

PRODUCCIÓN PORCINA: INHIBICIÓN DE ENTEROPATÓGENOS ANTIBIÓTICO MULTI-RESISTENTES POR PROBIÓTICOS NATIVOS. AGRICULTURA FAMILIAR vs. CRÍA INTENSIVA

Costanzo G^{a*}, Sánchez L^b, Ferreira C^c, Moreno K^a, Kociubinski G^a

RESUMEN

Introducción: Los antibióticos utilizados como promotores del crecimiento durante la cría de animales pueden causar la emergencia, prevalencia, y diseminación de resistencia antibióticos en bacterias que provocan enfermedades diarreicas en cerdos post-destetados. En este escenario las bacterias ácido lácticas (BALs), inhibitorias de un amplio espectro de enteropatógenos surgen como alternativa al uso de antibióticos. **Metodología y Resultados:** Se realizó un relevamiento del poder inhibitorio en medio sólido de sobrenadantes de cultivo (SC) de BALs INTA-nativas (n=49; MRS, 18-20hs/37°C), frente a 11 enteropatógenos aislados de cerdos con diarrea y septicemia (*Salmonellas* spp., n=6; *Escherichia coli* β-hemolíticas, n=4; EHEC, n=1). La inhibición de los SC fue comparada con caldo MRS (pH= 6,5) acidificado con ácido láctico racémico para obtener soluciones en el rango de pHs (3,5-4,5) y con el SC obtenido de una cepa probiótica comercial. Los SC de las cepas con mayor poder inhibitorio, y con otras propiedades probióticas (n=8) fue contrastada contra antibióticos de uso clínico (n=8). También se determinó la viabilidad de *S. typhimurium* y *E. coli* β-hemolítica en estos SC. Veintiún de 49 (~50%) cepas BALs fueron seleccionadas por su elevado poder inhibitorio frente a 11 enteropatógenos. Interesantemente, la inhibición de dichas cepas frente a *S. typhimurium* y *E. coli* β-hemolítica fue similar ó superior a la de los antibióticos frecuentemente utilizados en el tratamiento de infecciones gastrointestinales en cerdos. Asimismo, a los 30 min se observó una inhibición del ~100% *S. typhimurium* y 67% *E. coli* β-hemolítica, y del 100% a las 4 y 24 hs (P<0,01). **Conclusión:** Mediante el criterio secuencial de selección de cepas BALs nativas empleado, han sido detectadas cepas con elevado poder inhibitorio, que poseen actividad antibacteriana similar (e incluso superior) a los antibióticos normalmente utilizados en la práctica pecuaria. Asimismo es relevante que estas cepas mostraron un rápido y elevado efecto bactericida, sin generar resistencia al menos hasta las 24 horas de aplicación.

ABSTRAC

Background: Growth promoters in animal husbandry can cause the emergence, prevalence and spread of antibiotic resistance in bacteria that cause diarrheal diseases in post-weaned pigs. In this scenery, the lactic acid bacteria (LAB), inhibitory of a wide range of enteropathogens, arise as alternative to the use antibiotics. **Methods and Findings:** We conducted a growth inhibition study in solid medium to measure the

^a Instituto de Tecnología de Alimentos, INTA, Buenos Aires - ARGENTINA; ^b Dirección Producciones Biofarmacéuticas, CENSA, La Habana - CUBA; ^c Universidad Federal de Viçosa, Viçosa - BRASIL.
costanzo.gabriel@gmail.com

inhibitory power (score) of culture supernatants (CS) of INTA-native LAB (n = 49; MRS 18-20hs/37°C), against to 11 enteropathogens isolated from pigs with diarrhea and septicemia (*Salmonella* spp., n = 6; β -hemolytic *Escherichia coli*, n = 4; EHEC (Stx2), n = 1). Inhibition of the CS was compared with MRS broth (pH = 6.5) racemic lactic acid acidified to obtain solutions at different pHs (3.5 to 4.5) and the CS obtained from a commercial probiotic strain. The strains with greatest inhibitory scores, and other probiotic properties (n = 8) were contrasted with clinically used antibiotics (n = 8). We also determined the viability of *S. typhimurium* and β -hemolytic *E. coli* in these CS. Twenty-one of 49 (~50%) LAB strains were selected for their high inhibitory power against 11 enteropathogens. Interestingly, the inhibition of such strains against *S. typhimurium* and β -hemolytic *E. coli* was similar or higher than that of antibiotics commonly used in the treatment of gastrointestinal infections in pigs. Likewise, at 30 min showed ~100% of inhibition against *S. typhimurium*, 67% against β -hemolytic *E. coli*, and 100% at 4 and 24h for both enteropathogens (P<0.01). **Conclusion:** By sequential selection criterion the studied native LAB strains showed antibacterial activity similar (or even higher) to antibiotics commonly used in livestock. It is also important that these strains showed a rapid and high bactericidal effect without generating resistance, at least, until 24 hours of incubation.

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos utilizados como promotores del crecimiento durante la cría de animales pueden causar la emergencia, prevalencia, y diseminación de resistencia antibióticos en bacterias. Por otro lado un amplio rango de enteropatógenos causan pérdidas costosas debido a que provocan enfermedades diarreicas en cerdos post-destetados y dan origen a enfermedades transmitidas por alimentos en humanos. En este escenario las BALs, capaces de inhibir un amplio espectro de microorganismos patógenos responsables de enfermedades de transmisión alimentaria de origen zoonótico, surgen como alternativa a los antibióticos de uso veterinario. **Objetivo:** Desarrollar un formulado probiótico destinado a lechones durante la transición pre-post destete (período de mayor incidencia de diarreas infecciosas) como posible alternativa al empleo de antibióticos. En consecuencia, se realizó el relevamiento del poder inhibitorio de cepas BALs-*nativas* pertenecientes al Banco de Cepas INTA (aisladas de lechones post-destetados sanos menores a dos meses de vida, sin evidencia de trastornos gastrointestinales, y en diferentes sistemas de cría), frente a enterobacterias de alta incidencia en nuestro medio durante esta etapa productiva procedentes de animales con trastornos diarreicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas BALs-*nativas* (n=49), pertenecientes al Banco de cepas INTA, de las cuales se obtuvo el SC (MRS, 18-20hs/37°C, 14000g x 10min) pH finales: 3,74-4,07; 25 °C. (744 pH Meter Metrohm, Switzerland) fueron aisladas de cerdos post-destetados en buen estado de salud de dos sistemas de cría: Agricultura Familiar (AF) y Cría Intensiva (CI). Los enteropatógenos fueron aislados del intestino de cachorros con salmonelosis

septicémica y del intestino de lechones post-destetados con diarrea y enfermedad de los edemas (*Salmonellas* spp., n=6; *E. coli* β-hemolíticas, n=4; *E. coli* enterohemorrágica EHEC (Stx2) (n=1), cedidos por el Dr. G. Zielinski (EEA- INTA Marcos Juárez) y la Dra. G. Giacoboni (Fac. de Veterinaria, UNLP). Para realizar el relevamiento del poder inhibitorio se utilizó el método de Kociubinski G. et al (1996, con modificaciones), otorgando parámetro semicuantitativo. La inhibición de los SC fue comparada frente a controles de ácido láctico racémico (ALR; caldo MRS acidificado con ALR hasta lograr pHs en el rango de los SC) y a una cepa aislada a partir de un producto probiótico comercial. El poder inhibitorio los SC de las cepas con mayor score, y con otras propiedades probióticas (no mostrado) (n=8) fue contrastado contra antibióticos de uso veterinario: Ampicilina, Estreptomina, Penicilina, Tetraciclina, Nitrofurantoina, Ácido nalidixico, Trimetoprima-sulfametoxazol, y Cloranfenicol (BD BBL™ Sensi-Disc™) en un ensayo de antibiograma con algunas modificaciones. Luego se determinó la viabilidad de *S. typhimurium* (10^7 UFC/ml) y *E. coli* β-hemolítica P2 (10^6 UFC/ml) incubadas en estos SC a los 30 min, 4 hs y 24 hs. Realizando recuentos de UFC/placa en agar TSA a cada tiempo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De la evaluación de diferentes métodos en medio sólido, se determinó que el mejor método para la observación de halos de inhibición reproducibles es el método de spot (Figura 1a y 1b). Con este método se seleccionaron 21 de 49 cepas BALs (~50%) por su elevado poder inhibitorio frente a 11 enteropatógenos (Tabla 1a y 1b). En las tablas 1a y 1b se observa que los SC de cepas aisladas de CI muestran mayores scores que las cepas aisladas de AF. Es importante destacar que las cepas fueron aisladas de cerdos de CI en buen estado de salud. Estos cerdos estarían más expuestos a enteropatógenos que los cerdos criados en AF debido a las condiciones sanitarias de cada sistema de cría. Con lo cual habría una selección natural de cepas de BALs con capacidad de inhibir el crecimiento de enteropatógenos. En la figura 2 se observa que *Salmonella* es más sensible a la acción inhibitoria de los SC, con scores máximos de 4, mientras que las en *E. coli* solo se obtiene scores máximos de 2. Para el mismo score (3 y 4) los SC inhiben a *Salmonella* y *E. coli* a pHs superiores (3,8-4,6) que los controles acidificados con ALR (pH: 3,5-4,2), destacándose los que provienen de AF (pH: 4-4,2). Esto podría indicar la presencia de otras sustancias inhibitorias como otros ácidos orgánicos de cadena corta, bacteriocinas y H₂O₂ (Kociubinski G *et al.*, 2006). La correlación lineal de cada grupo de SC (AF y CI) y el control a diferentes pHs (ALR) indica la dependencia del poder inhibitorio en función del pH. Como se ve en la figura 2, los mismos SC, de ambos sistemas de cría (AF y CI), tienen correlaciones lineales con diferentes pendientes para cada cepa patógena, lo cual refuerza lo mencionado anteriormente en cuanto a que otras moléculas inhibitorias, que no influyen en el pH, estarían aportando al efecto inhibitorio de estos SC. Es interesante destacar que los SC no inhiben a todas las cepas patógenas por igual. Por ejemplo la cepa p174, una de las más inhibitorias, inhibe con un score de 4 a *S. typhimurium* y *S. oranienburg*, con un score de 3 y 2 a *S. cholerasuis* y *S. derby* respectivamente, y con un score de 1 a *S. Heidelberg* y *S. senftenberg* (Tabla 1a). En el caso de *E. coli*, la cepa 174, inhibe a las 4 cepas patógenas por igual con un score máximo de 2. Estos resultados indican que no

existe una cepa universal probiótica que inhiba el crecimiento de distintas cepas enteropatógenas, como promueven muchos productos comerciales. De hecho en la Tabla 1a y 1b se observa que la cepa comercial tiene la misma variabilidad en la inhibición de diferentes cepas de *Salmonella* y *E. coli*.

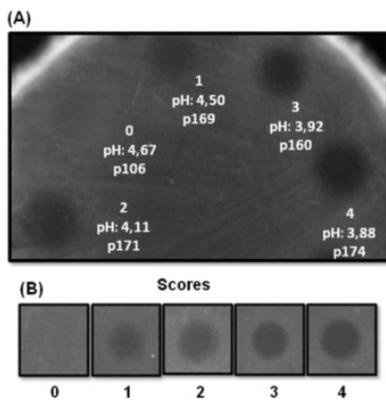


Figura 1. (A) Ensayo de inhibición en medio sólido de *S. oranienburg* (10^5 UFC/placa) aislada de cerdos con salmonelosis septicémica. Los halos de inhibición fueron producidos por SC de BALs nativas aisladas de cerdos en post-destetados en buen estado de salud. Se indican el score, el pH y las cepas BALs. **(B)** Criterio de asignación de score (poder inhibitorio) según grado de inhibición. Cero: no inhibición, 1: inhibición parcial ≤ 10 mm de diámetro, 2: inhibición parcial ≥ 10 mm de diámetro, 3: inhibición total ≤ 10 mm de diámetro, 4: inhibición total ≥ 10 mm de diámetro.

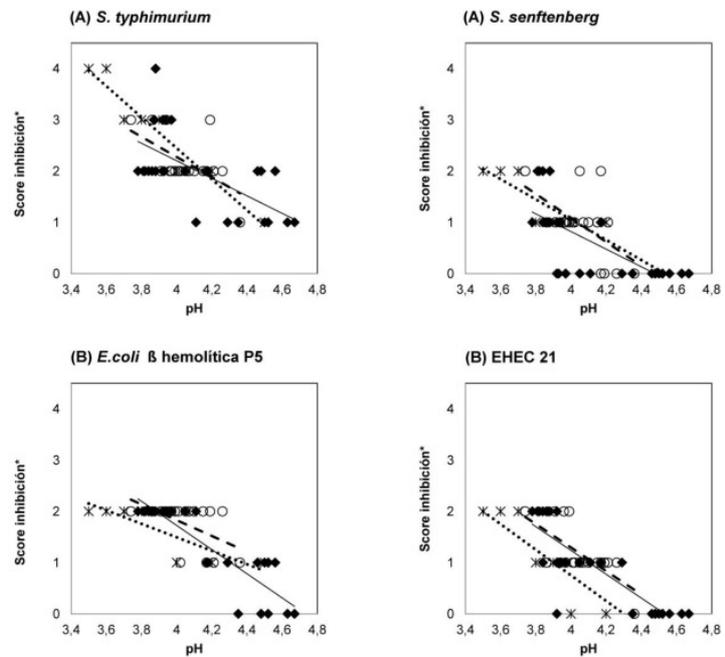


Figura 2. Relación entre score de inhibición* en medio sólido (figura 1) y el pH para los 50 SNC obtenidos de cepas aisladas de cerdos de los sistemas de cría intensiva (◆) y agricultura familiar (○) aplicados contra *Salmonella* (A) y *E. coli* β hemolítica (B). La inhibición de los SNC se comparó con la producida por caldo MRS (pH= 6,5) acidificado con ALR para obtener soluciones a diferentes pHs (3,5-4,5) (*). Correlación lineal: Cría Intensiva (—), Agricultura Familiar (---), ALR (.....).

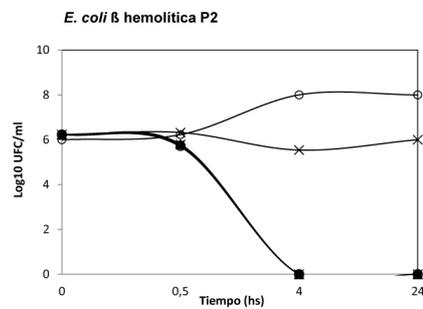
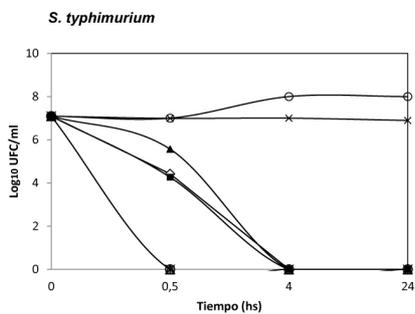


Figura 4. Curvas de muerte en el tiempo para los enteropatógenos *S. typhimurium* y *E. coli* β hemolítica incubados en los SC de las cepas: INTA-p174 (◇), INTA-p64 (□), INTA-p105 (△), INTA-p106 (×), INTA-p226 (●), INTA-p227 (✱), INTA-p230 (■), INTA-p235 (▲). Como control las bacterias fueron incubadas en caldo TS (○). Los datos están expresados como log10 UFC/ml de recuentos en agar TS a cada tiempo.

Tabla 1a. Selección de cepas en base a su poder inhibitorio frente a *E. coli* enterohemorrágica y *E. coli* β-hemolíticas (15 cepas de las 21 seleccionadas).

Cepa	Origen	pH	EHEC	E. coli β hem.			Score total
				E. coli β hem. P4	P2 (E. P., TET, T y CP)	E. coli β hem. P5	
INTA	CI*	3,88	2	2	2	2	8
p174	CI	3,86	2	2	2	2	8
p68b	CI	3,87	2	2	2	2	8
p162	CI	3,92	2	2	2	2	8
p160	CI	3,78	2	2	2	2	8
p64	CI	3,81	2	2	2	2	8
p46	CI	3,82	2	2	2	2	8
p47	CI	3,91	2	2	2	2	8
p226	AF*	3,99	2	2	2	2	8
p227	AF	3,84	2	2	1	2	7
p76	CI	3,92	1	2	2	2	7
p172	CI	3,74	2	2	1	2	7
p235	AF	3,86	1	2	2	2	7
Com.	Com.	3,92	1	2	2	2	7
p163	CI	3,94	1	2	2	2	7

* Antibiótico resistencia determinada en antibiograma: Estreptomina, Penicilina, Tetraciclina, Trimetoprima-sulfametoxazol, Cloranfenicol. Sistema de cría: (+) Cría Intensiva, (#) Agricultura Familiar. Com: Cepa comercial

Tabla 1b. Selección de cepas en base a su poder inhibitorio frente a *Salmonella* (15 cepas de las 21 seleccionadas).

Cepa	Origen	pH	S. heil.				S. typh.	S. derby	S. senf.	Score total
			S. ch.	(Δ, C, TET, T y 2)*	S. oran.	(C, TET, H, 2)*				
INTA	CI*	3,84	4	3	2	2	3	2	16	
p174	CI	3,88	3	1	4	4	2	1	15	
p68b	CI	3,86	4	2	2	2	2	1	13	
p162	CI	3,87	2	2	3	3	1	1	12	
p160	CI	3,92	1	2	3	3	2	1	12	
p172	CI	3,92	2	2	3	3	2	1	13	
p235	AF*	3,74	2	2	2	3	2	2	13	
Com.	Com.	3,86	3	2	3	2	2	1	13	
p46	CI	3,81	4	1	1	2	2	2	12	
p47	CI	3,82	4	1	2	2	1	2	12	
p64	CI	3,78	4	2	1	2	2	1	12	
p163	CI	3,92	2	1	2	3	3	1	12	
p165	CI	3,94	2	1	3	3	2	1	12	
p105	CI	3,88	2	3	1	2	2	2	12	
p42	AF	4,05	2	2	2	2	2	2	12	

* Antibiótico resistencia determinada en antibiograma: Estreptomina, Penicilina, Tetraciclina, Trimetoprima-sulfametoxazol, Cloranfenicol. Sistema de cría: (+) Cría Intensiva, (#) Agricultura Familiar. Com: Cepa comercial.

Estos resultados refuerzan el hecho de desarrollar formulados multi-cepa, con cepas

aisladas de nuestra región, que tengan un espectro acción más amplio contra enteropatógenos altamente agresivos y antibiótico multi-resistentes. Interesantemente, la inhibición de dichas cepas frente a *S. typhimurium* y *E. coli* β -hemolítica P2 fue similar o superior a la de los antibióticos frecuentemente utilizados en el tratamiento de infecciones gastrointestinales en cerdos. En el caso de *S. typhimurium*, las cepas seleccionadas inhiben de manera similar a Penicilina y Nitrofurantoina (score 4), en menor medida que Ampicilina, Ácido Nalidíxico, Trimetroprima-Sulfametoxazol (score > 4) y en mayor medida que Estreptomina, y Cloranfenicol y Tetraciclina (score < 1). En el caso de *E. coli* β hemolítica P2 los SC de las cepas seleccionadas inhibieron en menor medida (score 2) que los antibióticos: Ampicilina, Nitrofurantoina, Ácido Nalidíxico (score > 4) y en mayor medida (score 2) que los antibióticos Estreptomina, Penicilina, Trimetroprima-Sulfametoxazol y Cloranfenicol (score < 1). Estos resultados indicarían que los antibióticos utilizados en cerdos podrían ser reemplazados por esquemas adecuados de administración de formulados probióticos con demostrada actividad inhibitoria. Para confirmar esta hipótesis es necesario realizar ensayos in vivo.

En la figura 4 se observa que los SC estudiados tienen un efecto bactericida (inhibición de ~100%) tanto para *S. typhimurium* (30 min, 4 y 24 hs) como para *E. coli* β -hemolítica (4 y 24 hs), sin embargo, al igual que en los ensayos de inhibición en medio sólido, *E. coli* mostro ser más resistente a la acción de los SC (67 % de inhibición a los 30 min de incubación). Entre los 49 SC estudiados en medio sólido se seleccionó el menos inhibitorio (INTA-p106) como control. A pesar de que este era el SC menos inhibitorio mostró actividad bacteriostática hasta las 24 hs. En este sentido, no hubo reactivación de ningún patógeno, indicando que las cepas patógenas estudiadas no adquirieron resistencia a la acción de los SC, al menos, hasta las 24 hs. Además este ensayo valida los resultados obtenidos mediante el ensayo en medio sólido como método de relevamiento para la detección de cepas de BALs con elevado poder inhibitorio.

CONCLUSIONES

Mediante el criterio secuencial de selección de cepas, fueron detectadas cepas de origen porcino (lechones recientemente destetados) con elevado poder inhibitorio frente a enteropatógenos Gram negativos de alta incidencia en nuestro medio, observándose que esta propiedad es tanto cepa, especie y género específica. Asimismo, fueron detectadas cepas con poder inhibitorio similar e incluso superior que el de antibióticos normalmente utilizados en la práctica pecuaria, presentando las cepas más inhibitorias un efecto bactericida sin sobrevida del patógeno al menos hasta las 24 horas.

IMPLICACIONES

Las cepas BALs INTA-*nativas* seleccionadas podrían ser incluidas en formulados para su aplicación en animales de cría (ej. cerdos en transición pre/post-destete), con la finalidad de actuar positivamente sobre la Inocuidad Alimentaria, y la Sanidad Animal y Ambiental-Rural.

REFERENCIAS

Costanzo *et al.* (2011) I Congreso Int. de Zoonosis y Enfermedades. Emergentes. Argentina

Kociubinski G *et al.* (1996) Screening of highly inhibitory lactic acid bacteria. J. Food Prot. 59:719-715.

Kociubinski G. and Salminen S. (2006) Probiotics: basis, state of the art and future perspectives. E.U. Functional Food Network (8 - 10 March_Turku, Finland).