

## Monitoreo de la cepa *Lactobacillus salivarius* DSPV 001P mediante tinción con isotiocianato de fluoresceína

<sup>1</sup>Blajman, JE; <sup>1</sup>Romero Scharpen, A; <sup>1</sup>Astesana, DM; <sup>1</sup>Zimmermann, JA; <sup>1</sup>Rossler, E; <sup>1</sup>Berisvil, AP; <sup>2</sup>Fusari, ML; <sup>2</sup>Rosmini, MR; <sup>1,2</sup>Zbrun MV; <sup>1,2</sup>Soto, LP; <sup>1,2</sup>Frizzo, LS.

<sup>1</sup> Laboratorio de Análisis de Alimentos, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (ICIVET-CONICET/UNL), <sup>2</sup> Departamento de Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral (UNL).

[jblajman@yahoo.com.ar](mailto:jblajman@yahoo.com.ar)

Proyecto CAI+D 2011: Utilización de la microbiota indígena, provenientes de animales domésticos, para mejorar las condiciones sanitarias y la performance en modelos productivos intensivos.

El conocimiento relacionado al destino de las bacterias probióticas dentro del ambiente complejo de la microbiota intestinal es muy escaso y el estudio de la distribución de estas bacterias *in vivo* representa un gran desafío. La localización y desplazamiento de los probióticos durante su tránsito por el tracto gastrointestinal (TGI) de los pollos, así como su interacción con el sistema inmune del huésped o con la microbiota indígena han comenzado a ser estudiados, pero aún no están bien entendidos<sup>4</sup>. Los mecanismos parecen ser complejos y varían entre diferentes preparaciones probióticas. La utilización de herramientas de monitoreo de las cepas probióticas *in vivo* podría contribuir al entendimiento del mecanismo de acción de estas bacterias relacionando la localización y la carga microbiana con la generación de mejoras en el estado sanitario y la performance de crecimiento de los animales durante la crianza intensiva.

El objetivo del ensayo fue monitorear la cepa *Lactobacillus salivarius* DSPV 001P mediante tinción con isotiocianato de fluoresceína tras su administración a pollos parrilleros.

Para el ensayo se utilizó la cepa bacteriana de origen aviar *L. salivarius* DSPV 001P con propiedades probióticas *in vitro*. El cultivo fresco de la cepa seleccionada fue centrifugado a 5000 xg durante 10 min y lavado 2 veces con buffer PBS a pH 7,2. El sedimento fue resuspendido con PBS, adicionado de isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1mg/ml, Sigma) e incubado durante 2 h a 37°C en la oscuridad<sup>4</sup>. Posteriormente, los cultivos fueron centrifugados y lavados 6 veces con buffer PBS hasta la eliminación completa del agente fluorescente. El pellet fue resuspendido en PBS a una concentración final de 10<sup>10</sup> UFC/ml. Fueron utilizados 45 pollos parrilleros recién nacidos (en su 1<sup>er</sup> día de vida). Los pollos fueron divididos en cinco grupos experimentales (cuatro grupos tratados y un grupo control) conformados por nueve animales cada uno. Cada grupo recibió 1 ml de la bacteria fluorescente *per os* en diferente concentración: 10 Log UFC, 9,5 Log UFC, 8,5 Log UFC y 7,5 Log UFC. Al grupo control se le suministró 1 ml de PBS como placebo. El cuidado de los animales se realizó teniendo en cuenta la Guía para el cuidado y uso de animales en investigación y enseñanza<sup>2</sup>. Necropsias programadas fueron realizadas a tres pollos de cada grupo experimental (15 pollos totales), sacrificados mediante dislocación cervical, a tres tiempos diferentes post administración del probiótico: 30 min, 6 h y 12 h. Se recogieron los siguientes órganos: hígado, páncreas, buche, duodeno, ciego y bolsa de Fabricio utilizando instrumental estéril en cada tejido para minimizar la posibilidad de contaminación bacteriana entre muestras. Los órganos fueron procesados mediante la técnica histológica de Saint Marie<sup>3</sup>, con algunas modificaciones. El montaje se realizó con bálsamo de Canadá. El monitoreo y la interacción de las bacterias marcadas con FITC se estudió bajo luz azul en un microscopio de fluorescencia (400 X) (Eclipse CI, Nikon). Las imágenes fueron tomadas con una cámara fotográfica digital (DCM900, ScopeTek) empleando el software de captura Minisee versión 1.1.3.0 para Windows.

Luego de 30 min del suministro de las bacterias marcadas fluorescentes se observaron “clusters” o agregados de bacterias recorriendo el lumen de buche, duodeno y ciego. Se distinguieron bacterias marcadas en la túnica mucosa y submucosa del buche de los pollos. En duodeno, agregados de bacterias fueron hallados en las vellosidades intestinales, en íntimo contacto con las células epiteliales que las recubren. Se observaron también bacterias marcadas internalizadas en la lámina propia y en la muscular de la mucosa. Una mayor cantidad de agregados bacterianos pudo observarse en los pollos que recibieron 10 y 9,5 Log UFC. Agregados más pequeños y bacterias aisladas fueron visualizados en aquellos animales que recibieron 8,5 y 7,5 Log UFC. Pequeños agregados bacterianos fueron detectados en los ciegos de los pollos que habían recibido 10 Log UFC de *L. salivarius* DSPV 001P. En tanto, solo bacterias fluorescentes dispersas se encontraron en los ciegos de los pollos que habían recibido 9,5 Log UFC de *L. salivarius* DSPV 001P y no se observaron bacterias en los ciegos de las aves que habían consumido una concentración bacteriana inferior. No se encontraron bacterias en la bolsa de Fabricio. Hubo ausencia de translocación bacteriana a hígado y páncreas en los pollos tratados. No se hallaron bacterias marcadas en los pollos controles.

Luego de 6h y 12h post-administración de las bacterias marcadas, se evidenciaron pequeños agregados bacterianos en el lumen de buche y escasas bacterias en duodeno. Se vislumbraron “clusters” de bacterias en la mucosa, submucosa y muscular del ciego de todos los pollos. Además, se observaron bacterias en la bolsa de Fabricio de los pollos que recibieron 10 y 9,5 Log UFC. Hubo ausencia de translocación bacteriana a hígado y páncreas en los pollos tratados. No se hallaron bacterias marcadas en los pollos controles.

La tinción con FITC permitió efectuar de manera sencilla y rápida el monitoreo de *L. salivarius* DSPV 001P durante el tránsito gastrointestinal de pollos parrilleros. En este trabajo pudimos corroborar la ausencia de translocación de *L. salivarius* DSPV 001P al hígado y páncreas de los pollos, siendo este parámetro comúnmente utilizado para evaluar un candidato probiótico pues resulta interesante como criterio de seguridad. La existencia de bacterias marcadas en la bolsa de Fabricio indica la capacidad de interacción de la cepa en estudio con las células del sistema inmune. La presencia de bacterias fluorescentes en íntimo contacto con las células epiteliales de las vellosidades intestinales e internalizadas señala la colonización de la cepa *L. salivarius* DSPV 001P en el TGI de los pollos en estudio.

## Bibliografía

**Burns, P.G.** (2012) Cultivos probióticos para productos lácteos. Respuesta a nuevos desafíos tecnológicos y estrategias para mejorar cepas. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.

**Federation of Animal Sciences Societies (FASS)** (1998). Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching. First Revised Edition, p. 55-66.

**Sainte-Marie, G.** (1962). A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 10, 250-256.

**Yu, Q.H.; Dong, S.M.; Zhu, W.Y.; Yang, Q.** (2007). Use of green fluorescent protein to monitor *Lactobacillus* in the gastrointestinal tract of chicken. FEMS Microbiology Letters, 275, 207-213.