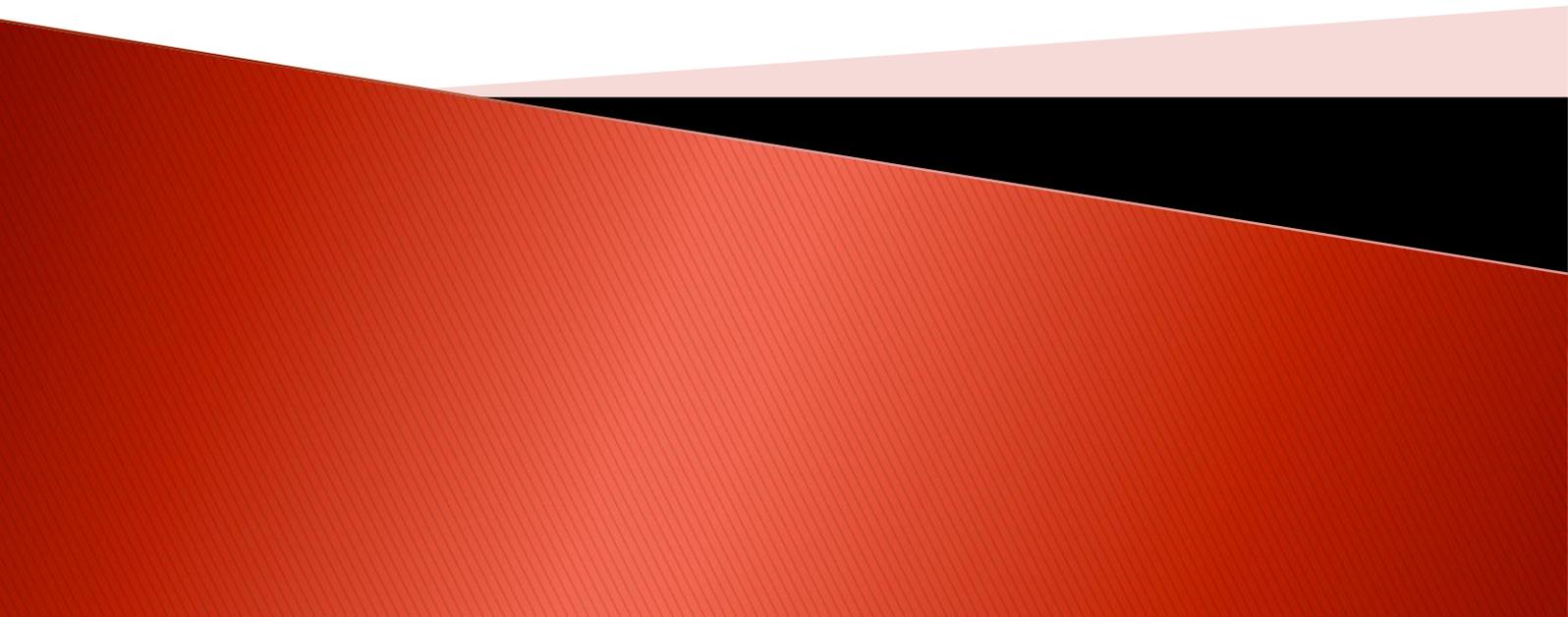
Varios autores han descrito la posibilidad de translocación bacteriana tras la administración de microorganismos probióticos (Kunz *et al.* 2004; Land *et al.* 2005). En este estudio, encontramos

que la administración de la mezcla microbiana liofilizada a los ratones durante 7 a 20 días no induce la translocación de bacterias ácido lácticas, levaduras o enterobacterias. Resultados similares fueron reportados por Vinderola *et al.* (2005) que han administrado varias diluciones de leche fermentada con gránulos de kefir a ratones durante 7 días y Yakabe *et al.* (2009) quienes evaluaron una cepa de *Lb. brevis* como probiótico en ratas. Por otra parte, no hubo cambios histopatológicos en el tejido gastrointestinal luego de la administración de mezcla microbiana liofilizada, lo cual concuerda con lo señalado por otros autores para diferentes microorganismos probióticos (Zhou *et al.* 2000; Abe *et al.* 2009). En consecuencia con estos resultados y teniendo en cuenta el origen de las cepas de la mezcla microbiana propuestos en este estudio puede ser considerado un producto seguro.

## Conclusiones

- ❖ La liofilización en leche es un buen procedimiento para preservar la viabilidad de la mezcla microbiana.
- ❖ La mezcla microbiana liofilizada mantiene la capacidad de inhibir a *Shigella in vitro*.
- ❖ La mezcla microbiana liofilizada puede considerarse segura ya que no induce la translocación de ningún microorganismo a bazo o hígado durante un consumo prolongado.

# COCLUSIONES GENERALES



## **Conclusiones generales**

El kefir es una leche fermentada a la que se le atribuyen propiedades beneficiosas para la salud, presentando efectos inmunomodulatorios, antibacterianos y antifúngicos. En la actualidad es considerado un ejemplo de leche fermentada con características probióticas obtenido a partir de una mezcla de bacterias y levaduras. Los gránulos de kefir son difíciles de utilizar como cultivos iniciadores en la industria por las características complejas de su microbiota. Los microorganismos presentes en el gránulo de kefir pertenecen a diferentes géneros y especies, y están en asociación simbiótica. Estas características determinan diferente tipo de compuestos que inciden en los caracteres organolépticos de la leche fermentada. La presencia de una microbiota compleja implica una posibilidad de variación ante pequeños cambios externos determinando modificaciones de concentración de cada uno de los microorganismos específicos y/o su actividad metabólica, siendo entonces dificultosa la obtención de un producto con calidad constante. Una solución a este problema podría ser la selección de un número discreto de microorganismos aislados de los gránulos de kefir que utilizados en forma conjunta pudieran producir una leche fermentada con características semejantes a las del producto natural. Con el objeto de estudiar esta posibilidad, se seleccionaron distintas cepas de bacterias y levaduras aisladas de kefir de la colección del CIDCA a fin de diseñar un alimento potencialmente probiótico, sobre la base de que la acción combinadas de las bacterias ácido lácticas y levaduras presentes en el gránulo de kefir sería la responsable de las propiedades que se le atribuyen a esta leche fermentada.

Otro punto que se tuvo en cuenta en este estudio fue la posibilidad de formular una mezcla microbiana que pudiera ser comercializada en forma deshidratada para consumirla

posteriormente adicionándola a un alimento líquido (agua, jugo de frutas, leche, etc). Un alimento potencialmente probiótico deshidratado posee la ventaja de una mayor vida útil y la posibilidad de que el consumidor lo ingiera de forma segura, fácil y de acuerdo a sus preferencias alimenticias.

Algunos de los desafíos para la obtención una mezcla microbiana potencialmente probiótica serían:

- 1- Mantener la estabilidad de cada microorganismo en la misma y en las proporciones establecidas.
- 2- Demostrar que la mezcla posee alguna característica probiótica *in vivo* e *in vitro*.
- 3- Contar con una condición de conservación a largo plazo que mantenga una concentración adecuada de microorganismos.
- 4- Demostrar que la mezcla microbiana en la condición de conservación seleccionada se comporta como un alimento seguro y posee alguna característica probiótica *in vitro*.

En este trabajo los pasos que se siguieron para obtener la mezcla microbiana potencialmente probiótica comenzaron con el estudio de la capacidad sinérgica y/o antagónica entre los microorganismos seleccionados. Se demostró que las bacterias y levaduras elegidas no presentan características antagónicas y mantienen su viabilidad a los largo de 24 horas de co-incubación. Son capaces de coexistir en mezcla microbiana provocando un descenso del pH de la leche debido a producción de ácido láctico y ácido acético los cuales serían responsables de la acción bactericida frente a *Shigella sonnei*.

En los países subdesarrollados la diarrea es un grave problema de salud, siendo una de las principales causas de muerte en niños. La selección de *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri* se basó en las estadísticas epidemiológicas nacionales donde destaca la prevalencia

de *Shigella* en diarreas padecidas por niños. Por lo tanto se estudió la capacidad de los microorganismos puros y de la mezcla microbiana de disminuir la invasión por *Shigella in vitro*. En este estudio se demostró que la mezcla microbiana impidió la invasión de las células Hep-2 por *Shigella* y evitó la desorganización de la red de actina de dichas células. La disminución de la invasión es dependiente del tiempo de pre-incubación de la mezcla microbiana sobre las células. Si bien la mezcla microbiana protege contra la invasión, no todos los microorganismos que la constituyen protegen en forma individual. En este sentido se destaca el efecto protector de *Lb. plantarum* CIDCA 83114

Otro de los microorganismos enteropatógenos seleccionados en este estudio fue *C. difficile* ya que constituye un serio problema en pacientes hospitalizados que adquieren la enfermedad durante la internación y donde el tratamiento con antibióticos no es suficiente para erradicar la enfermedad. En la actualidad se ha hecho mucho énfasis en el tratamiento con probióticos de las diarreas provocadas por antibiótico, lo que nos incentivó al estudio de la mezcla microbiana frente a la citotoxicidad de *C. difficile in vitro* e *in vivo*. Los resultados obtenidos mostraron que los metabolitos producidos por la mezcla microbiana protegían a las células Vero de las toxinas de *C. difficile*. Se demostró que el efecto de la mezcla microbiana es debido a los metabolitos producidos por la cepa de *Lactococcus lactis subsp lactis* CIDCA 8221, y que dicho metabolito responsable del efecto antitoxina es una molécula de alto peso molecular y sensible al calor. Datos que permitirían suponer que se trata de una proteína liberada por el lactococo que secuestraría o degradaría la o las toxinas de *C. difficile*.

Para completar el estudio de la acción de la mezcla microbiana contra *C difficile*, se realizaron estudios *in vivo* utilizando el modelo de hamster. En el modelo de enterocolitis en hámster inducida por la

administración de clindamicina y posterior infección con *C. difficile*, los animales comienzan a desarrollar colitis, letargia y finalmente un cuadro de colitis fulminante que desencadena la muerte del animal a partir de los pocos días post infección. Los ensayos realizados en el presente trabajo de tesis demostraron que la mezcla microbiana posee la capacidad de proteger contra el desarrollo de enterocolitis y muerte producida por *C. difficile* durante la infección de huéspedes. Es importante destacar que la mezcla microbiana también presentó un efecto significativo de protección contra la diarrea causada por antibióticos.

En vista de las propiedades probióticas de la mezcla microbiana *in vitro* y en animales de laboratorio, se planteó la posibilidad evaluar la conservación de este producto en forma deshidratada. Se utilizó la liofilización como tecnología para el secado y conservación de la mezcla microbiana. Se obtuvieron buenos resultados para todos los microorganismos en la mezcla microbiana a lo largo del almacenamiento a 4°C. Asimismo se demostró que este producto liofilizado fue capaz de mantener su efecto bactericida frente a *Shigella*. La mezcla microbiana liofilizada suministrada diariamente por vía oral a ratones Bal/c, no translocó desde el intestino ni favoreció la translocación de la flora endógena, lo que confirmaría su estatus GRAS (*generally reconized as safe*).

Este trabajo de tesis constituye un aporte al desarrollo de nuevos complejos multicepas con características probióticas. A través de estudios que van desde la capacidad de crecimiento conjunto, producción de ácidos orgánicos, estudios de las propiedades probióticas *in vitro* e *in vivo* hasta la conservación y almacenamiento.

Estos resultados abren una puerta para la continuación de la investigación sobre la posibilidad de industrialización de esta mezcla microbiana potencialmente probiótica.

# APPENDICE I

## 1. Buffers y medios de cultivo

Todos los medios de cultivo, excepto los casos indicados, se esterilizaron en autoclave a 120° C, durante 15 minutos.

### **Caldo MRS (De Man, Rogosa, Sharpe , 1960), Difco, Detroit, USA.**

Peptona universal 10 g/l

Extracto de carne 10 g/l

Extracto de levadura 5 g/l

D(+) glucosa 20 g/l

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g/l

Tween 80 1 g/l

Citrato ácido de amonio 2 g/l

Acetato de sodio 5 g/l

MgSO<sub>4</sub> 0.1 g/l

MnSO<sub>4</sub> 0.05 g/l

pH = 6,5 ±0,2

### **Agar MRS**

Caldo MRS adicionado con agar en concentración 1.5 g/l.

### **Agra nutritivo**

Extracto de carne 3 g/l

Peptona de carne 5 g/l

Agar 1,5 g/l

pH = 7 ± 0,2

### **Caldo YPD**

Extracto de levadura 3 g/l

Peptona 5 g/l

Glucosa 10 g/l

pH = 6

### **Agar YPD**

Caldo YPD adicionado con agar en concentración 1.5 g/l.

### **Caldo 1.1.1**

Extracto de levadura 10g/l

Triptona 10 g/l

Lactosa 10 g/l

pH= 6-7

### **Agar 1.1.1**

Caldo 1.1.1 adicionado con agar en concentración 1.5 g/l.

### **Caldo tripticasa soya (TSB) (Biokard diagnóstico, Beauvais, Francia)**

#### **Agar TSB**

Bacto Tryptone (digerido pancreático de caseína) 17,0 g

Bacto Soytone (digerido péptico de harina de soja) 3,0

Glucosa (dextrosa) 2,5

Cloruro sódico 5,0

Fosfato di-básico de potasio 2,5

pH=7,3

**Agar DMCR (differential Medium Clostridial Reinforced),  
Laboratotos Britania S.A, Argentina**

Peptona de caseína 5g/l  
Peptona de carne 5g/l  
Extracto de carne 8g/l  
Extracto de Levadura 1g/l  
Almidón 1g/l  
D(+) glucosa 1g/l  
Acetato de sodio 5g/l  
Sulfito ácido de sodio 0,4g/l  
Citrato de amonio hierro(III) 0,5g/l  
Resarzurina, sal sódica 0,002g/l  
L(-) clorhidrato de cisteína 0,5g/l  
Agar 15g/l

Clostridium difficile fue incubado a 37°C en anaerobiosis (Anaeropack, Mitshubischi Gas Chemical Co, Inc)

**Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium (DMEM)  
completo**

Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium (DMEM), Gibco,  
Grand Island, N.Y.,  
USA 1000 ml

Penicilina/ Streptomycin(1000 IU, 1000 µg/ml) 13 ml

Suero fetal bovino 180 ml

Aminoácidos no esenciales 13 ml

Gentamicina (50 mg/ml) 10 ml

Fungizona 5 ml

HNaCO<sub>3</sub> 2 g/l

pH = 7 ± 0,2

El suero fetal bovino se inactiva 30 minutos a 60° C. Una vez preparado, el medio se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0.22 µm.

### **DMEM de adhesión**

Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium (DMEM), Gibco, Grand Island, N.Y.,

USA 1000 ml

NaHCO<sub>3</sub> 2 g/l

pH = 7 ± 0,2

Una vez preparado, el medio se esteriliza por filtración a través de una membrana de

0.22 µm.

### **Triptona**

triptona 1 g/l

### **Buffer fosfato**

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.1M) 50 ml

NaOH (0.1M) 29.1 ml

Vf= 100ml

pH = 7 ± 0,2

### **Buffer PBS**

NaCl 8.02 g/l

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.17 g/l

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g/l

pH = 7 ± 0,2

## 2. Coloraciones

### Tinción de May-Grünwald/Giemsa

Colocar 0.5 ml de May-Grünwald (Lab. Biopur, Argentina) en cada fosa durante 15

min.

Lavar 3 veces con agua destilada.

Agregar solución de Giemsa (Anedra) (dilución 1.5/10 del reactivo original) y dejar 30 minutos.

Lavar abundantemente y dejar secar.

### Tinción de Gram

Cristal violeta: 10 g/l en agua destilada.

Safranina (solución madre): 25 g/l en etanol.

Safranina (solución de trabajo): solución madre diluida 1/10.

Lugol: 10 g I<sub>2</sub> + 20 g KI en 1 litro de agua destilada.

Decolorante: etanol-acetona 4:1.

Las soluciones se filtran antes de utilizarlas.

Protocolo:

*Tiempo de exposición (seg)*

Cristal violeta 120

Lugol 30

Lugol 30

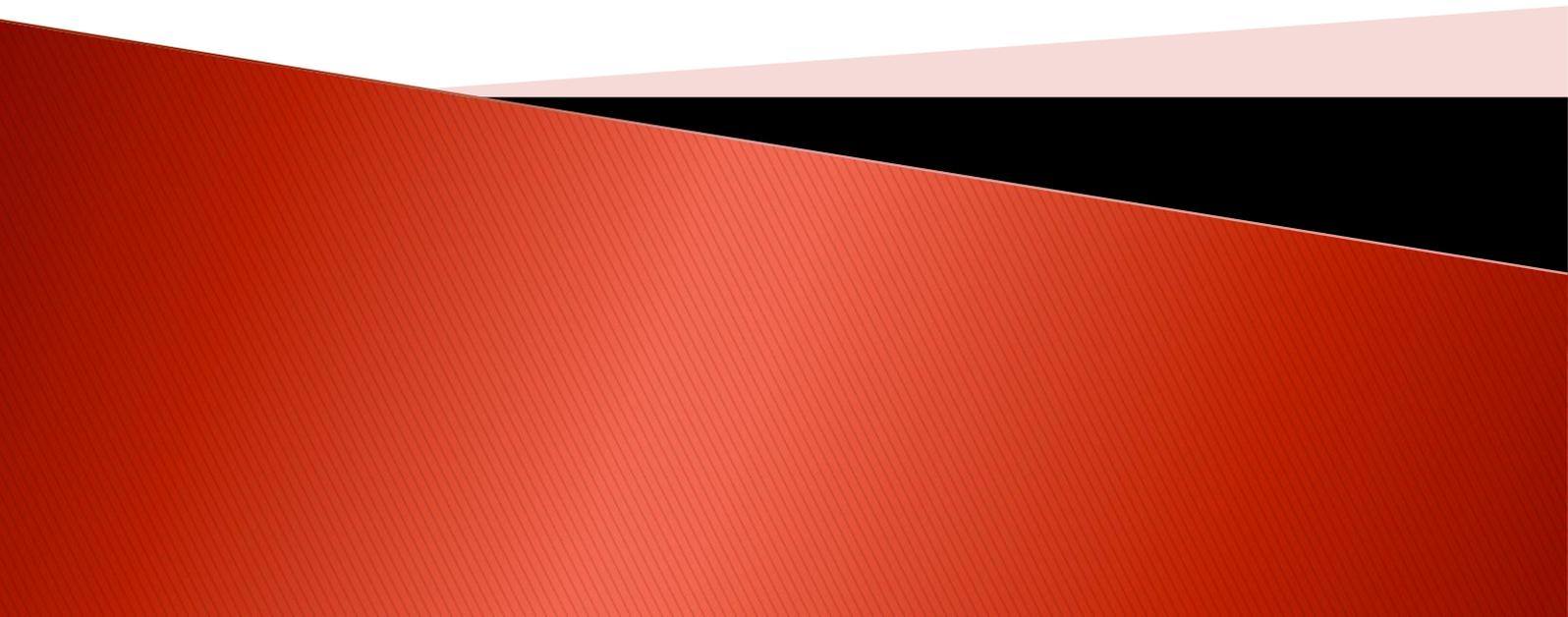
Lavar con agua

Decolorante 10

Lavar con agua

Safranina 120

# APPENDICE II



## Apéndice II

### Cultivo de células y preparación de placas

Se utilizaron células de la línea Hep -2 (pasaje 8 a 14) y la línea Vero (pasaje 23 a 30).

Las células se mantienen congeladas en nitrógeno líquido en viales de 1 ml de medio.

DMEM completo con 5% de dimetilsulfóxido (Riedel-de Haën AG, D-3016 Seelze, Alemania) como crioprotector. Para reactivarlas se descongeló un vial a 37° C, se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos para retirar el crioprotector, se resuspendieron las células en 1 ml de medio de cultivo fresco, y se cultivaron en una botella de 25 cm<sup>2</sup> (Corning Costar Co., Cambridge, MA, USA) con 4 ml de medio DMEN completo.

El cultivo se mantuvo a 37° C en estufa con atmósfera controlada (5% CO<sub>2</sub> – 95% aire) cambiando el medio cada 2 días. A los 5-7 días se obtuvo una monocapa confluyente y se repicó a una botella de 75 cm<sup>2</sup>.

En cada repique la monocapa se observó en un microscopio invertido para verificar la uniformidad y continuidad de la monocapa.

Los repiques se realizaron de la siguiente manera: se descartó el medio ya agotado y se lavó la monocapa dos veces con PBS estéril, luego se colocó 10 ml de solución de tripsina (Tripsina 0.75 gr/l; EDTA 0.2 gr/l) y se llevó a la estufa a 37° C durante 5-8 minutos.

Cuando se observaron los primeros indicios de desprendimiento celular, se levantó la monocapa con ayuda de un *scraper* y se diluyó en 10 ml de DMEM para inactivar la enzima. Se centrifugó a baja velocidad durante 5 minutos, se descartó el medio y se reemplazó por medio DMEM fresco.

Se tomaron 50  $\mu$ l de la suspensión de células y se mezclaron con igual volumen de una solución de azul tripán (al 10 % en PBS).

Se realizó el recuento de células en una cámara de Neubauer contando solo aquellas células que se veían brillantes (es decir, que estaban viables).

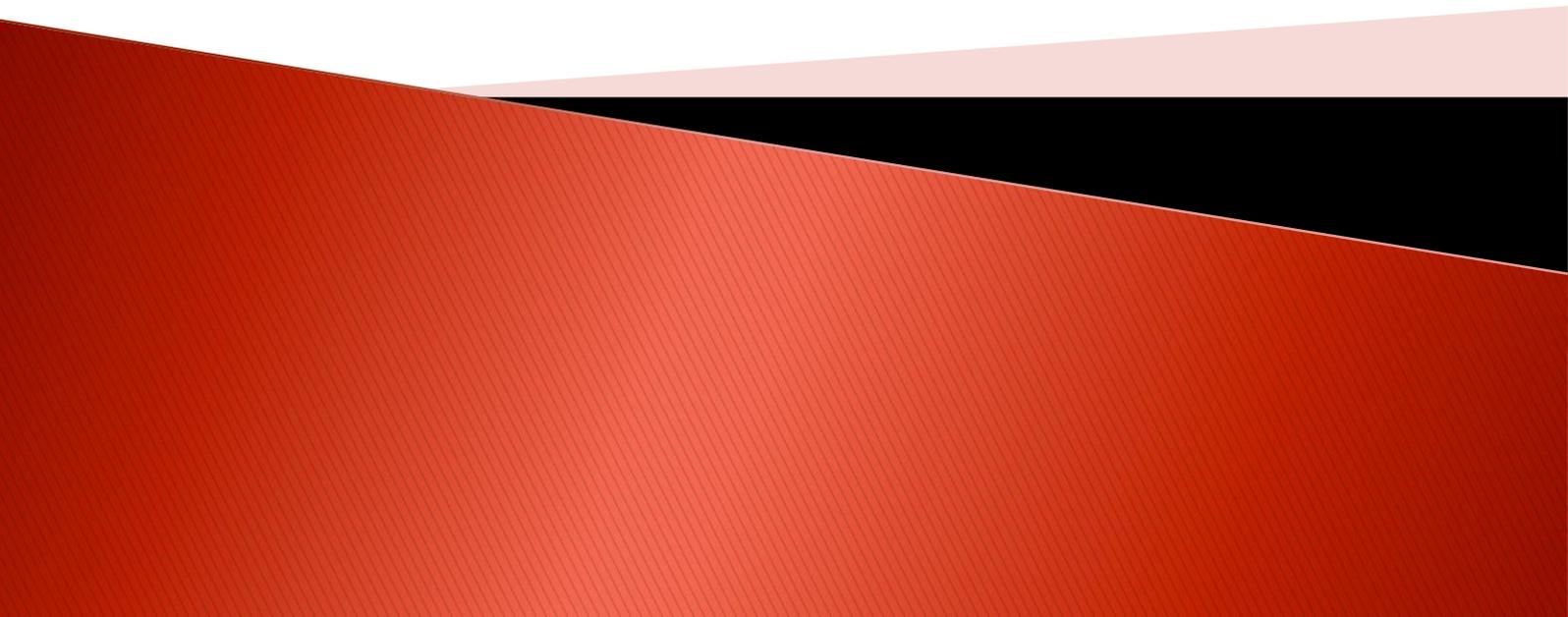
Se realizó la dilución apropiada para cada línea celular y se procedió a preparar las placas para los ensayos. Para las células Hep.2 se agregaron  $3.5 \cdot 10^4$  células/fosa y para la línea Vero se agregaron  $2.5 \cdot 10^5$  células/fosa.

Para los ensayos, las células fueron sembradas en placas de 24 fosas (Corning Costar Co., Cambridge, MA, USA).

A cada fosa se le agregó 0.5 ml de la suspensión de células correspondiente para cada línea. Las placas con células Caco-2 se incubaron 15 días (células en confluencia) a 37° C en una estufa de atmósfera controlada (5% CO<sub>2</sub> – 95% aire) cambiando el medio cada 2 días. Las células de la línea Caco-2/TC7 se incubaron 7 días en las mismas condiciones que se utilizaron para la línea Caco-2.

Para los ensayos en donde se realizó una observación microscópica, las células se crecieron sobre un vidrio de 12 mm de diámetro colocado dentro de la fosa. Estos vidrios fueron previamente lavados con agua y detergente no iónico (Extran MAO2 neutro, Merck, Darmstadt, Alemania) y luego de un enjuague exhaustivo con agua destilada, se colocaron en cajas de petri y se esterilizaron en autoclave.

# APPENDICE III



## Apéndice III

### 1. Método de Bradford

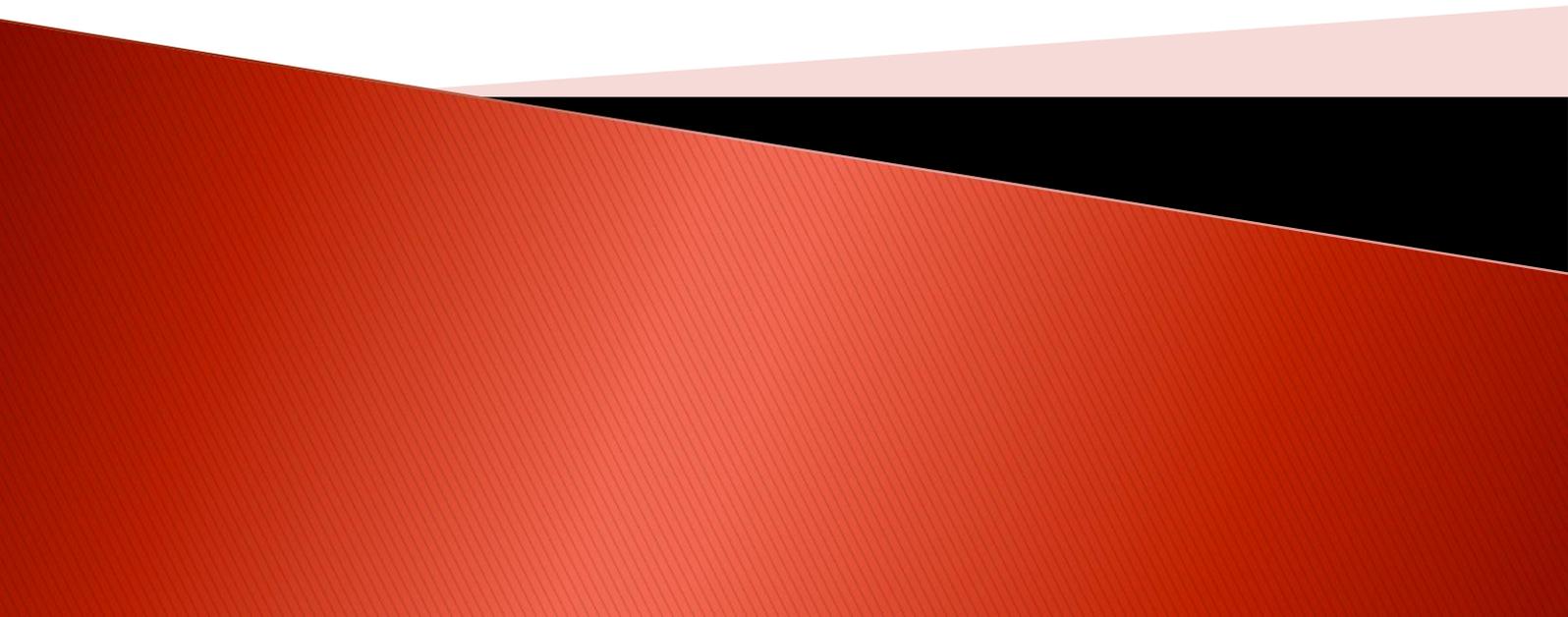
Se preparó una solución de colorante disolviendo 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G -250 en una mezcla de 100 ml de ácido fosfórico 85% y 50 ml de etanol 95%. Una vez que el colorante se disolvió completamente, se llevó a 1 litro con agua destilada fría.

Se colocaron 20  $\mu$ l de muestra en un tubo de hemólisis y se le agregaron 50  $\mu$ l de NaOH 1 M y 1 ml de la solución de colorante.

Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 590 nm en cubetas de poliestireno.

Se realizó una curva de calibración con patrones de seroalbúmina bovina (BSA) en agua y/o en urea 3M. Se graficó DO vs. mg/ml de proteína *standard*, y de los datos de la regresión lineal se calcularon las concentraciones de proteína analizadas.

# BIBLIOGRAFÍA



## BIBLIOGRAFÍA

- Abadias M, Benabarre A, Taixidó N, Usall J & I V** 2001 Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology* **65** 173-182
- Abe F, Muto M, Yaeshima T, Iwatsuki K, Aihara H, Ohashi Y & Fujisawa T** 2009 Safety evaluation of probiotic bifidobacteria by analysis of mucin degradation activity and translocation ability. *Anaerobe* doi: 10.1016/j.anaerobe.2009.07.006
- Abo-Amer** 2007 Molecular characterization of antimicrobial compound produced by *Lactobacillus acidophilus* AA11. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 54 (2), pp. 107–119.
- Abraham A, De Antoni G & Añón M** 1990 Effect of calcium on the cryopreservation of *L. bulgaricus* in different freezing media. *Cryobiology* **27** 336
- Aiba Y, Suzuki N, Kabir AM, Takagi A, Koga Y.** Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 2097-2101.
- Akinrele IA, 1970.** Fermentation studies on maize during the preparation of a traditional African starch-cake food. *J.Sci. Food Agric.* 21,619-625.
- Alander M, Korpela R, Saxelin M, Vilpponen-Salmela T, Mattila-Sandholm T, von Wright A.** 1997 Recovery of *Lactobacillus rhamnosus* GG from human colonic biopsies. *Lett Appl Microbiol*; 24: 361-4.
- Alfaleh K, Bassler D.** 2008 Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*; 1: CD005496.,
- Angulo L, Lopez E & Lema C** 1993 Microflora present in kefir grains of the Galician region north-west of Spain. *Journal of Dairy Research* **60** 263-267
- Anukam KC, Osazuwa E, Osemene GI, Ehigiagbe F, Bruce AW, Reid G.** 2006 Clinical study comparing probiotic *Lactobacillus* GR-1 and RC-14 with metronidazole vaginal gel to treat symptomatic bacterial vaginosis. *Microbes Infect*
- Arribas Arribas MB, Tesis Doctoral** 2009. Probióticos: una nueva estrategia en la modulación del sistema inmune.
- Arribas B, Rodriguez M, Camueco D, Zarzuelo A, Gálvez J.** 2008. Aplicaciones terapéuticas de los probióticos. Review article. *Ars Pharm* 49(1).
- Bach JF.** The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002; 347(12):911-920.

- Balcazar J, Vendrell D, de Blas I, Ruiz-Zarzuola I & Muzquiz J 2009** Effect of *Lactococcus lactis* CLFP 100 and *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196 on *Aeromonas salmonicida* Infection in brown trout (*Salmo trutta*). *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **17** 153-157
- Barbut, F., B. Gariazzo, L. Bonne, V. Lalande, B. Burghoffer, R. Luiuz, and J.-C. Petit. 2007.** Clinical features of *Clostridium difficile*—associated infections and molecular characterisation of strains: results of a retrospective study, 2000-2004. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **28**:131–139.
- Bartlett JG, Chang TW, Moon N, Onderdonk AB. 1978** Antibiotic-induced lethal enterocolitis in hamsters: studies with eleven agents and evidence to support the pathogenic role of toxin-producing *Clostridia*. *Am J Vet Res.* Sep;39(9):1525-30.
- Bartlett, J. G., A. B. Onderdonk, R. L. Cisneros, and D. L. Kasper. 1977.** Clindamycin associated colitis due to a toxin producing species of *Clostridium* in hamsters. *J. Infect. Dis.* **136**:701–705.
- Bartlett, J. G., A. B. Onderdonk, R. L. Cisneros, and D. L. Kasper. 1977.** Clindamycin associated colitis due to a toxin producing species of *Clostridium* in hamsters. *J. Infect. Dis.* **136**:701–705.
- Bazzoli F, Zagari RM, Fossi S.** In vivo *Helicobacter pylori* clearance failure with *Lactobacillus acidophilus*. *Gastroenterology* 1992; **102**: A38.
- Beausoleil M, Fortier N, Guenette S, L'ecuyer A, Savoie M, Franco M, Lachaine J, Weiss K. 2007** Effect of a fermented milk combining *Lactobacillus acidophilus* CI1285 and *Lactobacillus casei* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Can J Gastroenterol*; **21**: 732-6.
- Berg R 1999** Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Advances in Experimental Medical Biology* **473** 11-30
- Berg, R.D. 1998** Probiotics, prebiotics or conbiotics' *Trends Microbiol.* **6**, 89-92.].
- Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. 1994,** *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut.* Apr;35(4):483-9.
- Berny & Hennebert 1991** Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spore during freeze-drying: Effects of protectants and cooling rates. *Mycologia* **83** 805-815
- Bhatia SJ, Kochar N, Abraham P 1989** *Lactobacillus acidophilus* inhibits growth of *Campylobacter pylori* in vitro. *J Clin Microbiol*;27:2328–30.
- Black F, Einarsson K, Lidbeck A, Orrhage K, Nord CE.** Effect of lactic acid producing bacteria on the human intestinal microbiota during ampicillin treatment. *Scand J Infect Dis* 1991; **23**: 247-254.

- Blanquet S, Garrait G, Beyssac E, Parrier C, Denis S, Hébrard G & Alric M 2005** Effects of cryoprotectants on the viability and activity of freeze-dried recombinant yeast as novel oral drug delivery systems assessed by an artificial system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **61** 32-39
- Borchers AT., Selmi C., Meyers FJ., Keen CL., Gershwin ME. 2009** Probiotics and immunity. *J Gastroenterol* **44**, 26-46.
- Borriello SP, Wilcox MH. 1998** Clostridium difficile infections of the gut: the unanswered questions. *J Antimicrob Chemother.* May;41 Suppl C:67-9. Review
- Borrueal, N., M. Carol, F. Casellas, M. Antolin, F. de Lara, E. Espin, J. Naval, F. Guarner, and J.R. Malagelada. 2002.** Increased mucosal tumour necrosis factor production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria. *Gut* **51**: 659–664.
- Bottazzi V, Zacconi C, Sarra PG, Dallavalle P, Parisi MG 1994** Kefir. *Microbiologia, chimica e tecnologia. L'Industria del latte.* **XXX** (1): 41-62..
- Bouvier M., Meance S., Bouley C., Berta J.L., Grimaud J.C. 2001** Effects of consumption of a milk fermented by the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 on colonic transit times in healthy humans. *Bioscience Microflora.* **20**, 43–48.
- Bracey D, Holyoak CD, Coote PJ 1998** Comparison of the inhibitory effect of sorbic acid and amphotericin B on *Saccharomyces cerevisiae*: is growth inhibition dependent on reduced intracellular pH? *J Appl Microbiol.* Dec;85(6):1056-66.
- Brandy LJ, Gallaher DD, Busta FF.** The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. *J Nutr* **2000**; **130** (suppl. 2S): 410S-414S.
- Brauman A, Keleke S, Malonga M, Miambi E, Ampe F, 1996** Microbiological and biochemical characterization of cassava retting, a traditional lactic acid fermentation for foo-foo (cassava flour) production. *Appl. Environ. Microbiology.* **62**,2854-2858.
- Bravo D, Rodriguez E, Medina M 2009** Nisin and lactacin 481 coproduction by *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewws' milk. *J. Dairy Sci,* **92** (10): 4805-11.
- Brock TD. 1961** Physiology of the conjugation process in the yeast *Hansenula wingei*.
- Brock, T.D. 1961.** Milestones in Microbiology. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ 275 pp. Elie
- Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, et al. 2003** Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol*;171:6164–72.
- Burkholder KM., Bhunia AK. 2009** Salmonella enterica serovar Typhimurium adhesion and cytotoxicity during epithelial cell stress is reduced by *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Gut Pathogens* **1**:14 doi:10.1186/1757-4749-1-14.

- Buts JP 2008.** Twenty-five years of research on *Saccharomyces boulardii* trophic effects: updates and perspectives. *Dig Dis Sci* Jun 5 [epub].
- Caballero-Franco C, Keller K, De SC, Chadee K. 2007** The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 292: G315–22.;
- Cadieux R, Burton J, Gardiner G.** *Lactobacillus* strains and vaginal ecology. *JAMA* 2002; 287: 1940-1941.
- Candela M, Perna F, Carnevali P, Vitali B, Ciati R, Gionchetti P, Rizzello F, Campieri M, Brigidi P 2008** Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *Int J Food Microbiol*. 2008 Jul 31;125(3):286-92. Epub Apr 30.
- Carman RJ, Evans RH. 1984** Experimental and spontaneous clostridial enteropathies of laboratory and free living lagomorphs. *Lab Anim Sci* Oct;34(5):443-52. Review.
- Carvalho A, Silva J, Ho P & Teixeira P 2004** Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* **14** 835-847
- Carvalho A, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata F & Gibbs P 2002** Effect of additives on survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage. *Biotechnology Letters* **24** 1587-1591
- Carvalho A, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata F & Gibbs P 2003** Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*. *Journal of Applied Microbiology* **94** 947-952
- Carvalho A, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata F & Gibbs P 2004** Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Biotechnology Progress* **20** 248-254
- Casas IA, Dobrogosz WJ. 2000** Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals. *Microb Ecol Health Dis*;12:257–85.
- Castagliuolo I, Lamont JT, Nikulasson ST, Pothoulakis C. 1996** *Saccharomyces boulardii* protease inhibits *Clostridium difficile* toxin A effects in the rat ileum. *Infect Immun*; 64: 5225–32. ;
- Castagliuolo I, LaMont JT, Nikulasson ST, Pothoulakis C. 1996** *Saccharomyces boulardii* protease inhibits *Clostridium difficile* toxin A effects in the rat ileum. *Infect Immun*;64:5225–32.
- Castex F, Corthier G, Jouvert S, Elmer GW, Lucas F, Bastide M. 1990** Prevention of *Clostridium difficile*-induced experimental pseudomembranous colitis by *Saccharomyces boulardii*: a scanning electron microscopic and microbiological study. *J Gen Microbiol*; 136: 1085–89.

- Champagne C, Gardner N, Brochu E & Beaulieu Y** 1991 The freeze-drying of lactic acid bacteria. A Review. *Canadian Institute of Food Science and Technology* **24** 118-128
- Chen TH, Wang SY, Chen KN, Liu JR, Chen Mj.** 2009 Microbiological and chemical properties of kefir manufactured by entrapped microorganisms isolated from kefir grains. *J Dairy Sci.* Jul;92(7):3002-13.
- Chen X, Xu J, Shuai J, Chen J, Zhang Z, Fang W.** 2007 The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *Int J Food Microbiol.* Apr 20;115(3):307-12. Epub 2007 Jan 16.
- Cheng H.** 2010 Volatile flavor compounds in yogurt: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 50(10):938-50.
- Chikindas ML, MJ García –Garcera, AJM Driesessen, AM Ledebøer, J Nissen-Mejer , IF Nes, T Abee, WN Konings and G Venema.**1993. PediocinPA-1, a Bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 Forms Hydrophilic Pores in the Cytoplasmic Membrane of Target Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3577-3584.
- Coconnier MH, Bernet MF, Kernéis S, Chauvière G, Fourniat J, Servin AL.** 1993 Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. *FEMS Microbiol Lett.* Jul 1;110(3):299-305.
- Coconnier MH, Lievin V, Bernet-Camard MF, Hudault S, Servin AL.** 1997 Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Antimicrob Agents Chemother*; 41: 1046-52.
- Cohendy, M.** Description du ferment lactique puissant capable de s'acclimater dans l'intestine de l'homme. *C. R. Soc. Biol.* 1906b; 60: 558.
- Collado MC, Gueimonde M, Hernández M, Sanz Y, Salminen S.** 2005 Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion. *J Food ProtDec*; 68(12):2672-8.
- Commane D., Hughes R., Shortt C., Rowland I** 2005 The potential mechanisms involved in the anticarcinogenic actions of probiotics. *Mut Res* 591, 276-289.
- Corr SC, Gahan CG, Hill C.** 2007 *Bifidobacterium* species on *Listeria monocytogenes* infection and the mucosal immune response. *FEMS Immunol Med Microbiol*; 50: 380–88. ;
- Corthésy B., Gaskins HR., Mercenier A.** 2007 Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *J Nutr* 137, 781S-790S.
- Cross ML, Stevenson LM, Gill HS.** Anti-Allergy properties of fermented foods: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria?. *Intern Immunopharm* 2001; 1: 891-901.

- Cukrowska, B., Lodinova-Zadnikova, R., Enders, C., Sonnenborn, U., Schulze, J. and Tlaskalova-Hegenova, H. 2002** Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with nonpathogenic probiotic *E. coli* strain Nissle 1917. *Scand. J. Immunol.* 55, 204-209.
- Cummings JH.** Short chain fatty acids in the human colon. *Gut* 1981; 22: 763-779.
- Czerucka D, Piche T, Rampal P, 2007** Review article: yeast as probiotic- *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 26, 767-778.
- Czuprynski CJ, Johnson WJ, Balish E, Wilkins T. 1983** Pseudomembranous colitis in *Clostridium difficile*-monoassociated rats. *Infect Immun.* Mar;39(3):1368-76.
- De Antoni G, Pérez P, Abraham A & Añón C 1991** Trehalose, a cryoprotectant for *L. bulgaricus*. *Cryobiology* 26 149–153
- de Urraza P, & De Antoni G 1997** Induced cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBB by preincubation at suboptimal temperatures with a fermentable sugar. *Cryobiology* 35 159-164
- de Valdez GF, de Giori GS, de Ruiz Holgado AP, Oliver G. 1985** Effect of the rehydration medium on the recovery of freeze-dried lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol.* Nov;50(5):1339-41.
- De Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J.** Probiotics- compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (suppl. 2): 421S-429S.
- Del Miraglia GM, De Luca MG.** The role of probiotics in the clinical management of food allergy and atopic dermatitis. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38: S84-S85.
- DeSimone C.** The adjuvant effect of yogurt on gamma interferon by Con-A stimulated human lymphocytes. *Nutr Rep Int* 1986; 33: 419-433.
- Diplock AT, Aggett PJ, Ashweel M, Bornet F, Fern EB, Roberfroid M.** Scientific concepts of functional foods in Europe consensus documents. *Br J Nutr* 1991; 81: S1.
- Echeverría I, Garrote G & De Antoni G 2007** Formulación de una leche fermentada probiótica y con bajo contenido de lactosa. *Tecnología Láctea Latinoamericana* 48 44-47
- Eckmann L, Kagnoff MF, Fierer J 1995** Intestinal epithelial cells as watchdogs for the natural immune system. *Trends Microbiol.* Mar;3(3):118-20.
- Elmer, G.W. 2001** Probiotics: 'Living drugs. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 58, 1101-1109.
- Ertekin B, Guzel-Seydim ZBJ Sci Food Agric. 2010** Effect of fat replacers on kefir quality Mar 15;90(4):543-8.

- Eveillard M, Fourel V, Barc MC, Kernéis S, Coconnier MH, Karjalainen T, Bourlioux P, Servin AL. 1993** Identification and characterization of adhesive factors of *Clostridium difficile* involved in adhesion to human colonic enterocyte-like Caco-2 and mucus-secreting HT29 cells in culture. *Mol Microbiol.* Feb;7(3):371-81.
- Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V.** Intestinal microbiota in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr* 2003; 91(suppl.): 48-55.
- Farnworth E** 2005 Kefir - a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin* 2 1-17
- Fernandes CF, Shahani KM, Amer MA.** Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacillic fermented dairy products. *FEMS Microbiol Rev* 1987; 46: 343-356.
- Figueiredo, P.P., Vieira, E.C., Nicoli, J.R., Nardi, R.D., Raibaud, P., Duval-Iflah, Y. and Penna, F.J. 2001** Influence of oral inoculation with plasmid-free human *Escherichia coli* on the frequency of diarrhea during the first year of life in human newborns. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 33, 70-74.
- Floch MH, Hong-Curtiss J.** Probiotics and functional foods in gastrointestinal disorders. *Curr Gastroenterol Reports* 2001; 3: 343-350.
- Font de Valdez G, Savoy de Giori G, Pesce de Ruiz Holgado A, Oliver G. 1983** Comparative study of the efficiency of some additives in protecting lactic acid bacteria against freeze-drying. *Cryobiology.* Oct;20(5):560-6.
- Forestier C, De Champs C, Vatoux C, Joly B. 2001** Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties *Res Microbiol.* 152(2):167-73.
- Fuller R 1989** Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*;66:365–78.
- .
- Gagnon, Kheadr EE, Le Blay G, Fliss I; 2004** In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. *Int J Food Microbiol.* Apr 1;92(1):69-78.
- Gaón D, García H, Winter L, Rodríguez N, Quintás R, González SN, et al.** Effect of *Lactobacillus* strains and *Saccharomyces boulardii* on persistent diarrhea in children. *Medicina* 2003; 63: 293-298. *Ars Pharm* 2008; 49 (1)
- Garrote G** 2000 Bacterias lácticas y levaduras para la industria alimentaria: kefir. Tesis doctoral Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Garrote G** 2000 Bacterias lácticas y levaduras para la industria alimentaria: kefir. PhD Thesis Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Garrote G** 2000 Bacterias lácticas y levaduras para la industria alimentaria: kefir. PhD Thesis Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

- Garrote G, Abraham A & De Antoni G** 2001 Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research* **68** 639-652
- Garrote G, Delfederico L, Bibiloni R, Abraham A, Perez P, Semorile L & De Antoni G** 2004 Lactobacilli isolated from kefir grains: evidence of the presence of S-layer proteins. *Journal of Dairy Research* **71** 222-230
- Garrote G, Delfederico L, Bibiloni R, Abraham A, Perez P, Semorile L & De Antoni G** 2004 Lactobacilli isolated from kefir grains: evidence of the presence of S-layer proteins. *Journal of Dairy Research* **71** 222-230
- Gasche C.** Complications of inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 2000; 47(31): 49-56.
- Gassull MA, Cabré E.** Clinical guidelines for the diagnosis of IBD. En: Management of inflammatory bowel disease. Barcelona: Prous Science 1994; 7-12.
- Giannasca, P. J., Z.-X. Zhang, W.-D. Lei, J. A. Boden, M. A. Giel, T. P. Monath, and W. D. Thomas.** 1999. Serum anti-toxin antibodies mediate systemic and mucosal protection from *Clostridium difficile* disease in hamsters. *Infect. Immun.* 67:527–538.
- Gill HS.** 2003 Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Practical Research on Clinical Gastroenterology.* 17, 755–73.
- Gionchetti P, Rizzello F, Helwig U, Venturi A, Lammers KM, Brigidi P, et al.** Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2003; 124: 1202-1209.
- Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, Brigidi P, Matteuzzi D, Bazzocchi G, et al.** Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2000; 119:305-309.
- Goldin BR, Gualtieri LJ, Moore RP.** The effect of *Lactobacillus* GG on the initiation and promotion of DMH-induced intestinal tumors in the rat. *Nutr Cancer* 1996; 25: 197-204.
- Golowczyc M, Gugliada M, Hollmann A, Delfederico L, Garrote G, Abraham A, Semorile L & De Antoni G** 2008 Characterization of homofermentative lactobacilli isolated from kefir grains: potential use as probiotic. *Journal of Dairy Research* **75** 211-217
- Golowczyc M, Gugliada M, Hollmann A, Delfederico L, Garrote G, Abraham A, Semorile L & De Antoni G** 2008 Characterization of homofermentative lactobacilli isolated from kefir grains: potential use as probiotic. *Journal of Dairy Research* **75** 211-217
- Golowczyc M, Gugliada M, Hollmann A, Delfederico L, Garrote G, Abraham A, Semorile L & De Antoni G** 2008 Characterization of homofermentative lactobacilli isolated from kefir grains: potential use as probiotic. *Journal of Dairy Research* **75** 211-217

- Golowczyc M, Mobili P, Garrote G, Abraham A & De Antoni G** 2007 Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology* **118** 264-273
- Golowczyc M, Mobili P, Garrote G, Abraham A & De Antoni G** 2007 Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology* **118** 264-273
- Golowczyc M, Mobili P, Garrote G, Abraham A & De Antoni G** 2007 Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology* **118** 264-273
- Gopal PK., Prasad J., Smart J., Gill HS.** 2001 In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol* 67, 207-216.
- Gorbach SL.** Probiotics and Gastrointestinal Health. *Am J Gastroenterol* 2000; 95 (suppl. 1): S1-S4.
- Guandalini S.** Probiotics for children: use in diarrhea. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 244-248.
- Guérin-Danan C, Andrieux C, Popot F, Charpilienne A, Vaissade P, Gaudichon C, et al.** Pattern of metabolism and composition of the fecal microbiota in infants 10 to 18 months old from day care centers. *Am J Pediatr Gastroenterol* 1997; 25: 281-289.
- Guslandi M, Mezzi G, Sorghi M, Testoni PA.** *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 1462-1464.
- Guzel-Seydim Z, Seydim AC, Greene AK.** 2000 Organic acids and volatile flavor components evolved during refrigerated storage of kefir. *J Dairy Sci.* 83(2):275-7.
- Haller D, Bode C, Hammes WP, Pfeifer AM, Schiffrin EJ, Blum S.** Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut* 2000; 47: 79-87.
- Halm M, Lillie A, Sorensen AK, Jakobsen M,** 1993 Microbiological and aromatic characteristics of fermented maize doughs for kenkey production in Ghana. *Int.J. Food Microbiology.* 19, 135-143.
- Hansen A, Hansen B,** 1996 Flavour of sourdough wheat crumb. *Z. Lebensm.-Unters-Forsch.* 202. 244-249.
- Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, et al.** Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30: 61-67.
- Hassan AN, Frank JF, Shalabi SI.** . 2001 Factors affecting capsule size and production by lactic acid bacteria used as dairy starter cultures. *Int J Food Microbiol* Feb 28;64(1-2):199-203

- Hedin C., Whelan K, Lindsay JO. 2007** Evidence for the use of probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: a review of clinical trials. *Proc Nutr Soc*; 66: 307–15.,
- Hickson M, D´Souza AL, Muthu N, Rogers TR, Want S, Rajkumar C, Bulpitt CJ. 2007** Use of probiotic Lactobacillus preparation to prevent diarrhea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *BMJ*; 335: 80.
- Hilton E, Isenberg HD, Alperstein P, France K, Borenstein MT.** Ingestion of yogurt containing Lactobacillus acidophilus as prophylaxis for Candidal vaginosis. *Ann Int Med* 1992; 116: 353-357.
- Hilton E, Kolakawaki P, Singer C, Smith M.** Efficacy of Lactobacillus GG as a diarrhea preventive in travelers. *JTravel Med* 1977; 4: 41-43.
- Hirayama K, Rafter J. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. Microbes Infect 2000; 2: 681-686.**
- Hudspith BN, Rouzard G, Gibson GR, et al. 2006** Probiotic bacteria inhibit epithelial cell IL-8 production: Role of TLR receptor engagement. *Gut*; 55: A38. ;
- Hugo A, Kakisu E, De Antoni G & Perez P 2008** Lactobacilli antagonize biological effects of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* *in vitro*. *Letters in Applied Microbiology* **46** 613-619J *Gen Microbiol. Nov*;26:487-97. No abstract available
- Ishikawa H, Akedo I, Umesaki Y, Tanaka R, Imaoka A, Otani T.** Randomized controlled trial of the effect of bifidobacteria fermented milk on ulcerative colitis. *J Am Coll Nutr* 2003; 22: 56-63.
- Isogai H, Isogai E, Hayashi S, Kimura K, Kubota T, Fujii N, et al.** Experimental Helicobacter pylori infection in association with other bacteria. *Microbiol Immunol* 1997; 41: 361-365.
- Isolauri E, Kirjavainen PV, Salminen S.** Probiotics – a role in the treatment of intestinal infection and inflammation. *Gut* 2002; 50: 54-59.
- Jack RW, Tagg JR, Ray B.** Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol Rev* 1995; 59: 171-200.
- Jiang T, Savaiano DA.** Modification of colonic fermentation by bifidobacteria and pH *in vitro*. Impact on lactose metabolism, short-chain fatty acid, and lactate production. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 2370-2377.
- Juárez Tomás MS, Bru E, Martos G, Nader-Macías ME 2009.**Stability of freeze-dried vaginal Lactobacillus strains in the presence of different lyoprotectors. *Can J Microbiol. May*;55(5):544-52
- Kabir AM, Aiba Y, Takagi A, Kamiya S, Miwa T, Koga Y.** Prevention of Helicobacter pylori infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. *Gut* 1997; 41: 49-55. *30 Ars Pharm* 2008; 49 (1):

- Kagnoff MF, Eckmann L. 1997** Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest.* Jul 1;100(1):6-10. Review.
- Kajander K, Myllyluoma E, Rajilic-Stojanovic M 2008**, et al. Clinical trial: multispecies probiotic supplementation alleviates the symptoms of irritable bowel syndrome and stabilizes intestinal microbiota. *Aliment Pharmacol Ther*; 27: 48–57.
- Kakisu EJ, Abraham AG, Pérez PF, De Antoni GL. 2007** Inhibition of *Bacillus cereus* in milk fermented with kefir grains. *J Food Prot.* 70(11):2613-6.
- Kalliomaki MA, Isolauri E.** Probiotics and down-regulation of the allergic response. *Immunol Allergy Clin North Am* 2004; 24: 739-752.
- Kampman E, Giovannucci E, van't Veer P, Rimm E, Stampfer MJ, Colditz GA, et al.** Calcium, vitamin D, dairy foods, and the occurrence of colorectal adenomas among men and women in two prospective studies. *Am J Epidemiol* 1994; 139: 16-29.
- Katchar K, Taylor CP, Tummala S, Chen X, Sheikh J, Kelly CP 2007.** Association between IgG2 and IgG3 subclass responses to toxin A and recurrent *Clostridium difficile*-associated disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*; 5: 707–13.
- Kaur S, Vaishnavi C, Ray P, Kochhar R, Prasad KK. 2010** Effect of biotherapeutics on cyclosporin-induced *Clostridium difficile* infection in mice. *J Gastroenterol Hepatol.*25(4):832-8. Epub 2010 Jan 14.
- Kingamkono R, Sjogren E, Svanberg U, Kaijser B, 1994** pH and acidity in lactic-fermenting cereal gruels: effects on viability of enteropathogenic microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnology*, 10, 664-669.
- Kingamkono R, Sjogren E, Svanberg U, Kaijser B, 1995** Inhibition of different strains of enteropathogens in a lactic fermentating cereal gruels. *World J. Microbiol. Biotechnology*,11, 299-303.
- Kink, J. A., and J. A. Williams. 1998.** Antibodies to recombinant *Clostridium difficile* toxins A and B are effective treatment and prevent relapse of *C. difficile*-associated disease in a hamster model of infection. *Infect. Immun.* 66:2018–2025..
- Kirjavainen PV, El-Nezami HS, Salminen SJ, Ahokas JT, Wright PF.** The effect of orally administered viable probiotic and dairy lactobacilli on mouse lymphocyte proliferation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 26: 131-135.
- Klaenhammer TR. 1993** Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes Infect* 2002;4:319– 24. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria *FEMS Microbiol Rev*; 12:39–85; Reid G, Burton J.
- Klaenhammer, T.R. 1988** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70, 337-349.

- Klaenhammer, T.R. 1993** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 39-86.
- Kohwi T, Imai K, Tamura A, Hashimoto Y.** Antitumor effect of *Bifidobacterium infantis* in mice. *Gann* 1978;69: 613-618.
- Komatsu H, Koo A, Ghadishah E, Zeng H, Kuhlenkamp JF, Inova M. 1992** Neutrophil accumulation in ischemic reperfused rat liver evidence for a role of superoxide free radicals. *Am J Physiol*;262(4 Pt 1):6669-76.
- Krebs HA, Wiggins D, Stubbs M, Sols A, and Bedoya F, 1983** Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochem J.* 15; 214(3): 657–663.
- Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, et al. 2004** Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut*; 53: 1617–23.
- Kruis, W., Schutz, E., Fric, P., Fixa, B., Judmaier, G. and Stolte, M. 1997** Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 11, 853-858.
- Kunz A, Noel J & Firchok M 2004** Two case of *Lactobacillus* bacteremia during probiotic treatment of short gut syndrome. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 38 457–458
- Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP. 2001** Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet*; 357: 189–93.;
- Lammers KM, Vergopoulos A, Babel N, Gionchetti P, Rizzello F, Morselli C, et al.** Probiotic therapy in the prevention of pouchitis onset: decreased interleukin-1beta, interleukin-8, and interferon-gamma gene expression. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 447-454.
- Land M, Rouster-Stevens K, Woods C, Cannon M, Cnota J & Shetty A 2005** *Lactobacillus* sepsis associated with probiotic therapy. *Pediatrics* 115 178–181
- Larson HE, Borriello SP. 1990** Quantitative study of antibiotic-induced susceptibility to *Clostridium difficile* enterocolitis in hamsters. *Antimicrob Agents Chemother.* Jul;34(7):1348-53.
- Larson HE, Price AB, Honour P, Borriello SP. 1978** *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. *Lancet.* May 20;1(8073):1063-6.
- Larson, H. E., A. B. Price, and S. P. Boriello. 1980.** Epidemiology of experimental enterocolitis due to *Clostridium difficile*. *J. Infect. Dis.* 142:408–413.
- Le Blay G, Michel C, Blottiere HM, Cherbut C.** Prolonged intake of fructooligosaccharides induces a short-term elevation of lactic acid-producing bacteria and a persistent increase in cecal butyrate in rats. *J Nutr* 1999; 129: 2231-2235.

- Lee YK and Salminen S, 1995** The coming age of probiotic. *Trends food Sci. Technol.* 6:241-245.
- Leslie S, Israeli E, Lighthart B, Crowe J & Crowe L 1995** Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and Environmental Microbiology* **61** 3592-3597
- Liévin V, Peiffer I, Hudault S., Rochat F, Brassart D, Neeser JR, et al.** Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microbiota exert antimicrobial activity. *Gut* 2000; 47: 646-652.
- Lilly DM, Stillwell RH. 1965** Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science.* Feb 12;147:747-8.
- Lim HJ., Kim SY., Lee WK. 2004** Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use. *J Vet Sci* 5, 391-395.
- Lin WH., Yu B., Lin CK., Hwang WZ., Tsen HY. 2007** Immune effect of heat-killed multistrain of *Lactobacillus acidophilus* against *Salmonella typhimurium* invasion in mice, 102, 22-31.
- Linders L, Wolkers W, Hoekstra F & van 't Riet K 1997** Effect of added carbohydrates on membrane phase behavior and survival of dried *Lactobacillus plantarum*. *Cryobiology* **35** 31-40
- Liu CF, Hu CL, Chiang SS, Tseng KC, Yu RC, Pan TM. 2009** Beneficial Preventive Effects of Gastric Mucosal Lesion for Soy-Skim Milk Fermented by Lactic Acid Bacteria *J Agric Food Chem.* Apr 9. [Epub ahead of print]
- Lodato P, Segovia de Huergo M & Buera M 1999** Viability and thermal stability of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* freeze-dried in different sugar and polymer matrices. *Applied Microbiology and Biotechnology* **52** 215-220
- Lodinova-Zadnikova, R. and Sonnenborn, U. 1997** Effect of preventive administration of a nonpathogenic *Escherichia coli* strain on the colonization of the intestine with microbial pathogens in newborn infants. *Biol. Neonate* 71, 224-232.
- Lodinova-Zadnikova, R., Slavikova, M., Tlaskalova-Hogenova, H., Adlerberth, I., Hanson, L.A., Wold, A., Carlson, B., Svanborg, C. and Mellander, L. 1991** The antibody response in breast-fed and non-breast-fed infants after artificial colonization of the intestine with *Escherichia coli* O83. *Pediatr. Res.* 29, 396-399.
- Lopitz-Otsoa F, Rementeria A, Elguezabal N, Garaizar J. 2006** Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Rev Iberoam Micol.* Jun;23(2):67-74
- Lord Lister and the "Development of Antiseptic Surgery," 1878**
- Lowe BR, Fox J, Bartlett JG. 1980.** *Clostridium difficile*-associated colitis in guinea pigs exposed to penicillin. *Am J Vet Res*;41:1277-9.

- Lykova EA, Bondarenko VM, Izachik IuA, Izachik NA, Grigor'ev AV, Murashov AO, et al.** The probiotic correction of microecological and immune disorders in gastroduodenal pathology in children. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1996; 2: 88-91.
- M, D'Souza AL, Muthu N, Rogers TR, Want S, Rajkumar C, Bulpitt CJ.** 2007 Use of probiotic Lactobacillus preparation to prevent diarrhea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *BMJ*; 335: 80
- Ma D, Forsythe P, Bienenstock J.** 2004 Live Lactobacillus reuteri is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. *Infect Immun*; 72: 5308–14.
- Ma M, Vidal J, Saputo J, McClane BA, Uzal F.** 2011 The VirS/VirR Two-Component System Regulates the Anaerobic Cytotoxicity, Intestinal Pathogenicity, and Enterotoxemic Lethality of Clostridium perfringens Type C Isolate CN3685. *MBio*. Jan 25;2(1). pii: e00338-10.
- Maassen CB, van Holten-Neelen C, Balk F, den Bak-Glashouwer MJ, Leer RJ, Laman JD, Boersma WJ, et al.** Strain dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered Lactobacillus strains. *Vaccine* 2000; 18: 2613-2623.
- MacFarlane GT, Cummings JH.** Probiotics, infection and immunity. *Curr Opin Infect Dis* 2002; 15: 501-506.
- Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall L, Hollingsworth MA.** 1999 Probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol*; 276: G941–50
- Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM, Fedorak RN.** Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10 gene deficient mice. *Gastroenterology* 1999; 116: 1107-1114.
- Maeda Y, Noda S, Tanaka K, Sawamura S, Aiba Y, Ishikawa H, et al.** The failure of oral tolerance induction is functionally coupled to the absence of T cells in Peyer's patches under germfree conditions. *Immunobiology* 2001; 204: 442-457.
- Majamaa H, Isolauri E.** Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 179-185.
- Malchow HA. Crohn's disease and Escherichia coli.** A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease?. *J Clin Gastroenterol* 1997; 25: 653-658.
- Malhotra SL.** Dietary factors in a study of colon cancer from cancer registry, with special reference to the role of saliva, milk, and fermented milk products and vegetable fibre. *Med Hypotheses* 1977; 3: 122-134.

**Maqueda, M., M. Sa´nchez-Hidalgo, M. Ferna´ndez, M. Montalba´n-Lo´pez, E. Valdivia, and M. Martı´nez-Bueno. 2008.** Genetic features of circular bacteriocinas produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 32:2–22.

**Marco ML., Pavan S., Kleerebezem M. 2006** Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Curr Opi Biotechnol* 17, 204-210.

**M´arquez LA, Dunford HB, Wart HV. 1990** Kinetic studies on the reaction of compound II of myeloperoxidase with ascorbic acid. Role of ascorbic acid in myeloperoxidase function. *J Biol Chem*;265(10):5666-70. ;

**Marteau P, Lemann M, Seksik P, Laharie D, Colombel JF, Bouhnik Y, et al.** Ineffectiveness of *Lactobacillus johnsonii* LA1 for prophylaxis of postoperative recurrence in Crohn’s disease: a randomised, double blind, placebo controlled GETAID trial. *Gut* 2006; 55: 842-847.

**Marteau P, Shanahan F.** Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanism of action and side-effects. *Best Prac Res Clin. Gastroenterol* 2003; 17: 725-740.

**Marteau PR, de Vrese M, Cellier CJ, Schrezenmeir J.** Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 430S-436S.

**Martins FS., Dalmaso G., Arantes RM., Doye A., Lemichez E., Lagadec P., Imbert V., Peyron JF., Rampal P., Nicoli JR, Czerucka D. 2010.** Interaction of *Saccharomyces boulardii* with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium protects mice and modifies T84 cell response to the infection. *PLoS One* 5, e8925; doi: 10.1371/journal.pone.0008925.

**Martos GI, Minahk CJ, de Valdez GF, Morero R. 2007** Effects of protective agents on membrane fluidity of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Lett Appl Microbiol. Sep*;45(3):282-8.

**Matricardi PM, Rosmini F, Rapicetta M, Gasbarrini G, Strofolini T.** Atopy, hygiene and anthropometric lifestyle. *Lancet* 1999; 354: 430.

**Mattar AF, Teitelbaum DH, Drongowski RA, Yongyi F, Harmon CM, Coran AG. 2002** Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a caco-2 cell-culture model. *Pediatr Surg Int*; 18: 586–90. ;

**McCarthy J, O’Mahony L, Dunne C, Kelly P, Feeney M, Kiely B, et al.** An open trial of a novel probiotic as an alternative to steroids in mild/moderately active Crohn’s disease. *Gut* 2001; 49: A2447.

**McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, Fekety R, Elmer GW, Moyer KA, Melcher SA, Bowen KE, Cox JL, Noorani Z, et al. . 1994** A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. *JAMA* Jun 22-29;271(24):1913-8. Erratum in: *JAMA* 1994 Aug 17;272(7):518.

- McLean NW, Rosenstein IJ.** Characterisation and selection of a *Lactobacillus* species to re-colonise the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis. *J Med Microbiol* 2000; 49: 543-552.
- Mengjin Liu<sup>1,2\*</sup>, Jumamurat R Bayjanov<sup>1</sup>, Bernadet Renckens<sup>1</sup>, Arjen Nauta<sup>2</sup>, Roland J Siezen<sup>1,3,4</sup> 2010.** The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genomics* 2010, 11:36
- Mensah P, Tomkins AM, Drasar BS, Harrison TJ, 1991** Antimicrobial effect of fermented Ghanaian maize dough. *J. Appl. Bacteriol.* 70, 203-210.
- Metchnikoff** The prolongation of life The New Work Time Published: January 18, 1908
- Michetti P, Dorta G, Wiesel PH, Brassart D, Verdu E, Herranz M 1999** Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (johnsonii) La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans. *Digestion*;60:203–9.
- Midolo PD, Lambert JR, Hull R, Luo F, Grayson ML.** In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *J Appl Bacteriol* 1995; 79: 475-479.
- Mistou MY, Rigolet P, Chapot-Chartier MP, Nardi M, Gripon JC, Brunie S. 1994** Crystallization and preliminary X-ray analysis of PepC, a thiol aminopeptidase from *Lactococcus lactis* homologous to bleomycin hydrolase *J Mol Biol.* Mar 18;237(1):160-2.
- Montville TJ and Y Chen 1998.** Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions *Appl Microbiol Biotechnol* 50: 511-519.
- Morgan C, Herman N, White P & Vesey G 2006** Preservation of microorganisms by drying; a review. *Journal of Microbiological Methods* 66 183-193
- Morita H, He F, Fuse T, Ouwehand AC, Hashimoto H, Hosoda M, et al.** Adhesion of lactic acid bacteria to caco-2 cells and their effect on cytokine secretion. *Microbiol Immunol* 2002; 46: 293-297.
- Morrison DJ, Mackay WG, Edwards CA, Preston T, Dodson B, Weaver LT. 2006** Butyrate production from oligofructose fermentation by the human faecal flora: what is the contribution of extracellular acetate and lactate? *Br J Nutr*; 96: 570-577.
- Mowat AM 2003.** Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*; 3: 31-41.
- Mugula JK, Narvhus JA, Sorhaug T. 2003** Use of starter cultures of lactic acid bacteria and yeast in the preparation of togwa, a Tanzanian fermented food. *Int. J. Food Microbiology*, Jun 25;83(3):307-18.
- Murch SH 2001.** Toll of allergy reduced by probiotics. *Lancet*; 357: 1057-1059.

- Nobaek S, Johansson ML, Molin G, Ahrné S 2000.** Alteration of intestinal microbiota is associated with reduction of abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol*; 95: 1231-1238.
- Nopchinda S, Varavithya W, Phuapradit P, Sangchai R, Suthutvoravut U, Chantraruksa V, et al 2002.** Effect of Bifi do bacterium Bb12 with or without *Streptococcus thermophilus* supplemented formula on nutritional status. *J Med Assoc Thai*; 85 (suppl. 4): S1225-S1231.
- Nout MJR, 1991.** Ecology of accelerated natural lactic fermentation of sorghum-based infant food formulation. *Int. J. Food microbiology*. 12,217-224.
- Nout MJR, Rombouts FM, Hevelaar A, 1989.** Effect of natural lactic fermentation of infant food ingredients on some pathogenic microorganisms. *Int. J. Food Microbiology* 8, 351-361.
- Nyanga L, Nout M, Gadaga T, Theelen B, Boekhout T & Zwietering M 2007** Yeasts and lactic acid bacteria microbiota from masau (*Ziziphus mauritiana*) fruits and their fermented fruit pulp in Zimbabwe. *International Journal of Food Microbiology* **120** 159–166
- O’Sullivan MG, Thornton G, O’Sullivan GC, Collins JK 1992.** Probiotic bacteria: myth or reality. *Trends Food Sci Technol*; 3: 309-314.
- Obrador A, Riera J. Definitions. En: Gassull MA, Obrador A, Chantar C, eds 1994.** Management of Inflammatory Bowel Disease. Barcelona: Prous Science; 1-6.
- Ochsner UA, Bell SJ, O’Leary AL, Hoang T, Stone KC, Young CL, Critchley IA, Janjic N. 2009** Inhibitory effect of REP3123 on toxin and spore formation in *Clostridium difficile*, and in vivo efficacy in a hamster gastrointestinal infection model. *J Antimicrob Chemother*. May;63(5):964-71. Epub 2009 Feb 26.
- Ogawa T, Asai Y, Tamai R, Makimura Y, Sakamoto H, Hashikawa S, et al 2006.** Natural killer cell activities of symbiotic *Lactobacillus casei* ssp. *casei* in conjunction with dextran. *Clin Exp Immunol*; 143:103-109.
- Otero M, Espeche M & Nacer Macías M 2007** Optimization of the freeze-drying and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* for veterinarian probiotic applications. *Process Biochemistry* **42** 1406-1411
- Ouweland AC, Salminen S 1998.** The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *Int Dairy J*; 8: 749-758.
- P. Naaber, R.-H. Mikelsaar\*, S. Salminen and Marika Mikelsaar 1998** Bacterial translocation, intestinal microflora and morphological changes of intestinal mucosa in experimental models of *Clostridium difficile* infection. *J. Med. Microbiol.* - Vol. 47 (1998), 591-598

- Pagnini C., Saeed R., Bamias G., Arseneau KO., Pizarro T., Cominelli F. 2010.** Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proc Nat Acad Sci* 107, 454-459.
- Papapostolou H, Bosnea LA, Koutinas AA, Kanellaki M 2008** Fermentation efficiency of thermally dried kefir. *Bioresour Technol.* 99(15):6949-56. Epub 2008 Mar 4.
- Paredes-Sabja D, Sarker MR. 2011** Germination response of spores of the pathogenic bacterium *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* to cultured human epithelial cells. *Anaerobe.* Feb 8. [Epub ahead of print]
- Pavan S, Desreumaux P & Mercenier A 2003** Use of mouse models to evaluate the persistence, safety, and immunomodulatory capacities of lactic acid bacteria. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **10** 696-701
- Pereira CI, Neto DM, Capucho JC, Gião MS, Gomes AM, Malcata FX. 2010** How three adventitious lactic acid bacteria affect proteolysis and organic acid production in model Portuguese cheeses manufactured from several milk sources and two alternative coagulants. *J Dairy Sci.* 93(4):1335-44.
- Pochapin M. 2000** The effect of probiotics on *Clostridium difficile* diarrhea. *Am J Gastroenterol*;95(S1):S11-3.
- Podolsky DK 2002.** Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*; 347(6): 417-429.
- Pool-Zobel BL, Neudecker C, Domizlaff I, Ji S, Schillinger U, Rumney C, et al 1996.** Lactobacillus- and Bifidobacterium-mediated antigenotoxicity in the colon of rats. *Nutr Cancer*; 26: 365-380.
- Pothoulakis C, Kelly CP, Joshi MA, et al. 1993** *Saccharomyces boulardii* inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum. *Gastroenterology*; 104: 1108-15.)
- Prantera C, Scribano ML, Falasco G, Andreoli A and Luzi C 2002.** Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with *Lactobacillus GG*. *Gut*; 51: 405-409.
- Rangavajhyala N, Shahani KM, Sridevi G, Srikumaran S. 1997** Nonlipopolysaccharide component(s) of *Lactobacillus acidophilus* stimulate(s) the production of interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor-alpha by murine macrophages. *Nutr Cancer*; 28: 130-134.
- Rautava S, Kalliomaki M, Isolauri E 2002.** Probiotics during pregnancy and breastfeeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *J Allergy Clin Immunol*; 109: 119-121.

- Razaq N, Sambol S, Nagaro K, Zukowski W, Cheknis A, Johnson S, Gerding DN. 2007** Infection of hamsters with historical and epidemic BI types of *Clostridium difficile*. *J Infect Dis.* Dec 15;196(12):1813-9.
- Rehg JE, Lu YS. 1982.** *Clostridium difficile* typhlitis in hamsters not associated with antibiotic therapy. *J Am Vet Med Assoc* 181: 1422–1423
- Reid G 2000.** Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *Am J Clin Nutr*; 73(suppl.): 437S-443S.
- Reid, G., Howard, J. and Gan, B.S. 2001** Can bacterial interference prevent infection *Trends Microbiol.* 9, 424-428.
- Rembacken, B.J., Snelling, A.M., Hawkey, P.M., Chalmers, D.M. and Axon, A.T. 1999** Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 354, 635-639.]
- Resta-Lenert S y Barrett KE, 2003** Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut.* Jul; 52(7):988-97.
- Rinne M, Kalliomaki M, Arvilommi H, Salminen S, Isolauri E 2005.** Effect of probiotics and breastfeeding on the bifidobacterium and lactobacillus/enterococcus microbiota and humoral immune responses. *J Pediatr*; 147: 186-191.
- Roediger WE 1980.** The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficiency disease?. *Lancet*; 2: 712-715.
- Romanin D, Serradell M, González-Maciél D, Lausada N, Garrote G & Rumbo M 2010** Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeast isolated from kefir. *International Journal of Food Microbiology* **140** 102-108.
- Rosenfeldt V, Michaelsen KF, Jakobsen M, Larsen CN, Moller PL, Pedersen P, et al 2002.** Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in young children hospitalized with acute diarrhea. *Pediatr Infect Dis J*;21: 411–6.
- Rosslund E, Andersen Borge G, Langsrud T & Sorhaug T 2003** Inhibition of *Bacillus cereus* by strains of *Lactobacillus* and *Lactococcus* in milk. *International Journal of Food Microbiology* **89** 205-212
- Rosslund E, Langsrud T, Granum PE, Sørhaug T. 2005** Production of antimicrobial metabolites by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* co-cultured with *Bacillus cereus* in milk. *Int J Food Microbiol.* 1;98(2):193-200.
- Ruszczyński M, Radzikowski A, Szajewska H. 2008** Clinical trial: effectiveness of *Lactobacillus rhamnosus* (strains E/N, Oxy and Pen) in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children. *Aliment Pharmacol Ther*; 28: 154-61.

- Saarela, M., Lahteenmaki, L., Crittenden, R., Salminen, S. and Mattila-Sandholm, T. 2002** Gut bacteria and health foods - the European perspective'. *Int. J. Food Microbiol.* 78, 99-117.
- Saavedra J 2000**; Probiotics and infectious diarrhea. *Am J Gastroenterol* 95 (suppl.1): S16-S18.
- Saloff-Coste CJ 1996** Kefir. Nutritional and Health benefits of yoghurt and fermented milks. *Danone World Newsletter.* 11:1-7.
- Sambol SP, Tang JK, Merrigan MM et al. 2001** Infection of hamsters with epidemiologically important strains of *Clostridium difficile*. *J Infect Dis*; 183: 1760–6.)
- Sanders M & Klaenhametzcla microbianaer T 2001** Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *Journal of Dairy Science* **84** 319-331
- Sansonetti PJ. 2004** War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol*; 4: 953-964.
- Schlee M, Wehkamp J, Altenhoefer A, Oelschlaeger TA, Stange EF, Fellermann K. 2007.** Induction of human {beta}-Defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infect Immun*; 75: 2399–407.)
- Selmer-Olsen E, Birkeland S & Sorhaug T 1999** Effect of protective solutes on leakage from and survival of izezcla microbianaobilized lactobacillus subjected to drying, storage and rehydration. *Journal of Applied Microbiology* **87** 429-437
- Shahani KM, Ayabo AD. 1980** Role of dietary lactobacilli in gastrointestinal microecology. *Am J Clin Nutr*; 33:2448-2457.
- Sharma R, Schumacher U, Ronaasen V, Coates M 1995.** Rat intestinal mucosal responses to a microbial flora and different diets. *Gut*; 36: 209-214.
- Shida K, Takahashi R, Iwadate E, Takamizawa K, Yasui H, Sato T, et al 2002.** *Lactobacillus casei* strain Shirota suppresses serum immunoglobulin E and immunoglobulin G1 responses and systemic anaphylaxis in a food allergy model. *Clin Exp Allergy*; 32(4): 563-570.
- Shortt, C. 1998** Living it up for dinner. *Chemistry & Industry*; 8: 300-303.
- Silva M, Jacobus NV, Deneke C, Gorbach SL. 1987** Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrob Agents Chemother*; 31: 1231-3.
- Simpson PJ, Fantone JC. 1988** Identification of a time window for therapy to reduce experimental canine myocardial injury. *Circulation Res*;63(6):1070-9.)
- Solis-Pereyra D, Aattouri N, Lemonnier D 1997.** Role of food in the stimulation of cytokine production. *Am J Clin Nutr*; 66: 521S-525S.
- Sparo MD., Castro MS., Andino PJ., Lavigne MV., Ceriani C., Gutierrez GL., Fernandez MM., De Marzi MC., Malchiodi EL., Manghi MA. 2006** Partial characterization of enterocin MR99 from a corn silage isolate of *Enterococcus faecalis*. *J Appl Microbiol* 110, 123-134.

- Spencer, R. C. 1998.** Clinical impact and associated costs of *Clostridium difficile* associated disease. *J. Antimicrob. Chemother.* 41:5–12.
- Spencer, R. C. 1998.** Clinical impact and associated costs of *Clostridium difficile* associated disease. *J. Antimicrob. Chemother.* 41:5–12.
- Stenson WF, McDermott RP 1991.** Inflammatory Bowel Disease. En: Yamada T, ed. *Textbook of Gastroenterology*. Philadelphia: Lippincott Company: 1588-1645.
- Stopforth JD, Lopes M, Shultz JE, Miksch RR, Samadpour M. 2006** Microbiological status of fresh beef cuts. *J Food Prot.* Jun;69(6):1456-9.
- Suárez L, Perdomo M, Escobar H 1994.** Microbiota bacteriana y ecosistema intestinal. Fisiopatología del intestino delgado contaminado. Diarrea aguda. *Medio Ambiente en España.* GEN; 48 (2): 61-64.
- Surawicz CM, Elmer GW, Speelman P, McFarland LV, Chinn J, van Belle G. 1989** Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: a prospective study. *Gastroenterology*; 96: 981-8.
- Svanberg U, Sjogren E, Lorri W, Svennerholm Am, Kaijser B, 1992** Inhibited growth of common enteropathogenic bacteria in lactic-fermented cereal gruels. *World J. Microbiol. Biotechnology*, 8, 601-606.
- Svensson BE, Lindvall S. 1988.** Myeloperoxidase-oxidase oxidation of cysteamine. *Biochem J*;249(2):521-30.
- Szajewska H, Skorka A, Dylag M. 2007** Meta-analysis: *Saccharomyces boulardii* for treating acute diarrhoea in children. *Aliment Pharmacol Ther*; 25: 257–64
- Szajewska H, Skorka A, Ruszczynski M, Gieruszczak-Bialek D. 2007** Meta-analysis: *Lactobacillus GG* for treating acute diarrhoea in children. *Aliment Pharmacol Ther*; 25: 871–81.,
- Szentkuti L, Riedesel H, Enss ML, Gaertner K, Von Engelhardt W 1990.** Pre-epithelial mucus layer in the colon of conventional and germ-free rats. *Histochem J*; 22: 491-497.
- Tabbers MM, Benninga MA. 2007** Administration of probiotic lactobacilli to children with gastrointestinal problems: there is still little evidence. *Ned Tijdschr Geneesk*; 151: 2198-2202.
- Tagg JT, Dajani AS, Wannamaker LW 1976** Bacteriocins of grampositive bacteria. *Bacteriol Rev*;40:722–56.
- Talwalkar A and Kailasapathy K, 2004.** Comparison of selective and differential media for the accurate enumeration of strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium spp* and *Lactobacillus casei* complex from commercial yoghurts. *Int. Dairy Journal* 14(2): 143-149.

- Talwalkar A, Kailasapathy K. 2004** The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Curr Issues Intest Microbiol.* Mar;5(1):1-8. Review.
- Thomas MR, Litin SC, Osmon DR, Corr AP, Weaver AL, Lohse CM. 2001.** Lack of effect of *Lactobacillus* GG on antibiotic-associated diarrhea: a randomized, placebo-controlled trial. *Mayo Clin Proc.* Sep;76(9):883-9
- Thompson WG 2001.** Probiotics for irritable bowel syndrome: a light in the darkness?. *Eur J Gastroenterol Hepatol*; 13: 1135-1136.
- Tissier H. 1906** Traitement des infections intestinales par la méthode de transformation de la flore bactérienne de l'intestin. *C R Soc Biol*; 359-361.
- Tomioka H, Tomioka K, Sato K, Saito H. 1992** The protective activity of immunostimulants against *Listeria monocytogenes* infection in mice. *J Med Microbiol*; 36: 112-116.
- Trejo F. 2009** Interacción entre *Clostridium difficile*, *Lactobacilos* y *Bifidobacterias*. Tesis doctoral
- Tsvetkov & Brankova 1983** Viability of micrococci and lactobacilli upon freezing and freeze-drying in the presence of different cryoprotectants. *Cryobiology* **20** 318-323
- Tuomola EM, Salminen SJ. 1998** Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to caco-2 cell cultures. *Int J Food Microbiol*; 41: 45-51.).
- Ulisse S, Gionchetti P, D'Alo S, Russo FP, Pesce I, Ricci G, et al 2001.** Expression of cytokines, inducible nitric oxide synthase, and matrix metalloproteinases in pouchitis: effects of probiotic treatment. *Am J Gastroenterol*; 96: 2691-2699.
- Urao M, Fujimoto T, Lane GJ, Seo G, Miyano T. 1999** Does probiotic administration decrease serum endotoxin levels in infants?. *J. Pediatr. Surg* ; 34: 273-276.
- Valiquette, L., D. E. Low, J. Pepin, and A. Mcgeer. 2004.** *Clostridium difficile* infection in hospitals: a brewing storm. *Can. Med. Assoc. J.* 171:27-29.
- Van de Water J, Keen CL, Gershwin ME 1999.** The influence of chronic yoghurt consumption on immunity. *J Nutr*;129(7): 1492-1495.
- Vanderhoof JA, Young RJ, Murray N, Kaufman SS 1998** Treatment strategies for small bowel bacterial overgrowth in short bowel syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* Aug;27(2):155-60.
- Vaughan EE, de Vries MC, Zoetendal EG, Ben-Amor K, Akkermans ADL, de Vos WM 2002.** The intestinal LABs. *Antonie van Leeuwenhoek*; 82: 341-352.
- Venturi A, Gionchetti P, Rizzello F, Johansson R, Zucconi E, Brigidi P, et al.** Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis.

- Vergio F1954.** Anti-und Probiotika. Hipocrates; 25: 116-119.
- Vinderola C, Duarte J, Thangavel D, Perdigon G, Farnworth E & Matar C 2005** Imezcla microbianaunomodulating capacity of kefir. *Journal of Dairy Research* **72** 195–202
- Vinderola CG, Prosello W, Ghiberto TD, Reinheimer JA 2000** Viability of probiotic (Bifidobacterium, Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei) and nonprobiotic microflora in Argentinian Fresco cheese. *J Dairy Sci. Sep*;83(9):1905-11.
- Vinderola G., Matar C., Perdigón G. 2007** Milk fermented by Lactobacillus helveticus R389 and its non-bacterial fraction confer enhanced protection against Salmonella enteritidis serovar typhimurium infection in mice. *Immunobiol* **212**, 107-118.
- Walker WA. 2000** Role of nutrients and bacterial colonization in the development of intestinal host defense. *J Pediatr Gastroenterol*; **30**: S2-S7.
- Warny, M., J. Pepin, A. Fang, G. Killgore, A. Thompson, J. Brazier, E. Frost, and L. C. McDonald. 2005.** Toxin production by an emerging strain of Clostridium difficile associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet* **366**:1079–1084.
- Wheeler JG, Bogle ML, Shema SJ, Shirrell MA, Stine KC, Pittler AJ, et al. 1997** Impact of dietary yogurt on immune function. *Am J Med Sci* **313**(2): 120-123.
- Wheeler JG, Shema SJ, Bogle ML, Shirrell MA, Burks AW, Pittler A, et al. 1997** Immune and clinical impact of Lactobacillus acidophilus on asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* **79**: 229-233.
- Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL 2001.** The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol*; **1**(1): 69-75.
- Wu R, Wang L, Wang J, Li H, Menghe B, Wu J, Guo M, Zhang H. 2009** Isolation and preliminary probiotic selection of lactobacilli from koumiss in Inner Mongolia. *J Basic Microbiol.* **49**(3):318-26.
- Wu X, Vallance BA, Boyer L, Bergstrom KS, Walker J, Madsen K, et al. 2008** Saccharomyces boulardii ameliorates Citrobacter rodentium-induced colitis through actions on bacterial virulence factors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**(1):G295–306.
- Wullt M, Hagslatt MJ, Odenholt L. 2003** Lactobacillus plantarum 299v for the treatment of recurrent Clostridium difficile-associated diarrhoea: a double-blind, placebo-controlled trial. *Scand J Infect Dis*; **35**:365–7.
- Wullt M, Johansson Hagslatt ML, Odenholt I, Berggren A. 2007** Lactobacillus plantarum 299v enhances the concentrations of fecal short-chain fatty acids in patients with recurrent Clostridium difficile-associated diarrhea. *Dig Dis Sci*; **52**: 2082–86.)

- Yakabe T, Moore E, Yokota S, Sui H, Nobuta Y, Fukao M, Palmer H & Yajima N** 2009 Safety assessment of *Lactobacillus brevis* KB290 as a probiotic strain. *Food and Chemical Toxicology* **47** 2450-2453
- Yunmbam MK, Roberts JF.** 1993 In vivo evaluation of reuterin and its combinations with suramin, melarsoprol, DL-alpha-difluoromethylornithine and bleomycin in mice infected with *Trypanosoma brucei brucei*. *Comp Biochem Physiol C*;105: 521-4.
- Zabala V** 2004 Caracterización de leches fermentadas obtenidas con gránulos de kefir: composición y propiedades probióticas y tecnológicas. Master Thesis, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Zhou J, Shu Q, Rutherford K, Prasad J, Gopal P & Gill H** 2000 Acute oral toxicity and bacterial translocation studies on potentially probiotic strains of lactic acid bacteria. *Food Chemical Toxicology* **38** 153-161
- Zocco MA, dal Verme LZ, Cremonini F, Piscaglia AC, Nista EC, Candelli M, et al.** 2006. Efficacy of *Lactobacillus GG* in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*; 23: 1567-1574.

“Querer es una gran cosa, queridas hermanas, porque a la Voluntad suelen seguir la Acción y el Trabajo, y el Trabajo va casi siempre acompañado del Éxito. Estas tres cosas: Trabajo, Voluntad y Éxito, llenan la existencia humana. La Voluntad abre las puertas del Éxito brillante y feliz; el Trabajo franquea estas puertas, y al fin de la jornada, el Éxito llega a coronar los propios esfuerzos”

*Louis Pasteur 1822-1895*