

Utilización de cepas de *Bacteroides* spp. como probiótico en conejos



Ana M^a Pérez de Rozas Ruiz de Gauna
Tesis Doctoral
Octubre 2014



Universitat Autònoma de Barcelona

Utilización de cepas de *Bacteroides* spp. como probiótico en conejos

Tesis doctoral presentada por **Ana M^a Pérez de Rozas Ruiz de Gauna** para optar al grado de Doctora dentro del programa de doctorado en Medicina i Sanitat Animals del Departament de Sanitat i d'Anatomia de la Facultat de Veterinaria de la Universitat Autònoma de Barcelona, bajo la dirección del Dr. **Ignacio Badiola Sáiz** y la tutoria de la Dra. **Gemma Castellà Gómez**.

Bellaterra, septiembre 2014



El Dr. **Ignacio Badiola Sáiz** , investigador del Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA) y la Dra. **Gemma Castellà Gómez** profesora titular del Departament de Sanitat i Anatomia del Animals de la Facultat de Veterinaria de la Universitat Autònoma de Barcelona,

Certifican:

Que la memoria titulada **Utilización de cepas de *Bacteroides* spp. como probiótico en conejos**, presentada por Ana M^a Pérez de Rozas Ruiz de Gauna para la obtención del grado de Doctora en Sanitat Animal, se ha realizado bajo su supervisión, y considerándola acabada autoriza su presentación para que sea evaluada por la comisión correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Bellaterra (Barcelona), el de septiembre de 2014.

Dr. Ignacio Badiola

Director

Dra. Gemma Castellà

Tutora

Ana M^a Pérez de Rozas

Tesinanda

Para Paco

AGRADECIMIENTOS

Parecía que este día no iba a llegar, y tengo que decir que ha costado, sobre todo el final ¡¡¡ pero ya está!!!

Creo que en todas las tesis el director es pieza clave. Gracias Ignacio porque si tú no te hubieras empeñado yo no habría hecho la tesis; hubiera tirado la toalla en cualquier momento. Sé que ha supuesto mucho trabajo así que MUCHAS GRACIAS por toda tu ayuda. Gracias también a Gemma por haber sido mi tutora.

Evidentemente otra pieza clave “muy” importante han sido “mis compis”: Judith y Núria, que me ayudaban con el trabajo y que después me mandaban abajo a escribir.

Y por supuesto GRACIAS a todo Bacter: Tere, Galo, Vicky, Marta, Lourdes, (por cierto, habrá que hacer una Bacter-party especial, eh!) y la verdad que gracias a toda la gente del CReSA que siempre me ha ayudado y animado. También a Manoli que siempre ha tenido el material a punto.

También tengo que agradecer y mucho al Dr. Joan Rosell por su apoyo incondicional, y al Sr. Miquel Queralt que nos permitió utilizar su granja para la prueba experimental.

De todas formas hay mucha más gente que ha intervenido de una forma u otra en este trabajo: desde algunos profesores de hace muuuuuuchos años pero que de alguna manera los recuerdas, los buenos amigos, que aunque a veces estamos tiempo sin vernos siempre andan por ahí: Ute, Dago, Agustí, Lourdes, Montse, Cristina, Susana, Delia, Teresa. Gente también de mis 20 años en el laboratorio de la Zona Franca: Encarna, Montse, Rosa, Joan, M^a Carmen, Maria, Beltrán,....(lo siento, seguro que me he dejado a alguien).

Pero lo más importante, mi familia. Gracias a mis padres porque por ellos soy lo que soy y estoy aquí. Gracias a mi marido, Fons, que es lo mejor que me ha podido pasar, y a mis niñas Ainhoa e Itxi, aunque de niñas ya tienen bien poco. Todos me han aguantado bastante sobre todo en los últimos meses y me han animado todo lo que han podido.

Además, estos casi cinco años de tesis han sido también importantes y complicados por otras razones: un pequeño cáncer (que lo trastoca todo), la boda de una de mis hijas y la marcha de casa de la otra. La consiguiente llegada de las dos parejas a la familia David y Lluís, y SOBRE TODO la llegada de mis dos nietos, Andreu y Laia.

En estos momentos ese par de enanos son el motor que me hace funcionar. Ejercicio de abuela todo lo que puedo (los que me conocéis bien sabéis que es verdad, jajaja).

Espero que a los que leáis esta tesis os guste. Creo que bastante fácil de leer.

La dedicatoria es para mi abuelo Paco. Con él aprendí a leer, a sumar, a estudiar y a ser curiosa. Era un maestro de los de antes, y yo, entonces nieta única, era la más y mejor, y me lo hacía sentir cada día.

ÍNDICE

RESUMEN.....	i
SUMMARY	ii
INTRODUCCIÓN.....	3
1. GENERALIDADES.....	3
2. EL CONEJO	6
2.1. EL SISTEMA DIGESTIVO DEL CONEJO.....	8
2.1.1. ANATOMÍA DEL SISTEMA DIGESTIVO	8
2.1.2. TRÁNSITO INTESTINAL Y CECOTROFIA.....	12
2.1.3. MICROBIOTA INTESTINAL.....	14
2.1.4. EL SISTEMA INMUNE ASOCIADO A LA MICROBIOTA INTESTINAL.....	20
2.1.5. ESTRUCTURA Y MADURACIÓN DE LAS INMUNOGLOBULINAS	28
2.2. ENFERMEDADES DE LOS CONEJOS	31
2.2.1. ENTERITIS VÍRICAS	31
2.2.2. ENFERMEDADES BACTERIANAS	31
2.2.2.1. <i>Colibacilosis</i>	36
2.2.2.1.1. Etiología	36
2.2.2.1.2. Síntomas y lesiones	36
2.2.2.1.3. Prevención.....	38
2.2.2.1.4. Tratamiento.....	39
2.2.2.2. <i>Enterotoxemia</i>	39
2.2.2.2.1. Etiología	39
2.2.2.2.2. Síntomas y lesiones	40
2.2.2.2.3. Prevención.....	41
2.2.2.2.4. Tratamiento.....	41
2.2.2.3. <i>Enfermedad de Tyzzer</i>	42
2.2.2.3.1. Etiología	42
2.2.2.3.2. Síntomas y lesiones	42
2.2.2.3.3. Prevención.....	43
2.2.2.3.4. Tratamiento.....	43
2.2.2.4. <i>Salmonelosis</i>	43
2.2.2.4.1. Etiología	43
2.2.2.4.2. Síntomas y lesiones	43
2.2.2.4.3. Prevención.....	44
2.2.2.4.4. Tratamiento.....	44

2.2.2.5.	Enteropatía epizoótica del conejo- Enteropatía mucoide.	44
2.2.2.5.1.	Etiología	44
2.2.2.5.2.	Síntomas y lesiones	47
2.2.2.5.3.	Prevención	48
2.2.2.5.4.	Tratamiento	48
2.2.3.	ENFERMEDADES PARASITARIAS	49
3.	ANTIBIÓTICOS, PREBIÓTICOS Y PROBIÓTICOS	54
4.	BACTEROIDES	67
	OBJETIVOS	73
	MATERIALES Y MÉTODOS	77
1.	MÉTODOS PARA LA DIFERENCIACIÓN DE CEPAS DE <i>Bacteroides</i> spp. <i>in vitro</i>	79
1.1.	Crecimiento de los <i>Bacteroides</i>	80
1.2.	Análisis de la producción de sustancias inhibitorias del crecimiento bacteriano	80
1.3.	Estudio de proteínas de superficie	82
1.3.1.	Presencia del gen que codifica para la <i>PSA</i>	82
1.3.2.	Estudio del grado de expresión de la síntesis de la <i>PSA</i>	83
1.4.	Estudio de los perfiles antibióticos	86
1.5.	Estudio de sensibilidad a coccidiostáticos	87
1.6.	Producción de mucinasa	88
1.6.1.	Presencia del gen de la mucinasa	88
1.6.2.	Estudio del grado de expresión de la síntesis mucinasa	89
1.7.	Detección de genes de enterotoxinas	90
1.8.	Detección de genes resistencia a antimicrobianos	92
1.9.	Estudio de la presencia de secuencias de inserción	93
2.	EXPERIMENTOS EN GRANJA. Pruebas <i>in vivo</i>	94
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	104
1.	CEPAS DE <i>BACTEROIDES</i> spp.	106
2.	PRODUCCIÓN DE SUSTANCIAS INHIBIDORAS DEL CRECIMIENTO BACTERIANO	108
3.	ESTUDIO DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE	110
3.1.	Estudio de la presencia o ausencia del gen que codifica para la síntesis de la <i>PSA</i>	110
3.2.	Estudio del grado de expresión del gen <i>PSA</i>	113
4.	ESTUDIO DE LOS PERFILES DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS	115
4.1.	Primera serie de antibióticos	115

4.2.	Segunda serie de antibióticos	117
5.	ESTUDIO DE SENSIBILIDAD A COCCIDIOSTÁTICOS	118
6.	PRODUCCIÓN DE MUCINASA.....	119
6.1.	Estudio de la presencia o ausencia del gen de mucinasa	119
6.2.	Estudio del grado de expresión del gen de la mucinasa.....	120
7.	DETECCIÓN DE GENES PRODUCTORES DE ENTEROTOXINA	121
8.	DETECCIÓN DE GENES RESISTENCIA.....	122
9.	ESTUDIO DE SECUENCIAS DE INSERCIÓN	125
10.	ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	126
10.1.	Análisis de los perfiles de microbiota intestinal por RFLP	126
10.2.	Recuento de <i>Bacteroides</i> spp. en contenidos intestinales	129
10.3.	Efecto sobre marcadores inmunológicos de la mucosa intestinal	132
10.4.	Efecto sobre la diversidad genética de las inmunoglobulinas.....	135
	CONCLUSIONES.....	144
	BIBLIOGRAFIA.....	148

RESUMEN

La utilización de antimicrobianos, de forma metafiláctica, para mantener la salud de los animales en las granjas de producción, puede ser problemático en un futuro próximo, debido a las altas tasas de resistencias que se están observando. Esta situación obliga a replantearse medidas alternativas, las más habituales basadas en el uso de prebióticos, probióticos o la combinación de ambos (simbióticos).

El objetivo principal de este trabajo ha sido el de seleccionar cepas de diferentes especies del género *Bacteroides* para ser utilizadas en conejos como probiótico.

El género *Bacteroides* constituye uno de los principales componentes de la microbiota intestinal de los mamíferos (hasta 10^{11} UFC/g heces, en humanos). Degradan moléculas complejas, especialmente carbohidratos, y juegan un papel importante en el control de la colonización del tracto digestivo por parte de patógenos; también, en algún caso, pueden actuar como patógenos oportunistas. Están implicados además en la maduración del sistema inmunitario asociado a la mucosa intestinal.

Los *Bacteroides* spp. podrían tener actividad probiótica por dos mecanismos diferentes: bien produciendo sustancias inhibitoras del crecimiento de otros componentes de la microbiota intestinal (bacteriocinas, metabolitos secundarios...), bien estimulando al sistema inmune, incrementando las defensas de forma inespecífica (inmuno-moduladores).

Basándonos en la colección de *Bacteroides* spp. del CReSA, en este trabajo se han realizado estudios *in vitro* para seleccionar cepas, con ausencia de características negativas y presencia de características positivas, que pudieran utilizarse en estudios *in vivo*, en gazapos durante la fase de lactación, y poder analizar su rol como posible probiótico.

La presencia de resistencias a determinados antibióticos, especialmente de marcadores transferibles, ha sido la característica más restrictiva a la hora de seleccionar las cepas a analizar *in vivo*.

Después de seleccionar cuatro cepas, se procedió al estudio *in vivo*, en una granja comercial, examinando el efecto sobre la microbiota intestinal y diferentes parámetros inmunitarios. De los resultados obtenidos podemos inferir que algunas de las cepas probadas pueden ser candidatos para el desarrollo de un probiótico para conejo.

SUMMARY

The metaphylactic use of antimicrobials to maintain the health of animals in food production farms can be problematic in the near future, due to the high rate of resistances observed. This situation forces to looking for alternative measures, the most common based on the use of prebiotics, probiotics or a combination of both (symbiotic).

The main objective of this work was to select strains of different species of the *Bacteroides* genus that could be used as probiotic in rabbits.

Bacteroides genus is one of the main components of the mammalian intestinal microbiota (10^{11} CFU/g feces, in humans). These bacteria degrade complex molecules, especially carbohydrates, and play an important role in the control of the colonization of the digestive tract by pathogens; but, in some cases, they can act as opportunistic pathogens. Furthermore, they are involved in the maturation of the immune system associated with intestinal mucosa.

The *Bacteroides* spp. could have probiotic activity in two different ways: producing inhibitory substances against other components of intestinal microbiota (bacteriocins, secondary metabolites...) or stimulating the immune system, increasing the nonspecific defenses of host (immune-modulators).

Using the collection of *Bacteroides* spp. of CReSA, in this work different *in vitro* studies were conducted to select strains, looking for the absence of negative characteristics and the presence of positive characteristics, to be used for the *in vivo* studies on rabbits during the lactation period and to analyze their role as probiotic.

The presence of resistances against antimicrobials, especially when transferable markers were present, was the most restrictive characteristic for the selection of the strains that were analyzed *in vivo*.

After the selection of four strains, the *in vivo* study on a commercial farm was conducted, examining the effect on the intestinal microbiota and on different immune parameters. By the analysis of the obtained results can be inferred that some of the tested strains may be candidates for the development of probiotics for rabbit.

INTRODUCCIÓN

1. GENERALIDADES.

Realmente no somos conscientes que, en condiciones fisiológicas, los diferentes seres vivos somos, la asociación de nuestra propia fisiología con la fisiología de un enorme número de microorganismos en íntima unión y cooperación. Esta simbiosis adquiere su máximo exponente en el sistema digestivo.

Es bien sabido que una buena dieta influye en la salud del individuo. El tracto intestinal de los animales contiene una gran comunidad microbiológica, predominantemente bacteriana a la que se denomina microbiota intestinal. El 75% de la microbiota no es cultivable, aunque por técnicas moleculares puede inferirse su composición (Shanahan, 2002).

Desde el nacimiento hasta la muerte del hospedador es colonizado por un vasto, complejo y dinámico consorcio de microorganismos (Tuohy *et al.*, 2003). El Nobel Joshua Lederberg ha sugerido el término “microbioma” para describir el genoma colectivo de la microbiota endógena. La relación entre la microbiota y el hospedador puede derivar de comensalismo a patogenicidad, dependiendo de las cepas de microorganismos y de las condiciones fisiológicas del animal, y también puede producirse disminución de la tolerancia del hospedador a ciertos microorganismos de su microbiota (Hooper and Gordon, 2001), intolerancia que puede provocar inflamación intestinal crónica seguida de importantes alteraciones metabólicas (Pakandl, 2009)

La composición de la microbiota de cada individuo es tan particular que podría ser utilizada como huella dactilar. Cuando sufre alteraciones puede regenerarse ella misma volviendo a su composición original. Análisis cuantitativos de bacterias fecales muestran importantes diferencias entre individuos (Guarner and Malagelada, 2003).

Cada vez hay más estudios en los que se ve que el efecto de la microbiota no sólo afecta al intestino sino que influye en el sistema inmune del hospedador, y que también está implicada en desórdenes relacionados con la inmunidad: diabetes, inflamación por envejecimiento, obesidad (Guarner and Malagelada, 2003; Jeffery and O'Toole, 2013; Tuohy *et al.*, 2003; Wegmann *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013). Es más, cuando hay un cambio de dieta del animal a largo plazo, la microbiota intestinal también sufre cambios, tanto cuantitativos como cualitativos (Tuohy *et al.*, 2003). Hay estudios en los que se observa que tras una dieta activa metabólicamente (*Bifidobacterium breve* y ácido linoleico como sustrato), se produce un aumento en la

composición de ácidos grasos en el hospedador, con elevadas concentraciones en el hígado (Wall *et al.*, 2009).

Es por esto que es muy importante conocer la fisiología del sistema para poder utilizarla para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas (Hooper and Gordon, 2001).

Las funciones más importantes de la microbiota son de cuatro tipos (Guarner and Malagelada, 2003; Isolauri *et al.*, 2004):

- metabólico**: fermentación de residuos no digeribles y mucus endógeno, ahorro de energía produciendo ácidos grasos de cadena corta (se obtiene así energía adicional), producción de vitamina K, absorción de iones.

- trófico**: control de la proliferación y diferenciación de células de la mucosa intestinal.

- protector**: protección contra patógenos (efecto barrera y de inhibición competitiva).

- maduración del sistema inmune.**

El sistema inmune debe reconocer lo que es del propio individuo y lo que no, y debe mantener su integridad respecto a las interferencias que puedan ocasionar organismos patógenos. La mucosa intestinal es la barrera que hay entre el sistema inmune y el ambiente exterior. La relación que hay entre el hospedador y las bacterias de la superficie de la mucosa parece intervenir en el desarrollo de un sistema inmune competente.

Problemas de este reconocimiento puede provocar problemas en el hospedador cuando hay un sobrecrecimiento de alguna de las bacterias. Hay casos de inflamación crónica del sistema digestivo que obedecen a problemas en el reconocimiento de la microbiota simbiótica y al mantenimiento de disfunciones digestivas crónicas (Hedin *et al.*, 2007; Isolauri *et al.*, 2004; O'Hara and Shanahan, 2007; Quigley, 2010; Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004; Shanahan, 2002).

De todas formas, a pesar de que en algunas ocasiones puede dar problemas, la microbiota intestinal tiene un impacto fundamental en la homeostasis del individuo.

La modulación del sistema inmune por parte de la microbiota intestinal, nos da la posibilidad de mejorar la salud del individuo cambiando la composición de la microbiota a través de la alimentación. Parámetros que intervienen son por ejemplo la cantidad de fibra ingerida, la duración del tránsito intestinal y, sobre todo, los macronutrientes de los cuales dependerán directamente los microorganismos que puedan crecer en mayor o menor proporción (Gidenne *et al.*, 2012). Es por esto que la variación de la microbiota debida a la dieta no sólo afecta a las poblaciones bacterianas existentes sino también a la energía final obtenida por sus componentes. La microbiota intestinal afecta al número de deposiciones y al metabolismo de la grasa corporal, lo mismo que a la salud general y al bienestar.

Un gran número de estas bacterias son comunes a la mayoría de individuos aunque la composición final de la microbiota depende de la edad, salud, dieta, y también de la localización geográfica del animal (Guarner and Malagelada, 2003; Jeffery and O'Toole, 2013; Mitsuyama and Sata, 2008; Shenderov, 2011).

En la Tabla 1 podemos ver la composición mayoritaria de la microbiota de diferentes especies animales.

Tabla 1: Principales componentes microbianos cultivables del intestino de diferentes especies animales. Promedio de los recuentos logarítmicos de 10 animales (Rosebury, 1962).

Animal	<i>E. coli</i>	<i>C.perfringens</i>	<i>Enterococci</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Lactobacilli</i>
Ternero	4.3	2.3	5.3	0	2.4
Cordero	6.5	4.3	6.1	0	3.9
Caballo	4.1	0	6.8	0	7.0
Cerdo	6.5	3.6	6.4	5.7	8.4
Pollo	6.6	2.4	7.5	0	8.5
Conejo	2.7	0	4.3	8.6	0
Perro	7.5	8.4	7.6	8.7	4.6
Gato	7.6	7.4	8.3	8.9	8.8
Ratón	6.8	0	7.9	8.9	9.1
Humano	6.7	3.2	5.2	9.7	8.8

En la microbiota del sistema digestivo hay dos *phyla* predominantes *Bacteroidetes* – Gram negativos– y *Firmicutes* –Gram positivos– (Eckburg *et al.*, 2005; Karlsson *et al.*, 2011; Louis *et al.*, 2007; Salyers, 1984; Sekirov *et al.*, 2010; Wegmann *et al.*, 2013).

Uno de los géneros bacterianos más importantes encontrados en el colon y en el rumen de animales de granja son *Bacteroides spp.* y *Prevotella spp.* (phylum

Bacteroidetes). Son también los más numerosos en la especie humana, pudiendo llegar hasta 10^{10} - 10^{11} UFC/g (Flint, 1999).

Bacteroides spp. y *Prevotella spp.* son bacterias Gram negativas, bacilos no esporulados, resistentes a la bilis (Jousimies-Somer and Summanen, 2002; Karlsson *et al.*, 2011). Son anaerobios estrictos, sin requerimientos nutricionales especiales, y juegan un importantísimo papel en el aprovechamiento del alimento (Salysers, 1984).

En esta tesis nos vamos a centrar en *Bacteroides* por su gran importancia a nivel de la microbiota intestinal, por su influencia directa en la respuesta inmune del animal hospedador y porque, como veremos en los objetivos de la tesis, lo que queremos obtener con este estudio es un probiótico para el consumo animal, que en este caso será para conejos, aunque en cerdos pudiera tener también efectos positivos.

Como animal hospedador hemos elegido al conejo porque en nuestro trabajo diario estamos en contacto con muchas granjas de conejos y sabemos los problemas que tienen para mantener el equilibrio de la microbiota intestinal debido a diversas infecciones, especialmente enteropatía y colibacilosis.

2. EL CONEJO

El conejo común o conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) es una especie de mamífero del orden de los Lagomorfos, de la familia Leporidae, y el único miembro del género *Oryctolagus*.

En la actualidad, su área de distribución abarca el norte de África y toda Europa hasta Rusia. También ha sido llevado a Estados Unidos, Chile, Sudáfrica, China y Australia.

El conejo es un animal herbívoro no rumiante, cuyo aparato digestivo está adaptado a consumir grandes cantidades de fibra. Es un animal gregario y territorial. En óptimas condiciones de terreno y alimento prefieren vivir en largas y complejas conejeras o madrigueras. En ellas habitan de 6 a 10 individuos adultos de ambos sexos. La jerarquía de dominancia es importante en los machos, ya que establece quién tiene prioridad para el apareamiento (Lebas, 2000),

Es un animal de hábitos nocturnos y crepusculares, se alimenta desde que anochece hasta que amanece y pasa la mayor parte del día en sus madrigueras.

Los conejos tienen dos características que les permiten ser muy numerosos: por un lado son muy prolíficos y por otro tienen el aparato digestivo, o más apropiadamente la

fisiología digestiva, con ciertas similitudes a la de los rumiantes. Con esta fisiología digestiva peculiar, los conejos son capaces, mediante una primera digestión rápida, aunque incompleta, obtener nutrientes de forma rápida, ya que sus necesidades energéticas son extremadamente elevadas, y después en una segunda digestión (cecotrofia), obtener energía extra de los nutrientes más lentamente (Carabaño and Piquer, 1998).

Este sistema digestivo es peculiar: por un lado es capaz de ingerir grandes cantidades de comida, separa la parte digestible de la no digestible y elimina rápidamente la fibra de difícil de digestión. Su sistema se basa en la rápida eliminación de la fibra pero es absolutamente dependiente de la existencia de esta en su dieta para evitar problemas gastrointestinales (Rees Davis and Rees Davis, 2003). En condiciones de restricción alimentaria, adaptan su digestión a un ritmo más lento y un mejor aprovechamiento del alimento (Gidenne *et al.*, 2012).

La cría del conejo ha sido históricamente de gran importancia tanto por la carne como por la piel, aunque la cría industrial del conejo se inició entre los años 70-80 del siglo pasado. En estado natural, los conejos hacen posible la existencia o no de determinados depredadores, algunos de ellos, por ejemplo el lince ibérico, en peligro de extinción (Rosell, 2000a).

Los conejos domésticos han sido también muy utilizados en los laboratorios para el diagnóstico de enfermedades y para la elaboración de sueros y vacunas (Rosell, 2000a).

Recientemente los conejos se utilizan también como animal de compañía, tanto en Europa como en Norte América (Rosell, 2000a), lo cual puede tener efecto negativo sobre el consumo y por lo tanto sobre la producción industrial.

Diferentes enfermedades han estado siempre presentes en la cría industrial de conejos. Entre los cuadros crónicos hemos de destacar estafilococia, pasteurellosis, ciertas diarreas, tiña o sarna. Como enfermedades de curso agudo destacan la mixomatosis en los años 50, la enfermedad vírica hemorrágica de los 80-90 y la enteropatía mucoide aparecida a finales de la década los 90 del siglo XX.

Actualmente hay muchos agentes que interviene en el mundo de la cunicultura aparte de los productores de carne y piel: seleccionadores y proveedores de razas y estirpes mejoradas, núcleos que suministran semen, fabricantes de piensos especializados, mataderos, fabricantes de naves, jaulas y accesorios; o los laboratorios especializados

en productos zoonos. Todos estos agentes están implicados, en mayor o menor medida, en la salud de los animales y el balance económico de los sistemas de producción industrial. Salud y balance que pasa por profundizar en el conocimiento de la fisiología y patología del conejo.

2.1. EL SISTEMA DIGESTIVO DEL CONEJO

2.1.1. ANATOMÍA DEL SISTEMA DIGESTIVO

En el conejo adulto, el tubo digestivo tiene aproximadamente 4,5 a 5 m.

En la **boca**, los dientes tienen un crecimiento continuo ya que fisiológicamente ingieren alimentos ricos en fibra y lignina. Cuando hay problemas dentales de tipo anatómico, a la larga se producen problemas digestivos. La maloclusión es hereditaria y se manifiesta por el excesivo crecimiento de los dientes, produciendo dificultades para la alimentación. No tiene cura alguna por ser de origen genético. Como los dientes no están en posición correcta, no se desgastan adecuadamente y se produce el sobrecrecimiento de las piezas dentales afectadas (García, 2004; O'Malley, 2008; Reusch, 2005). Esto ocurre también cuando los animales de granja, debido a una dieta inadecuada, tienen incisivos demasiado largos (Rees Davis and Rees Davis, 2003).

Es frecuente en animales jóvenes que se produzca rotura de incisivos. Hay que controlarlo para evitar la compactación del alimento (García, 2004).

En la boca tiene cuatro pares de glándulas salivares: parótida, mandibular, sublingual y zigomática. De forma continua, sobre todo en respuesta a la ingesta, las glándulas producen poca amilasa (Lebas, 2000; Rees Davis and Rees Davis, 2003)

El **esófago** es el siguiente tramo del tracto digestivo. Va desde la cavidad oral al estómago y tiene la particularidad de que sólo permite una dirección del bolo alimenticio (hacia el estómago), por lo que nunca se produce reflujo, fenómeno al que contribuye el cardias, la válvula de unión con el estómago (Lebas, 2000)

El esófago conecta con el **estómago** que es una bolsa curvada con revestimiento mucoso y termina en el píloro, esfínter que regula las salidas del alimento hacia el intestino delgado. El estómago tiene una pared muy musculada (Carabaño and Piquer, 1998). El pH es siempre muy ácido aunque varía según la hora del día: pH más altos (es decir, menos ácido) se observan a las 9 h (cuando está más cargado de cecotrofos: heces blandas). Entre las 15 h y las 3 h el pH desciende a valores entre 1,5 y 2,0. El pH depende no sólo de la hora de la ingestión sino también de la zona

donde habita y de la edad del individuo. La pared secreta ácido clorhídrico, pepsinógeno y algunos minerales como Ca^{++} , K^+ , Mg^{++} y Na^+ (Lebas, 2013). El pH ácido es capaz de inactivar a la mayoría de microorganismos, por lo que mantiene baja la carga microbiana del estómago y del intestino delgado (Rees Davis and Rees Davis, 2003).

El **intestino delgado** está a continuación del píloro con unos 3 m de longitud. Por variaciones anatómicas y fisiológicas significativas se divide en duodeno, yeyuno e íleon. El pH es aproximadamente de 7. La bilis procedente del hígado llega al principio del duodeno por el conducto colédoco, inmediatamente después del píloro, y contiene sales biliares y sustancias orgánicas, pero ningún enzima. El conducto pancreático desemboca hacia el final del duodeno y permite la incorporación a la digesta de diferentes enzimas producidas en el páncreas que degradan proteínas, almidón y grasas. En la pared del intestino delgado se ven estructuras organizadas de tejido linfoide (1-2 cm) que se denominan placas de Peyer, una de las piezas fundamentales del sistema inmunitario asociado a la mucosa intestinal. El contenido del intestino delgado es líquido, sobre todo en la porción proximal (Lebas, 2013).

La motilidad del intestino delgado es muy importante para la digestión y es variable según el tramo. Se producen contracciones periódicas en la pared intestinal y son especialmente intensas en el duodeno. En la regulación de los movimientos peristálticos intervienen hormonas intestinales y péptidos. El tránsito de la digesta a través del intestino delgado es rápido en comparación con otros herbívoros (Rees Davis and Rees Davis, 2003).

La digestión y la absorción de los alimentos a través de la pared del intestino delgado son semejantes en los conejos a otras especies animales. Iones de bicarbonato son secretados en el duodeno para neutralizar la acidez del estómago. La mayor parte de la digestión de carbohidratos y proteínas simples ocurre en el duodeno y en el yeyuno, y los productos de esta digestión son absorbidos por las microvellosidades del yeyuno. Esto incluye la digestión y absorción de diferentes componentes de los cecotrofos como aminoácidos, ácidos grasos volátiles, vitaminas y diferentes componentes de los microorganismos digeridos. La digestión de los peptidoglicanos bacterianos presentes en los cecotrofos es facilitada por la adición de lisozima a los cecotrofos durante su paso por el intestino delgado. La lisis por parte de los microorganismos de los cecotrofos produce enzimas microbianos que también ayudan en el proceso digestivo del conejo. El íleon tiene un importante papel regulando y reciclando electrolitos

segregados por el estómago y el intestino delgado proximal, reabsorbiendo diferentes iones, en especial bicarbonato (Rees Davis and Rees Davis, 2003).

Alteraciones en la composición de la dieta provocan cambios cuantitativos y cualitativos en cuanto a los substratos suplementarios necesarios para la microbiota del intestino delgado (Louis *et al.*, 2007). El conejo necesita un alto contenido en fibra que regula el tránsito digestivo –tiempo que dura la digestión– y determina la composición de las heces –duras y blandas– (Carabaño *et al.*, 1988).

El intestino delgado desemboca en la base del **ciego** a través de la válvula íleo-cecal, en la que se localiza otro elemento importante del sistema inmunitario de los conejos, el *sacculus rotundus*. Esta estructura parece tener una función inmunológica importante y existe únicamente en los lagomorfos (Rees Davis and Rees Davis, 2003). La pared del ciego es rica en tejido linfoide y está invaginada formando una espiral de unas 25 vueltas, lo que incrementa la superficie de la mucosa en contacto con el contenido cecal. El contenido circula de la base hacia el fondo por el centro y retorna a la base por la pared. En el extremo distal se localiza el apéndice cecal de un diámetro mucho menor y con la pared rica en tejido linfoide (Lebas, 2000).

El apéndice secreta iones de bicarbonato en el lumen cecal, actuando como neutralizador de los ácidos grasos volátiles producidos por la fermentación bacteriana cecal. Conejos con dietas bajas en fibra y altas en carbohidratos fermentables desarrollan un apéndice muy largo. Esto explica que un incremento en la función secretora del apéndice sea necesario para contrarrestar los productos de la fermentación de carbohidratos. Por otro lado, también puede explicar el incremento de tejido linfoide por la alteración que se produce en la microbiota de estos conejos (Rees Davis and Rees Davis, 2003).

El ciego hace de cámara de fermentación anaeróbica para organismos como *Bacteroides*, que se encuentran aquí a concentraciones superiores a 10^9 UFC/g. Además de la ingesta, los mucopolisacáridos segregados por las células caliciformes de la mucosa sirven de fuente de carbohidratos para la fermentación cecal de *Bacteroides* spp. (Rees Davis and Rees Davis, 2003).

A continuación del ciego se encuentra el **colon**, de 1,5 m de largo en los animales adultos. Al inicio tiene unas saculaciones (pequeños abultamientos en forma de saco), a esta parte se la denomina colon proximal; en la parte intermedia la pared tiene una capa muscular muy desarrollada, es el *fusus coli* y esta pared se transforma en lisa en la parte distal, llamada también colon distal (Lebas, 2000). El *fusus coli* es una

estructura única de los conejos. Marca la diferencia entre el colon distal y proximal y regula la separación de material fermentable y fibra no digestible. Algunos investigadores han visto que hay correlación entre la actividad del *fusus coli* y algunos mecanismos que potencian mecanismos de regulación, incluyendo influencias sobre el sistema nervioso y niveles de prostaglandinas en circulación, aldosterona y otras sustancias. De todas maneras no está claro si estos cambios son el efecto o la causa de la actividad del *fusus coli*. Se ha visto que las prostaglandinas inhiben la motilidad del colon proximal y estimula la actividad del colon distal, ayudando a la formación de cecotrofos (Rees Davis and Rees Davis, 2003).

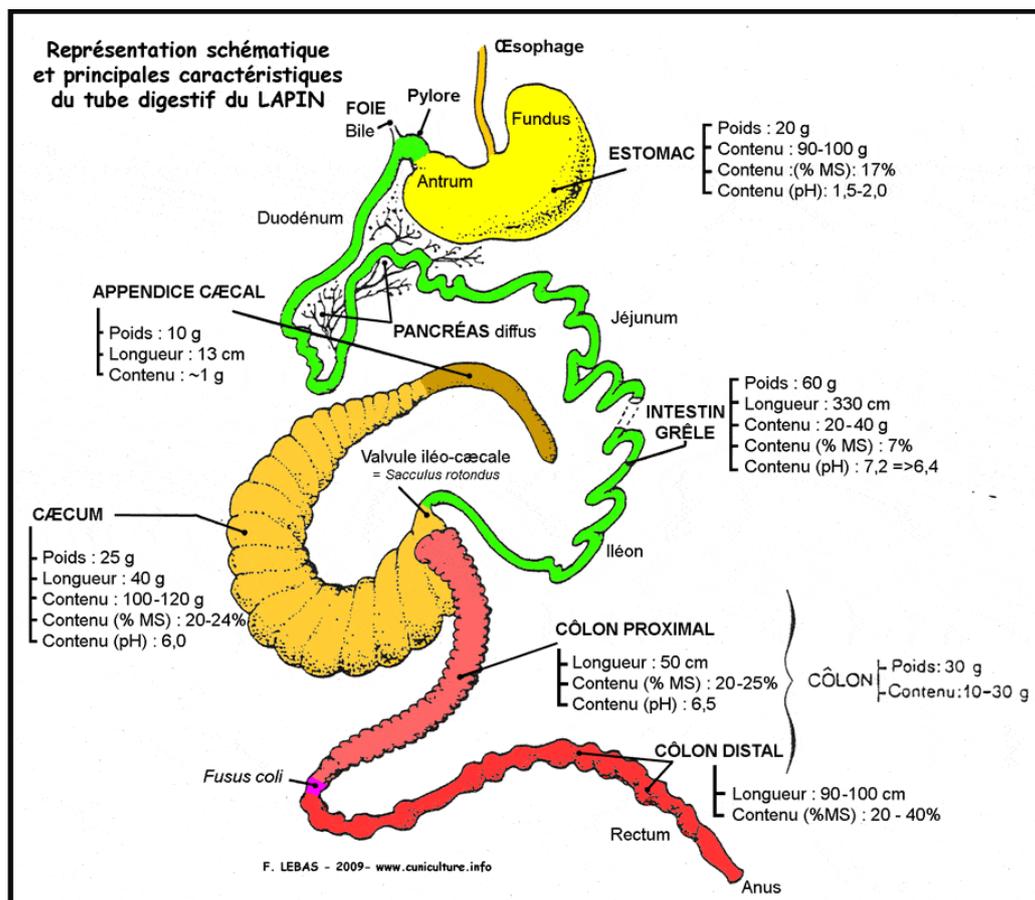


Figura 1: Esquema del sistema digestivo del conejo (Lebas, 2013)

El hígado y el páncreas vierten sus secreciones en el intestino delgado. En los conejos el páncreas es pequeño, lo que puede explicarse por tener una digestión muy activa con bajos niveles de proteína y de almidón. El jugo pancreático contiene una cantidad importante de enzimas digestivas que permiten la degradación de proteínas (tripsina y quimiotripsina), del almidón (amilasa) y grasas (lipasas). La bilis proveniente del hígado contiene sales biliares y numerosas sustancias orgánicas además de algún

enzima. El conejo produce diariamente entre 100-150 mL de bilis por kilogramo de peso vivo (Lebas, 2013; Rees Davis and Rees Davis, 2003).

El último segmento del intestino grueso es el **recto** que no tiene ningún papel significativo en la fisiología digestiva.

2.1.2. TRÁNSITO INTESTINAL Y CECOTROFIA

El alimento llega al estómago y está entre 2-4 h en un medio altamente ácido pero en el que se producen pocos cambios. En condiciones fisiológicas, el estómago nunca está vacío (Rees Davis and Rees Davis, 2003). El contenido se introduce en el intestino delgado por potentes contracciones de la pared del antro pilórico del estómago. Por la acción de diversas sustancias y enzimas, los alimentos se van



degradando y los productos de la digestión atraviesan la pared del intestino y son distribuidos por la sangre a todo el organismo. Las partículas que no se han degradado al cabo de unas horas, entran en el ciego donde vuelven a ser degradados por enzimas producidas por las bacterias que viven en el ciego, liberando moléculas más simples que pueden pasar al torrente sanguíneo.

Figura 2: Cecotrofos o heces blandas. El resto de la digesta que queda en el ciego se vacía en el colon. La mitad son partículas grandes y pequeñas que no se han degradado y la otra mitad son restos de bacterias del ciego y restos de secreciones del intestino delgado (Lebas, 2000)

Hasta el ciego, el sistema digestivo funciona de forma semejante a otros animales monogástricos, pero a partir del colon proximal se establece la diferencia, ya que éste tiene una función dual. Si el contenido entra en el colon durante la mañana, se producen pocas variaciones bioquímicas. La pared segrega un moco que envuelve las partículas formando pequeñas esferas por acción de las contracciones de la pared. Estas esferas, agrupadas en racimos, reciben el nombre heces blandas o cecotrofos. En otro momento del día, se observan contracciones en sentidos alternos hacia el recto y hacia el ciego de nuevo. Según la potencia y velocidad de estas contracciones el contenido es exprimido, de forma que la parte líquida es devuelta hacia el ciego y la parte sólida, que contiene partículas gruesas, forma las heces duras. La separación de los dos tipos de heces se hace de forma mecánica, asociada a un aumento de

producción de prostaglandinas tras la ingesta, que intervienen en los movimientos y estimulación del colon. También hay variaciones en el grado de absorción de AGV (ácidos grasos volátiles) y del pH (Lebas, 2013).

Es importante aclarar que la coprofagia es diferente a la cecotrofia. En este último caso, los alimentos sólo se han digerido parcialmente (Rees Davis and Rees Davis, 2003).

Estos cambios en la fisiología del colon son la causa de que se produzcan los dos tipos de heces: las duras y los cecotrofos.

Las heces duras son evacuadas de forma normal, pero los cecotrofos son recuperados por el animal en el momento en que salen del ano: las ingiere en cuanto salen y las deglute sin masticar. El



Figura 3: Heces duras.

mecanismo de reconocimiento por parte del animal de estas heces blandas aún no está claro. Cuando el animal no está bien o sufre de estrés es característico encontrar cecotrofos en el suelo debido a la no ingestión de los mismos. La observación de cecotrofos en la fosa de purines es un indicador de falta de salud del conejo.

A media mañana, en condiciones normales, los cecotrofos ocupan hasta tres cuartas partes del estómago, y siguen un proceso digestivo igual que si fueran alimentos normales. Como las fracciones pueden reciclarse hasta 4 y 5 veces la digestión completa del conejo puede durar entre 15-30 h.

Tabla 2: Porcentaje de componentes en cecotrofos y heces duras.

Elementos	Cecotrofos	Heces duras
Materia seca (%)	27,1	53,3
en % de la materia seca		
Proteínas	29,5	13,1
Celulosa	22,0	37,8
Lípidos	2,4	2,6
Minerales	10,8	8,9

En resumen, los cecotrofos tienen un ciclo diario de excreción opuesto al de la ingestión y la excreción de heces duras. La cecotrofia ocurre durante el periodo luminoso del día y la ingestión y excreción de heces duras durante el periodo nocturno. Este marcado ciclo circadiano de cecotrofia e ingestión hace que el contenido y la composición química de los contenidos intestinales varíen a lo largo del día. Esto es importante cuando se programa un estudio experimental y la recogida de muestras, porque ha de hacerse siempre a la misma hora (Bellier *et al.*, 1995; Carabaño and Piquer, 1998; Jilge, 1982; Rees Davis and Rees Davis, 2003).

La regulación de la cecotrofia depende de la microbiota digestiva y del ritmo de la ingestión. En los gazapos se inicia cuando comienzan a comer alimentos sólidos, sobre la tercera semana de edad.

Una singularidad de la fisiología digestiva de los cecotrofos radica en el papel de la mucina que recubre los cecotrofos. Los cecotrofos no son masticados por los dientes, y permanecen intactos, protegidos por la capa mucosa, dentro del estómago entre 6-8 horas después de la ingestión. Durante este tiempo, la materia cecal del interior de los cecotrofos está protegida del pH gástrico y continúa la fermentación de los microorganismos, produciéndose ácido láctico en el estómago. El pH del estómago durante este periodo asciende hasta 3 unidades de pH, por el efecto tampón del lactato producido por los microorganismos en el interior del cecotrofo (Rees Davis and Rees Davis, 2003).

En resumen se puede decir que la fisiología gastrointestinal del conejo es un sistema complejo con la singularidad de la separación de los componentes digeribles y no digeribles de la dieta en el colon proximal. Es necesario que la dieta contenga fibra no digerible de gran tamaño (>0.5 mm), para poder mantener la motilidad del ciego y del colon. La mayoría de los problemas gastrointestinales observados en conejos en producción se deben a dietas inapropiadas (baja concentración de fibra, alta concentración de proteína, alta concentración de carbohidratos), poca cantidad de alimento, tratamientos inadecuados o infecciones por diferentes tipos de microorganismos (Rees Davis and Rees Davis, 2003).

2.1.3. MICROBIOTA INTESTINAL

La microbiota coloniza todas las superficies. En condiciones fisiológicas está en la piel, en el tracto genital, en el sistema digestivo y en el aparato respiratorio. Pero, tanto cuantitativa como cualitativamente, el que posee un grado de colonización mayor y un

mayor grado de biodiversidad es el tracto gastrointestinal (TGI). En el colon residen el 70% de todos los microorganismos del cuerpo (Sekirov *et al.*, 2010).

La composición bacteriana de la microbiota no se mantiene estable durante toda la vida del animal sino que va variando. Depende principalmente de la dieta del animal (Ishikawa *et al.*, 2013) y aunque no hay mucha información sobre la diversidad de la microbiota de los cecotrofos parece que sus poblaciones bacterianas son parecidas a las del contenido cecal (Rodríguez-Romero *et al.*, 2012).

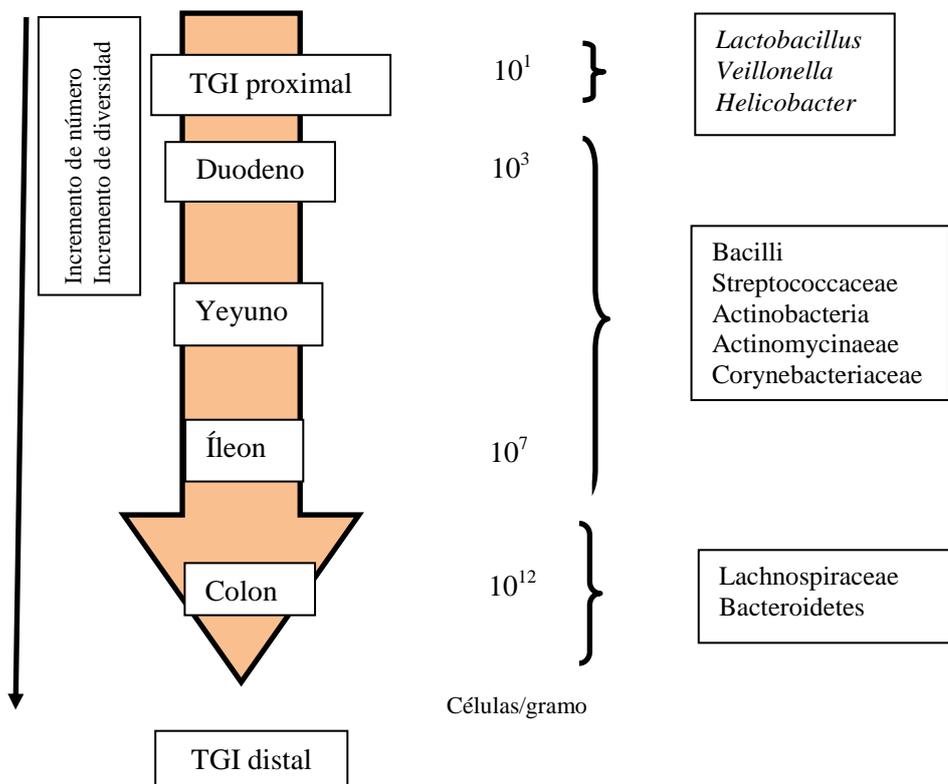


Figura 4: Variaciones en número y composición a través del tracto gastrointestinal (Sekirov *et al.*, 2010)

La complejidad de la microbiota, su difícil accesibilidad y su diversidad temporal y espacial hacen que su estudio sea complejo (Hart *et al.*, 2002). El predominio de microorganismos anaerobios y anaerobios facultativos en el sistema digestivo reflejan que la concentración de oxígeno es muy baja, una de las características definitorias de este ecosistema (Quigley, 2010; Sekirov *et al.*, 2010).

La microbiota no es homogénea. El número de bacterias del sistema digestivo de los mamíferos varía de 10^1 - 10^3 bacterias/gramo en estómago y duodeno; va aumentando

progresivamente a 10^4 - 10^7 bacterias/gramo en yeyuno e íleon, y llega al máximo en el colon con 10^{11} - 10^{12} bacterias/gramo (O'Hara and Shanahan, 2006).

El metabolismo bacteriano y la competición entre bacterias están muy influenciados por la histo-fisiología del sistema digestivo. Las interrelaciones metabólicas entre las bacterias de la microbiota son difíciles de estudiar cuando los sustratos son degradados en un medio tan densamente poblado (Louis *et al.*, 2007).

Por otro lado, la composición de la microbiota varía según el tramo del TGI. Hay grupos de microorganismos más numerosos en unos segmentos que en otros, lo que se ha visto en biopsias de individuos enfermos y sanos. En el intestino delgado hay un gran porcentaje de bacterias de la clase Bacilli, junto a los *phyla* Firmicutes y Actinobacteria. En cambio, el *phylum* Bacteroidetes y la familia Lachnospiraceae de Firmicutes son más abundantes en las muestras de colon (Frank *et al.*, 2007).

Además de la variación longitudinal que hay en la microbiota intestinal, hay también una gran heterogeneidad en la composición de la microbiota de forma latitudinal.

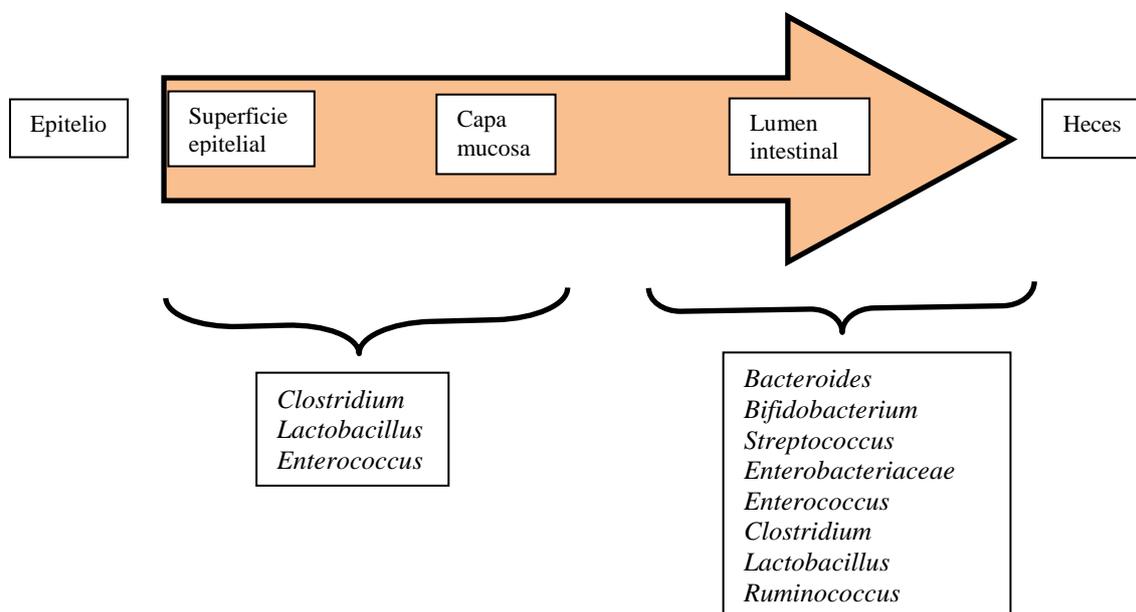


Figura 5: Variaciones transversal en la composición de la microbiota del intestino (Sekirov *et al.*, 2010)

El epitelio intestinal está separado del lumen por una fina y fisicoquímicamente compleja capa de mucus. La microbiota presente en el lumen intestinal difiere

significativamente de la microbiota asociada a la capa de mucus y a la microbiota presente en la proximidad del epitelio. Muchas especies que se han encontrado presentes en el lumen intestinal no tienen acceso a la capa de mucus, ni a las criptas epiteliales. *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, miembros de la familia Enterobacteriaceae, *Clostridium*, *Lactobacillus* y *Ruminococcus* se encontraron en la digesta, mientras que sólo *Clostridium*, *Lactobacillus* y *Enterococcus* se detectaron en el mucus y en las criptas epiteliales del intestino delgado (Swidsinski *et al.*, 2005).

El tracto gastrointestinal del feto es estéril. La colonización se inicia, en el momento del nacimiento, con la microbiota vaginal de la madre (los mamíferos recién nacidos tienen la microbiota muy parecida a la del tracto vaginal de la madre). Durante la primera etapa de la vida la microbiota es bastante sencilla. Después, a medida que el individuo se hace adulto, la microbiota se va haciendo más compleja, hasta llegar a la fase de adulto, momento en el que adquiere cierta estabilización. Durante este tiempo hay un balance dinámico entre la microbiota intestinal, la fisiología del hospedador y la dieta, que influye directamente en la adquisición inicial, desarrollo y estabilidad eventual del ecosistema, en lo que supone un proceso complejo. (Mackie *et al.*, 1999).

La supervivencia de los recién nacidos y el mantenimiento de su homeostasis requiere mecanismos de regulación de la mucosa intestinal que la hace funcionar como una unidad compleja. Esta unidad está compuesta de varios tipos de células de las cuales sólo algunas tienen como función el transporte de sustancias, y otras son reguladoras o tienen roles inmunogénicos. La regulación es compleja y necesita coordinación entre el transporte intestinal y los procesos digestivos en varios segmentos del intestino, con alteraciones en el torrente sanguíneo y motilidad intestinal. No obstante, hay muy poca información sobre este proceso regulador (Pacha, 2000).

A los pocos días del nacimiento, coliformes y estreptococos dominan la microbiota en todas las especies. Los anaerobios estrictos aparecen un poco después. Clostridios y Lactobacilos suelen estar presentes en el hospedador durante un corto periodo de tiempo. Factores externos y del hospedador que controlan la ingesta de bacterias, establecen el orden de la sucesión de las cepas colonizadoras lo cual tiene gran importancia para entender la dinámica y el resultado final de la colonización (Mackie *et al.*, 1999).

Como factores externos tenemos el medio en el que está el hospedador, hábitos de alimentación y bebida, y la composición de la microbiota materna. Problemas con la dieta y con la temperatura pueden influir en la sucesión de microorganismos.

Como factores internos tenemos la propia fisiología del hospedador, los nutrientes endógenos y la microbiota existente: cambios de pH, interacciones microbianas, ácidos biliares, secreciones, respuestas inmunes del hospedador, terapias con fármacos y receptores bacterianos de la mucosa (Mackie *et al.*, 1999).

No se puede hablar por lo tanto de una “normalidad” general. Muchos estudios utilizan para definir la microbiota normal muestras de heces, pero estas no son representativas de los tramos proximales del intestino o del entorno de la mucosa intestinal. A pesar de esto, en la actualidad, a través de análisis genómicos, se empieza a vislumbrar la realidad: análisis del 16s rRNA, transcriptómica y proteómica bacteriana (Eckburg *et al.*, 2005; Isolauri *et al.*, 2004).

Un pequeño cambio en la composición de la microbiota puede dar provocar disbiosis, que conducirá a la enfermedad, o probiosis, con efectos positivos para el hospedador (Zhao *et al.*, 2013).

Cuando se produce disbiosis por variación de las concentraciones bacterianas, y por consiguiente de sus relaciones, es cuando se puede producir enfermedad: obesidad, diabetes, inflamación intestinal, cáncer colorectal, diarreas crónicas o agudas, etc. (Guarner and Malagelada, 2003; Jeffery and O'Toole, 2013; Tuohy *et al.*, 2003; Wegmann *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013). La variación de la microbiota puede ser el causante o el agravante de otras enfermedad (Sekirov *et al.*, 2010). Por eso es muy importante para el individuo mantener la homeostasis de su microbiota. Esto se ha comprobado en pacientes humanos con cáncer colorectal, en los que se observan cambios en la microbiota, pero las especies implicadas no están aún esclarecidas. Parece que cuando hay enfermedad se produce un aumento de *Bacteroides* y *Fusobacterium* pero no se sabe exactamente su papel (Wu *et al.*, 2013).

Resulta evidente que la función de la microbiota es participar en el procesamiento de los compuestos alimentarios, proteger la mucosa de la inflamación, disminuyendo la permeabilidad intestinal, e incrementar los mecanismos de defensa del epitelio, regulando la respuesta inmune local y general (Hedin *et al.*, 2007; Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004; Tuohy *et al.*, 2003).

La microbiota está pues íntimamente relacionada en muchos aspectos con la fisiología del hospedador, desde el estado nutricional, a la conducta y su respuesta a procesos de estrés (Mackie *et al.*, 1999; Sekirov *et al.*, 2010).

Pero la función más importante de la microbiota intestinal está relacionada con estrategias inmunoquímicas. Esta relación se produce por una mutua dependencia entre las bacterias y los sistemas de defensa del hospedador. El hospedador tiene que tener mecanismos que reconozcan su microbiota saprófita y eviten que ésta sea eliminada por la respuesta inmune propia, aunque también debe mantener controlada la capacidad de algunas de estas bacterias de translocarse fuera del aparato digestivo. Una respuesta excesivamente baja del hospedador puede dejarlo demasiado expuesto a posibles infecciones producidas por microorganismos poco patógenos. Además, en la maduración de la respuesta inmune, la microbiota saprófita juega un papel primordial, esto ha podido verse en estudios hechos con animales libres de microorganismos (disminución de células T e IgA secretoria) (Hooper *et al.*, 2001; Stappenbeck *et al.*, 2002).

Debido a la variación que se puede inducir en la microbiota, por los componentes primarios y los aditivos de la dieta, se ha abierto un importante camino para utilizar los prebióticos y los probióticos como fines terapéuticos (Hart *et al.*, 2002). Se ha visto, por ejemplo en diarreas infantiles, que la administración de *Lactobacillus* disminuye el tiempo de la diarrea. También se ha visto relación entre procesos inflamatorios y cambios en la microbiota (Hart *et al.*, 2002; Jeffery and O'Toole, 2013).

La dieta puede influir en la microbiota de dos maneras: (Gibson and Roberfroid, 1995)

1- incluyendo microorganismos viables que, tras resistir el proceso de la digestión (ácidos gástricos, enzimas digestivos, ácidos biliares, etc.), son capaces de llegar a tramos distales del sistema digestivo y, de forma temporal o permanente, se implantan, crecen y son metabólicamente activos.

2- incluyendo sustratos, generalmente no digeribles para el hospedador, que estimulen el crecimiento y el metabolismo de las bacterias del tracto digestivo.

Los primeros reciben el nombre de probióticos y los segundos el sobrenombre de prebióticos.

La influencia de la dieta es más importante durante las fases de desarrollo y maduración del intestino que cuando el animal ya es adulto. Utilizando dietas diferentes, en el intestino se generan productos diferentes, lo que provoca diferencias morfológicas, de complejos enzimáticos y de transporte. En estados de malnutrición se producen alteraciones importantes en el transporte intestinal. Si durante la lactancia y el destete hay malnutrición, la mucosa intestinal sufre cambios importantes modulando

el transporte intestinal de nutrientes e iones. La permeabilidad del epitelio intestinal a macromoléculas se incrementa y el contenido de IgA de la mucosa y de componentes secretorios se reduce considerablemente (Pacha, 2000).

Por todas estas relaciones e implicaciones puede ser muy beneficiosa la selección de microorganismos que puedan ser administrados en momentos de alteraciones digestivas, teniendo en cuenta sus propiedades físicas, bioquímicas, genéticas e inmunológicas, con fines terapéuticos o preventivos.

La administración de bacterias viables necesita un control de seguridad. Una bacteria que se encuentra en la microbiota de forma natural, en principio, nos garantiza su seguridad. Si las bacterias no son patógenas y se encuentran en leche fermentada, cereales y vegetales, se considera positivo. Se pueden usar también OGMs (organismos genéticamente modificados), por ejemplo el *Lactococcus lactis* que produce IL-10. En estos casos, aunque también en otros probióticos, es muy importante conocer los marcadores de resistencias de antibióticos que poseen. Otro punto importante a conocer de los OGMs es que pueden llegar a tener un crecimiento excesivo que interfiera en la homeostasis del ecosistema intestinal (Hart *et al.*, 2002). Actualmente, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) está revisando y regulando los diferentes aspectos relacionados con la seguridad de los probióticos.

2.1.4. EL SISTEMA INMUNE ASOCIADO A LA MICROBIOTA INTESTINAL

Los estudios de Chung destacan que la microbiota regula los compartimentos inmunes intestinales por diversos mecanismos, y que facilitan ciertas funciones del huésped, ya que cada uno de los compartimentos está adaptado a generar respuestas a patógenos presentes en esa parte del organismo. Uno de estos compartimentos es el formado por el sistema inmune de mucosas (Chung *et al.*, 2012; Janeway *et al.*, 2005).

Como ya hemos dicho la mucosa intestinal forma una barrera de contención, pero al mismo tiempo de relación, para los microorganismos del tracto digestivo. Jugando un papel esencial en esta barrera, el sistema inmunitario está estratégicamente distribuido por la mucosa intestinal. Este tejido se forma en los conejos recién nacidos en el apéndice (ciego) durante la primera semana de vida y es el encargado de producir IgA e IgG, la primera liberada al lumen intestinal y la segunda muy abundante en la lámina propia y espacios vasculares (Roy and Varvayanis, 1987).

El tejido linfóide asociado a mucosas está constituido por una masa de células mayor que la masa celular linfóide asociada a médula ósea, timo, bazo y ganglios linfáticos

juntos. El tejido linfoide periférico asociado a mucosas que tapiza el sistema digestivo se denomina GALT (*gut-associated lymphoid tissue*). El GALT funciona como un sistema de contención que previene el posible daño de los antígenos del sistema digestivo, pero que capaz de inducir, al mismo tiempo, tolerancia contra ciertos antígenos luminales (Fasano and Shea-Donohue, 2005).

Una parte de las células del GALT está distribuida de forma difusa e incluye a linfocitos intraepiteliales, linfocitos de la lámina propia (B y T, mayoritariamente CD4⁺ o T_h), células plasmáticas productoras de IgA dimérica, células presentadoras de antígeno (macrófagos y células dendríticas), neutrófilos, eosinófilos y células cebadas. Los enterocitos, aunque realmente no son células presentadoras de antígeno poseen marcadores moleculares de la Clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHCII), que se expresan a bajo nivel en condiciones fisiológicas y a mayor nivel en condiciones de inflamación crónica o de infección, y en presencia de INF- γ (interferón gamma) son capaces de procesar y presentar el antígeno a los linfocitos CD4⁺ (Hershberg *et al.*, 1997).

Las subpoblaciones de células T CD4⁺ tienen diferentes funciones: los linfocitos T_h1 secretan citoquinas proinflamatorias como IFN- γ y TNF- β . Las células T_h2 secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 y IL-13 y dirigen la respuesta de los anticuerpos. Células T_h17 secretan las interleuquinas IL-17, IL-22 y IL-23 en respuesta al estímulo de TGF- β y la IL-6, y T_{reg} que secretan predominantemente IL-10 y TGF- β . En pruebas con ratones deficientes en el gen de la IL-10 se ha visto que no se producen enfermedades directamente pero sí que hay una colonización anormal de bacterias, con un incremento importante de bacterias aeróbicas adherentes e invasivas de la mucosa que preceden al desarrollo de colitis (Madsen *et al.*, 1999). La respuesta de las células T gastrointestinales se considera principalmente reguladora (MacDonald and Monteleone, 2001).

En algunas zonas del intestino, el tejido linfoide está altamente organizado alrededor de folículos linfoides (O-MALT) y, es aquí, donde se produce la interacción efectiva entre los agentes exteriores y el sistema específico de defensa asociado a mucosas. El folículo linfoide contiene linfocitos B, células dendríticas foliculares y macrófagos; mientras que los linfocitos T se distribuyen en las regiones ínter y parafoliculares. La mayoría de las células B de la periferia y de la corona del folículo expresan receptores de superficie de tipo IgM, mientras que las localizadas en los centros germinales han cambiado a receptores de tipo IgA. La inmunoglobulina más abundante en mamíferos es la IgA que es secretada a través de la mucosa (Macpherson *et al.*, 2000). Los

linfocitos CD4⁺ (T_H) se localizan predominantemente en la corona subepitelial y en la región de la cúpula, entre el epitelio de la mucosa y el folículo linfoide, mientras que los linfocitos CD8⁺ (T_C) se concentran en las zonas parafoliculares.

Formando parte del epitelio mucoso, y en estrecha asociación diferentes estructuras O-MALT, se encuentran las células M, células que juegan el papel de internalización activa de antígenos, poniéndolos directamente en contacto con el sistema inmunitario. Estas células M sólo se encuentran en las superficies mucosas y, específicamente, asociadas a los folículos linfoides. No son células presentadoras de antígeno, sino que son células transportadoras, dejando el papel de presentación antigénica a las células fágicas, a las células dendríticas y a los enterocitos. El nombre de células M se debe a que tienen micropliegues (*microfolds*). Su superficie es muy fina, glicosilada y sin mucus, y donde tiene lugar la interacción directa entre moléculas y partículas del lumen y la mucosa intestinal (Janeway *et al.*, 2005).

El número de estas estructuras linfoides organizadas varía con la especie animal y puede cambiar en los individuos, a lo largo del tiempo, como respuesta a la exposición de la mucosa a los diferentes antígenos o por el envejecimiento del animal. Estas estructuras se encuentran individualizadas y dispersas en buena parte del sistema digestivo; o bien agrupadas en grandes agregados, como sucede en las tonsilas, en el ciego, en el apéndice cecal y en las placas de Peyer del intestino delgado.

Las tonsilas y adenoides forman un anillo de tejido inmune al inicio del sistema digestivo y respiratorio (anillo de Waldeyers) y están constituidas por grandes agregados de tejido linfoide. Estas estructuras juegan un papel muy importante en edades tempranas de la vida del animal (Janeway *et al.*, 2005).

El núcleo de las placas de Peyer se origina en regiones específicas del intestino, durante la fase fetal, y sigue pautas de desarrollo diferentes, en función de la especie animal (Griebel and Hein, 1996).

Las placas de Peyer están presentes en la mayoría de las especies de aves y mamíferos. Su tamaño y distribución, varían en función de la especie, la edad del animal y la porción del intestino en la que se localizan. Son uno de los lugares específicos para la generación de respuesta del sistema inmune de mucosas en el intestino. Son ricas en precursores para la producción de IgA secretoria (MacDonald and Monteleone, 2001). Las placas de Peyer aparecen con diferentes aspectos, formando una especie de cúpulas que se distribuyen, en número variable, a lo largo del intestino. (Janeway *et al.*, 2005).

Algunas de estas diferencias pueden observarse en la Tabla 3

Las placas ileales de las especies tipo I adquieren su máximo tamaño a las pocas semanas del nacimiento e involucionan, de forma continua, a lo largo de la vida del animal, de modo similar a lo que sucede con otra estructura primordial del sistema inmunitario, el timo.

Las placas ileales de las especies tipo II se desarrollan entre las 2 y 4 semanas de vida, manteniéndose a lo largo de toda la vida del animal.

Tabla 3: Diferencias entre especies de las placas de Peyer (Griebel and Hein, 1996).

	Nº PP Ileon	Nº PP Yeyuno	Desarrollo Embrionario
Especie Tipo I			
Ovina y bovina	1 (1,5 a 2 m)	25 a 40	+
Porcina	1 (1 a 2 m)	14 a 27	+
Canina	1 (0,2 a 0,3 m)	26 a 29	+
Equina	Varios (0,1 a 0,3 m)	245 a 320	+
Especie Tipo II			
Cunícola	<i>Saculus rotundus</i>	1 a 10	-
Gallina	1	Varios	-

Las placas yeyunales se mantienen a lo largo de toda la vida y su número varía con el grado de estimulación inmunológica y con la edad.

Tanto las placas de Peyer ileales como las yeyunales son lugares de proliferación de células-B, pero varían en cuanto a la composición celular presente y esto determina sus funciones fisiológicas. En las placas ileales encontramos un 95 % de células B con marcadores de superficie de tipo IgM, un 0.5% de linfocitos T CD4⁺, un 2-3% de macrófagos, menos de un 1% de células plasmáticas productoras de IgM, un 3% de linfocitos B con marcadores de superficie indicativos de estimulación previa y 2-3% de linfocitos B CD5⁺. En las placas de Peyer yeyunales encontramos un 34-45% de células B con marcadores de superficie de tipo IgM, un 10-15% de linfocitos T CD4⁺, un 2-3% de macrófagos, un 4-6% de células plasmáticas productoras de IgM, IgG e

IgA, un 35-40% de linfocitos B con marcadores de superficie indicativos de estimulación previa y un 30-40% de linfocitos B CD5⁺. Aunque la mayor producción de células B se produce en la médula ósea, las placas de Peyer ejercen un papel esencial en la respuesta humoral (Griebel and Hein, 1996). En estudios con ratas se ha demostrado que la migración celular confirma la importancia de las placas de Peyer como lugar generador de precursores de anticuerpos específicos IgA, que migran a otras regiones de la lámina propia del sistema digestivo (Griebel and Hein, 1996).

La **primera función** del sistema inmune asociado a mucosas, especialmente en el sistema digestivo, es la instauración de un estado de inmunotolerancia hacia determinados antígenos. La importancia de dicha inmunotolerancia queda patente si pensamos que buena parte de las macromoléculas, que son necesarias para el metabolismo, son potencialmente antigénicas y que, su rechazo, supondría su difícil internalización. Esta inmunotolerancia estaría regulada por la presentación del antígeno a linfocitos T CD8⁺ supresores (T_S), bien de forma directa, bien con la ayuda de algunas células epiteliales o de los macrófagos especializados de la mucosa. Posteriormente, las células T_S inhiben la estimulación antigénica de los linfocitos T_h, reprimiendo la presentación del antígeno por parte de las células competentes, e inhibiendo la expansión clonal de los linfocitos B (g y e) así como la producción de IgA secretoria por parte de las células plasmáticas de la mucosa (Brandtzaeg, 1989). En la distinción que hace el organismo entre respuesta inmune o inmunotolerancia, juega un papel destacado el grado de expresión en las células de la mucosa de los marcadores clase II del complejo mayor de histocompatibilidad; expresión regulada por el interferón-γ producido por T_h1 o por determinadas células epiteliales.

La **segunda función** desempeñada por algunos de los componentes del sistema inmune asociado a mucosas, es la de producir células inmunocompetentes. Esta función linfopoyética está claramente demostrada para las placas de Peyer de algunos mamíferos. En estos órganos se produce una intensa selección sobre las células que pasarán al resto de sistemas, ya que sólo migran a la periferia el 5% de los linfocitos producidos, eliminándose el resto por un mecanismo de apoptosis (Badiola, 2001). Las células emergentes de estos órganos linfoproliferativos no tienen una especial apetencia por la mucosa digestiva y son capaces de distribuirse por todos los compartimentos del organismo; este hecho contrasta con las células producidas por el resto de estructuras linfoides asociadas a mucosas, que sí tienen una alta afinidad por el epitelio mucoso, aunque su implantación pueda darse en zonas muy distantes al punto de generación (Badiola, 2001). La estimulación antigénica local de estos

órganos linfopoyéticos haría que, del 5% de células emergentes, una proporción importante sea inmunocompetente para dicho antígeno y sería el origen de una respuesta inmunológica generalizada, con producción final de IgG sérica.

La **tercera función** del sistema linfoide asociado a mucosas es la de responder localmente a la estimulación antigénica, aunque el término "local" debe tomarse como concepto en el que se incluyen todas las superficies mucosas. Esta característica es importante de cara a posibles estrategias vacunales.

Por las particulares interacciones entre células que tienen lugar durante la estimulación antigénica en las superficies mucosas, hay algunos detalles realmente importantes.

Como ya hemos visto, en el epitelio mucoso existen unas células especiales, las células M, encargadas de transportar los antígenos al tejido linfoide organizado subyacente. Estas células, que constituyen el 10-50% de las células del epitelio asociado a los folículos linfoides, poseen receptores de superficie a los que, específicamente, se unen estructuras superficiales de ciertos virus (hemaglutinina de los reovirus) y bacterias (fimbrias de bacterias Gram negativas), permitiendo la fijación selectiva y el transporte de agentes infecciosos a lugares próximos en donde puede instaurarse una respuesta específica de defensa. Estos receptores de superficie no son exclusivos de las células M, ya que otras células epiteliales de las mucosas los poseen, pero sí parecen estar más accesibles que en el resto de células. Uno de los receptores que está cobrando cada vez más importancia es el receptor GM1, de naturaleza glicolipídica y presente también en los enterocitos, al que se une de forma específica el componente B de la toxina colérica, un potente estimulador de la inmunidad de mucosas (Badiola, 2001).

La adherencia de ciertas moléculas, o de partículas entre 0.1 y 10 μm , a la superficie luminal de las células M induce cambios, a nivel del citoesqueleto, que provocan la internalización del antígeno y, englobado en vesículas citoplasmáticas, su liberación a la zona de la cúpula del folículo linfoide. Las otras células de la mucosa relacionadas íntimamente con los folículos participarían también, aunque de forma menos eficiente, en la internalización de antígenos y de ciertas bacterias.

Las células M poseen además dos características importantes que potencian su papel en los mecanismos locales de defensa: las bacterias saprófitas del tracto intestinal no son capaces de fijarse a ellas (Neutra *et al.*, 1999) y sí fijan selectivamente inmunoglobulinas del tipo IgA secretoria (Roy and Varvayanis, 1987).

Las células M son utilizadas por ciertos microorganismos para internalizarse y producir infecciones severas. Este es el mecanismo utilizado por ciertas bacterias --*Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*, diferentes cepas enteroinvasivas de *Salmonella* o *Escherichia coli*— y ciertos virus --reovirus o enterovirus— (Corr *et al.*, 2008).

La consecuencia más importante de la infección del intestino al igual que en otras partes del organismo, es el desarrollo de respuesta inflamatoria. La liberación de citoquinas y quimiocinas en esta respuesta es clave para la inducción de la respuesta inmune adaptativa. Los mediadores inflamatorios estimulan la maduración de células dendríticas y otras células presentadoras de antígeno que también expresan otras moléculas reguladoras.

El primer paso de la estimulación de la respuesta inflamatoria es la detección de la presencia de organismos patógenos. En el exterior del organismo, el ambiente es muy rico en microorganismos, en contraste con el interior que es relativamente estéril. Esta diferencia hace que los mecanismos de inmunidad innata sean muy diferentes entre las superficies epiteliales y el interior del organismo. En el interior, células mieloides originan receptores de reconocimiento como lecitinas y TLR (*toll-like receptors*) que reconocen la presencia de bacterias. Las superficies externas están siempre en contacto con el ambiente bacteriano; en el caso del epitelio intestinal con microorganismos comensales y no comensales de la microbiota. Para producir enfermedad, los patógenos han de atravesar la barrera física del epitelio. Esto lo consiguen a través de células M, por pequeñas soluciones de continuidad en el epitelio intestinal o por mecanismos propios de invasión más sofisticados (Janeway *et al.*, 2005).

El antígeno o el patógeno, tras alcanzar la región de la cúpula del folículo linfoide de la mucosa, es internalizado en macrófagos y células dendríticas. En estas células es transformado por la acción de enzimas lisosomales y, en asociación a los determinantes de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad, presentado a linfocitos T_h. La activación de los linfocitos T_h provoca la producción y excreción de interleucinas (IL-4 e IL-5), así como TGF-β (Badiola, 2001)

El antígeno es presentado, de forma paralela, a linfocitos B con marcadores de superficie de tipo IgM o IgD. Esta presentación induce la transformación blástica de dichas células con la expresión de receptores superficiales para IL-5. A dichos receptores se une la IL-5, producida por los linfocitos T_h, induciendo proliferación

linfoblástica. Sobre estos linfoblastos actúan la IL-4 y el TGF- β para provocar un cambio de expresión de los genes que codifican las cadenas pesadas en dichos linfoblastos B. Este cambio cromosómico se manifiesta por la aparición de marcadores de superficie de tipo IgA, IgE o IgG (Badiola, 2001).

Los linfoblastos maduros migran hasta zonas no organizadas del sistema linfático asociado a mucosas donde, tras la transformación a células plasmáticas inducida por la IL-6 y el TGF- β , producidas por los linfocitos T_H2 y las células epiteliales, sintetizan y liberan moléculas de IgA dimérica. La migración puede darse a otras superficies mucosas diferentes a la del lugar de entrada antigénica, y ello es el origen del concepto "sistema inmunológico común de mucosas" (McDermott and Bienenstock, 1979).

Algunas células de la mucosa están especializadas en la síntesis de una serie de moléculas que, tras su polimerización, son expresadas en su superficie interna. A estas moléculas, conocidas con el nombre de componente secretor, se unen las IgA diméricas y facilitan que esta inmunoglobulina se internalice en el enterocito, migre hacia la superficie luminal de la célula epitelial y sea liberada al exterior. En el exterior, estas IgA secretorias juegan un papel esencial para neutralizar la capacidad infecciosa del agente que ha inducido su formación o del agente relacionado con el antígeno utilizado para inducir la respuesta inmune.

Aunque la IgG es el isotipo más abundante y efectivo, la IgA secretoria es la inmunoglobulina dominante en secreciones externas y en secreciones plasmáticas del epitelio (McDermott and Bienenstock, 1979). En conejos, como en otras especies animales, las placas de Peyer son ricas en precursores de células plasmáticas productoras de IgA, aunque también se producen IgG e IgM, que jugarían un cierto papel en la protección de las superficies mucosas frente a determinados antígenos. Estas inmunoglobulinas son electroforéticamente diferentes a las encontradas en el suero.

La respuesta inmunitaria común de las mucosas no se ciñe, exclusivamente, a la producción de anticuerpos. Los linfocitos T, estimulados a nivel de la mucosa intestinal por los antígenos bacterianos, migran hasta la mucosa traqueobronquial y el pulmón, donde juegan un papel importante en la eliminación pulmonar de bacterias. En diferentes pruebas se ha visto que la inmunización, vía digestiva, con bacterias inactivadas protege al pulmón de la infección y que las células T se ven envueltas en el proceso (Dunkley *et al.*, 1995).

2.1.5. ESTRUCTURA Y MADURACIÓN DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Cada molécula de inmunoglobulina consiste en dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. En el caso de las cadenas ligeras, la estructura final de las inmunoglobulinas está constituida por un fragmento procedente de los segmentos génicos V_L (variable), un fragmento procedente de los segmentos génicos J_L (unión) y un fragmento procedente de los segmentos génicos C_L . En el caso de las cadenas pesadas, la estructura final está constituida por un fragmento procedente de los segmentos génicos V_H , un fragmento procedente de los segmentos génicos D (diversidad), un fragmento procedente de los segmentos génicos J_H y un fragmento procedente de los segmentos génicos C_H .

El desarrollo de la diversidad de anticuerpos y su regulación en cuanto a su selección o no, no está claro todavía, existiendo además significativas diferencias entre especies animales (Lanning *et al.*, 2000b).

En conejos se pueden distinguir tres estadios hasta la maduración final de las inmunoglobulinas (Crane *et al.*, 1996; Lanning *et al.*, 2000a):

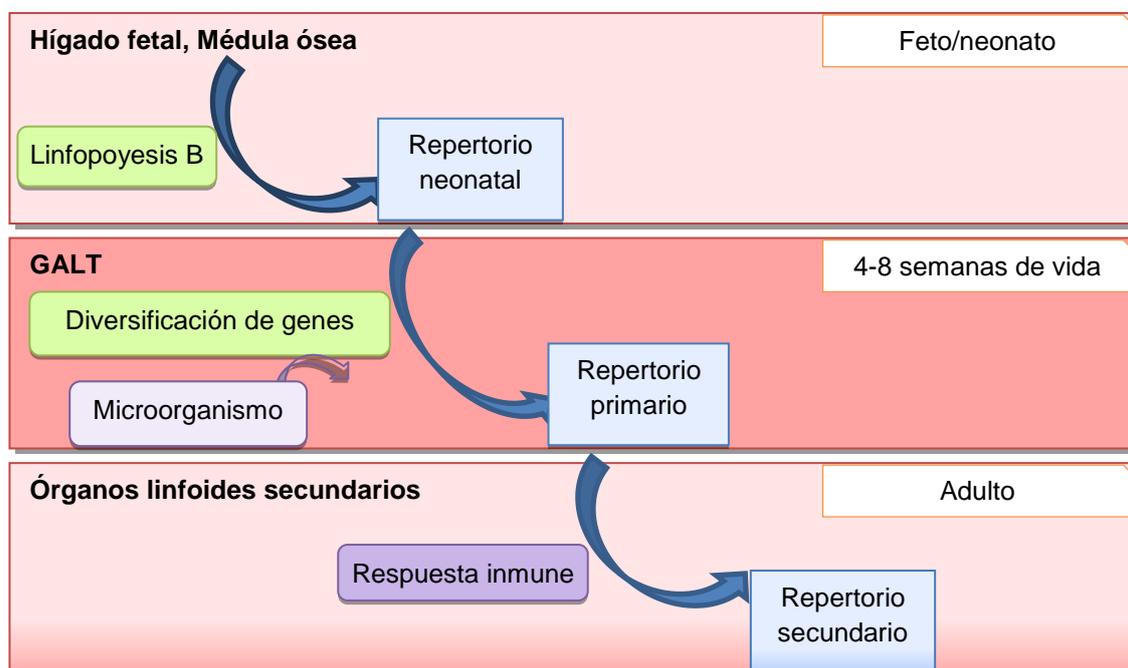


Figura 6: Modelo del desarrollo del repertorio de inmunoglobulinas en el conejo (Lanning *et al.*, 2000b).

- **Repertorio neonatal:** En conejos, al igual que en pollos, el repertorio de las cadenas pesadas se desarrolla primero por reestructuración de los fragmentos génicos VDJ. Los fragmentos génicos VDJ en el repertorio neonatal son el resultado directo de

la reordenación de los fragmentos génicos VDJ durante la linfopoyesis de células B en el hígado fetal y en la médula ósea. La linfopoyesis de células B empieza durante el desarrollo fetal y decrece rápidamente después del nacimiento, durante las tres primeras semanas de vida (Hanson and Lanning, 2008).

En conejos, la linfopoyesis de células B empieza pronto durante el desarrollo fetal, y decrece rápidamente al poco de nacer convirtiéndose en limitada en adultos. Parece en principio que o son células de larga vida o se renuevan ellas mismas (Crane *et al.*, 1996; Hanson and Lanning, 2008; Lanning *et al.*, 2000a).

Aunque en conejos se localizan 100 fragmentos génicos V_H , 12 fragmentos génicos D y 6 fragmentos génicos J_H , no todos se encuentran en la misma proporción en las moléculas maduras de las inmunoglobulinas (Friedman *et al.*, 1994; Lanning *et al.*, 2000b). En el caso de los fragmentos génicos V_H , el 70-90% de las inmunoglobulinas séricas contienen el fragmento V_H1 (Crane *et al.*, 1996; Gallarda *et al.*, 1985).

Adicionalmente, para los fragmentos génicos D de las cadenas pesadas, las inmunoglobulinas séricas contienen preferentemente los fragmentos D1, D2a y D2b (Friedman *et al.*, 1994). También se observa cierta dominancia del fragmento génico J_H4 , mientras que el fragmento J_H1 no es funcional (Lanning and Knight, 1997).

- **Repertorio primario:** En conejos se desarrolla entre las 4 y las 8 semanas después del nacimiento.

Aunque la escasa combinatoria de fragmentos génicos VDJ implicaría un abanico restringido de inmunoglobulinas maduras, el repertorio primario final se amplía significativamente por el fenómeno conocido como diversificación somática de los fragmentos génicos VDJ, fenómeno que tiene lugar en el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal –GALT– (Lanning *et al.*, 2000b; Rhee *et al.*, 2004). La diversificación somática está producida por hipermutación en el extremo 3' de los fragmentos génicos VDJ (Lanning and Knight, 1997). Estos autores comprobaron que la frecuencia de mutación en los primeros 120 nucleótidos del extremo 3' de los fragmentos génicos VDJ era del 2,4%, frecuencia que disminuye significativamente conforme se incrementa la distancia al extremo 3'. No obstante lo anterior, los 33 últimos nucleótidos de los segmentos génicos J_H están altamente conservados (Tabla 4), conservación que hemos utilizado para el diseño de los cebadores para el estudio de secuencias de los fragmentos génicos VDJ que hemos analizado en la presentes tesis.

Tabla 4: Ejemplos de secuencias de nucleótidos del extremo 3' de los fragmentos génicos J_H1-J_H6 seleccionados aleatoriamente del GenBank. Las posiciones marcadas con “.” indican identidad con el nucleótido de la posición equivalente de la primera secuencia.

Secuencia de nucleótidos 5'→3'	Fragmento génico	GenBank
TACCTGGATCCCTGGGGCACAGGCACCCTGGTCACCATCTCTTCA	J _H 1	M24223.1
.....	J _H 1	U62586.1
GCTT·T.....C.....G...C...	J _H 2	AF264502.1
GCTT·T.....C.....GG...C...	J _H 2	AF264512.1
CGGT.....T.....CAG.....G...C...	J _H 3	M24223.1
CGGT.....T.....CAG.....G...C...	J _H 3	S78752.1
...T·TA·CTTG.....C.....G...C...	J _H 4	AF264588.1
...T·TA·CAT.....C.....G...C...	J _H 4	M24223.1
·GGT.....T.....CAG.....G.....	J _H 5	S78752.1
·GGT.....T.....CAG.....G.....	J _H 5	AF019259.1
GG·A...C·T.....C...G...C...G.....	J _H 6	S78752.1
GG·A...C·T.....C...G...C...G.....	J _H 6	AF264525.1

En el caso de los conejos, a diferencia de las aves, hacen falta estímulos ambientales, especialmente microbianos (Hanson and Lanning, 2008; Lanning *et al.*, 2000b); para estimular la diversificación somática del repertorio primero de anticuerpos. Este repertorio es bastante complejo y se desarrolla por hipermutación somática del repertorio neonatal (Lanning and Knight, 1997). En los conejos ocurre preferentemente en las placas de Peyer situadas a lo largo del intestino delgado, en el *saculus rotundus* y en el apéndice cecal (Lanning *et al.*, 2000b; Lanning and Knight, 1997).

Algunos investigadores equiparan el funcionamiento del GALT en el conejo a la *bursa de Fabricius* en aves (Lanning *et al.*, 2000b; Pospisil *et al.*, 1995).

En conejos, como posiblemente en cerdos, los tiempos del desarrollo y localización anatómica de la diversificación de los fragmentos génicos VDJ, sugiere la necesidad de que existan uno o más factores exógenos derivados del sistema digestivo durante el desarrollo de este repertorio primario.

Cuando se hace ligación del apéndice, para evitar la entrada de microorganismos, o se trabaja con animales libres de microorganismos, se produce un mal desarrollo del GALT y baja diversificación de los fragmentos génicos VDJ. Esto implica que la diversificación inicial es inducida por algunos miembros de la microbiota (Mazmanian *et al.*, 2005; Rhee *et al.*, 2004). En conejos, se ha visto que la administración simultánea de *Bacteroides fragilis* y *Bacillus subtilis* puede subsanar esta falta de diversificación. El mecanismo por el que ocurre esta inducción es todavía desconocido (Hanson and Lanning, 2008).

- **Repertorio secundario:** El repertorio primario es modificado durante la respuesta inmune antígeno específica por respuesta de células B y mutaciones somáticas en los intrones implicados en la síntesis de inmunoglobulinas.

2.2. ENFERMEDADES DE LOS CONEJOS

Aunque en las granjas de conejos se presta gran atención a dos enfermedades víricas que pueden causar graves pérdidas económicas, la mixomatosis y la enfermedad vírica hemorrágica, en este apartado recopilatorio de las enfermedades de los conejos, me centraré en los principales procesos que afectan directamente al sistema digestivo y de forma especial, aunque no exclusivamente, en los diferentes procesos bacterianos que tienen como diana al sistema digestivo.

2.2.1. ENTERITIS VÍRICAS

A diferencia de otras especies animales, los virus entéricos del conejo no tienen la suficiente entidad, para desencadenar cuadros digestivos significativos, sin la participación de otros patógenos.

Los virus más importantes son Rotavirus y Coronavirus.

Principalmente se ven en gazapos: los rotavirus afectan a animales entre 30 a 80 días de vida, y los coronavirus a animales entre 21 y 70 días de vida.(Reusch, 2005)

La transmisión suele ser oral-fecal. La multiplicación vírica en el intestino causa atrofia de vellosidades e inflamación linfocítica en la mucosa intestinal, predisponiendo al animal a infecciones bacterianas secundarias.

Los signos principales incluyen diarrea, distensión abdominal, letargia, más cualquier síntoma asociado a la posible infección bacteriana secundaria (Agnoletti, 2012). El coronavirus también ha sido asociado a cardiomiopatías y efusión pleural.

El diagnóstico se realiza por PCR, detección de anticuerpos o histopatología.

El tratamiento se basa en fluidoterapia agresiva y antibioterapia en el caso de infecciones bacterianas secundarias, con pronóstico reservado.

2.2.2. ENFERMEDADES BACTERIANAS

Los trastornos bacterianos digestivos representan la primera causa de mortalidad en las explotaciones industriales de conejos y son las entidades que más

desfavorablemente afectan los resultados económicos, al disminuir sensiblemente los índices de conversión y provocar retraso en el crecimiento de los animales que padecen este tipo de procesos (Licois, 2004). La tasa de mortalidad está comprendida entre el 12 y el 20%, pero puede superar el 50%. Los animales más susceptibles son los gazapos destetados de 4 a 8 semanas de edad, pero también los lactantes (Lelkes, 1987; Menéndez, 1994; Peeters et al., 2000).

En paralelo a los signos externos anteriores, se produce secreción aumentada de las células caliciformes del intestino, cambio del movimiento intestinal con reducción o aumento del peristaltismo intestinal, cambios del contenido intestinal, del potencial redox, del valor de pH, así como de la estructura de la mucosa digestiva, junto a la acumulación y multiplicación de microorganismos intestinales potencialmente patógenos, especialmente *Escherichia coli* y *Clostridium* spp formadores de toxinas específicas (*C. perfringens*, *C. spiroforme*, ...).

Cuando hay disminución de la motilidad intestinal se produce acumulación de gas en el estómago y en el ciego, que se asocia a dolor abdominal. Esto provoca alteraciones que conllevan deshidratación del contenido intestinal que inhibe aún más la motilidad y rompe el equilibrio de electrolitos, pudiendo llegar a la paresia gastrointestinal y culminar con impactación cecal. En relación al desequilibrio electrolítico, asociado a problemas de motilidad intestinal, se debe remarcar que los conejos son muy susceptibles a la acidosis, porque algunos mecanismos renales y extrarrenales compensatorios que tienen otras especies, no existen o están restringidos en los conejos (Harcourt-Brown, 2005., 2011.; Meredith, 2009; Reusch, 2005).

Las causas de las diarreas, y más generalmente de las enteritis, son de dos tipos: por un lado pueden estar relacionadas directamente con agentes externos patógenos, y por otro lado, con desordenes en las funciones digestivas bajo la influencia de determinados factores como por ejemplo predisposición genética, alimentación, estrés, etc. (Licois, 2004; Meredith, 2009).

Estas enfermedades, independientemente de su causa, tienen en los conejos signos clínicos comunes: anorexia, apatía y diarrea. En la necropsia pueden verse lesiones poco patognomónicas. Además diferentes patógenos actúan de forma simultánea o se suceden unos a otros, con lo cual, resulta difícil diferenciarlas por observación directa, haciéndose necesaria la ayuda del laboratorio (Lelkes, 1987; Peeters et al., 2000).

En muchas ocasiones el cuadro clínico singular es difícil de encontrar. En disenterías por *E. coli* se encuentran regularmente también clostridios y en las enterotoxemias, en

las cuales los clostridios con crecimiento anaeróbico dominan en el intestino, también se encuentran *E. coli* en la microbiota intestinal.

Puesto que muchos de estos factores actúan sobre toda la población, muchos animales enferman al mismo tiempo, o en un corto período de tiempo, con síntomas semejantes. Estas enfermedades infecciosas se desarrollan frecuentemente en enzootias poblacionales (“disentería aguda”, “enterotoxemia”, “enteropatía epizoótica”) que afectan a todos los animales o, preferentemente, a los animales de edades determinadas (Lebas, 2000).

Los procesos de fermentación en el ciego favorecen la colonización y multiplicación de especies de *Clostridium* mientras disminuye el crecimiento de *E. coli*; lo contrario ocurre en las condiciones menos anaeróbicas del intestino donde se favorece el crecimiento de coliformes.

En el caso de la Enteropatía Epizoótica del conejo, enfermedad que se conoce en Europa Occidental desde 1996-1997, y caracterizada por altas pérdidas económicas, se encuentran a menudo especies bacterianas que crecen en condiciones anaeróbicas (*C. spiroforme*, *C. perfringens*, *C. sordelli*, ...), junto a anaerobios facultativos como *E. coli* (Agnoletti, 2012). Característico de esta enfermedad es la falta de lesiones en el intestino, especialmente en el ciego, al contrario de lo que ocurre con otras infecciones agudas del intestino provocadas por *E. coli* y *C. perfringens*. Los desórdenes del peristaltismo en el intestino grueso, típicos de la enteropatía (parálisis intestinal) con acumulación de contenido seco y denso en el ciego, pudieran estar asociados a toxinas específicas de algunas cepas de clostridios.

Diferentes cepas de *E. coli* enteropatógenos producen enterotoxinas, que provocan alteraciones en el transporte de iones a través de la mucosa intestinal y conduce a la acumulación de líquidos en el intestino. Además de la acción local de la enterotoxinas en el intestino, se produce shock endotóxico debido a la reabsorción de endotoxinas (LPS) de *E. coli*.

La evolución de la enfermedad, los síntomas clínicos y los cambios anatomopatológicos que se producen, son en gran medida dependientes de los tipos y cantidades de toxinas formadas por las bacterias implicadas.

Está claro que hay ciertos factores que contribuyen al desarrollo y evolución de las enterotoxemias y de la enteropatía mucoide: la edad, la dieta, el estrés y otras infecciones como la coccidiosis. La mayor susceptibilidad a diferentes infecciones en

el periodo del destete se atribuye a los numerosos cambios fisiológicos que se producen durante este periodo, aunque los tipos y roles de los cambios no están aún bien definidos. La pérdida de la inmunidad materna, el incremento de la acidez gástrica, la pérdida de la actividad gástrica bactericida, la alteración de la producción enzimática del intestino, cambios en la microbiota intestinal o el desarrollo incompleto del sistema homeostático pueden ser factores que influyen en el incremento de la susceptibilidad durante este periodo crítico de la producción cunícola (Lelkes, 1987).

Para la mayoría de las infecciones del sistema digestivo las medidas profilácticas de mayor impacto deben incluir mejoras de manejo y de alimentación, así como la minimización de riesgos de infecciones a través de medidas de limpieza y desinfección regulares. En relación a la alimentación, se considera necesaria la limitación del contenido de proteínas y almidón, con optimización simultánea del contenido de fibra necesaria para el mantenimiento del peristaltismo gastrointestinal fisiológico.

Para el conejo es necesario mantener en equilibrio tanto su microbiota intestinal como la motilidad en el aparato digestivo (Johnson-Delaney, 2006).

Muchas de las infecciones del sistema digestivo se caracterizan por disbiosis de la microbiota intestinal. En conejos aparentemente sanos, el grupo del Dr. Gidenne encontró, tras el análisis de 228 secuencias clonadas en *Escherichia coli* del 16S rDNA procedentes de ciego, que el *phylum* dominante era Firmicutes (92,6% de las secuencias analizadas), mientras el 3,9%, el 3,1% y el 0,4% de las secuencias restantes correspondieron a los *phyla* Verrucomicrobia, Bacteroidetes y Proteobacteria, respectivamente (Combes *et al.*, 2012; Monteils *et al.*, 2008). Cuando hay enfermedad se producen cambios de la microbiota normal y proliferación de microorganismos patógenos. En casos severos puede presentarse shock endotóxico, por liberación de LPS de bacterias Gram-negativas, mientras que en casos crónicos pueden presentarse diarreas intermitentes y pérdida de peso. El diagnóstico presuntivo se debe realizar mediante la historia clínica y especialmente mediante la revisión sistemática de lesiones macroscópicas en el sistema digestivo, junto al soporte del laboratorio de microbiología.

La microbiota digestiva desempeña un papel fundamental en la digestión de los alimentos y como barrera de defensa contra otras bacterias foráneas. El uso incorrecto de antibióticos puede suprimir algunos componentes esenciales de la microbiota normal y favorecer el desarrollo y proliferación de patógenos productores de toxinas como *Clostridium (perfringens, spiriforme, difficile)* y *Escherichia coli* que originan

trastornos graves en los conejos. Estas alteraciones son aún más frecuentes cuando ciertos antibióticos se administran por vía oral. Clindamicina, lincomicina, penicilina, ampicilina, amoxicilina, cefalosporinas y eritromicina se han relacionado con disbiosis en los conejos.



Figura 7: Incidencia en % de organismos patógenos en 29 explotaciones de conejos. (Peeters 1987 citado en (Peeters *et al.*, 2000))

Las infecciones del sistema digestivo producidas por sobrecrecimiento de *E.coli* enteropatógeno, *C. spiriforme*, *C. perfringens*, *C. piliforme*, *Salmonella* Thypimurium, *Pseudomonas aeruginosa*, especies similares a *Campylobacter*, *Yersinia pseudotuberculosis* o *Lawsonia intracellularis*, suelen acompañarse de inflamación intestinal, por lo que muchos veterinarios de campo denominan a estas infecciones enteritis bacterianas.

El diagnóstico se realiza mediante el aislamiento del microorganismo implicado y el tratamiento debe basarse en los resultados del antibiograma. Mientras no se tengan los resultados pueden administrarse quinolonas o sulfamidas (Peeters *et al.*, 2000).

Entre las enteritis bacterianas se pueden distinguir:

- enteritis causadas por microorganismos muy patógenos (30% mortalidad). Por *E. coli* enteropatógeno.
- enteritis multifactorial: rotavirus y bacterias moderadamente patógenas actuando de forma sinérgica.

- enterotoxemia-iota: resultado de una disbiosis aparecida en la microbiota normal del ciego (estrés, destete temprano, administración de antimicrobianos,...)
- enteritis subclínica: bajas tasas de infección producidas por diversos microorganismos que provocan un retaso en el crecimiento y en el índice de conversión (Peeters *et al.*, 2000).

2.2.2.1. Colibacilosis

2.2.2.1.1. Etiología

La colibacilosis es la más común de las enfermedades intestinales de los conejos. A diferencia de otras especies de mamíferos, el recuento de *E. coli* en el intestino de conejos destetados es bajo (Menéndez, 1994; Peeters *et al.*, 2000).

Este proceso puede tener carácter multifactorial o bien estar provocado por serotipos específicos de *E. coli* y de alto poder patógeno: O15, O26, O103, O109, etc. (Blanco *et al.*, 1996; Milon *et al.*, 1990). Puede afectar desde gazapos lactantes hasta animales al final del periodo de engorde e incluso a reproductores. Causas ambientales y alimenticias predisponen, a través de factores neurovegetativos y nutritivos, a la proliferación de *E. coli* en el interior del aparato digestivo. Los conejos son portadores de *E. coli* en su microbiota bacteriana digestiva, aunque en bajas concentraciones, y la presencia de cepas específicas y la proliferación a tasas superiores a 10^6 UFC/g determina el desarrollo del proceso (Peeters *et al.*, 2000). Los diferentes serotipos implicados dependen de la edad del animal y también de la localización geográfica (Blanco *et al.*, 1996; Camguilhem and Milon, 1989; Menéndez, 1994).

El mal manejo, el estrés, la baja inmunidad, la inmadurez digestiva, el cambio del pH intestinal o estomacal, las alteraciones alimenticias y climáticas, la bulimia del destete, la calidad del agua, los parásitos internos, el síndrome respiratorio presente en las maternidades, etc., son causas predisponentes o agravantes.

2.2.2.1.2. Síntomas y lesiones

La mayoría de cepas de *E. coli* enteropatógenas de conejo, no producen ninguna enterotoxina termoestable o termolábil conocida y tampoco son enteroinvasivas. En realidad *E. coli* forma parte de la microbiota normal minoritaria de los conejos (Milon *et al.*, 1990).

Las cepas de *E. coli* enteropatógenos más virulentas son portadoras del gen *eae*, mecanismo de patogenicidad que facilita la adherencia a las células del epitelio intestinal y la destrucción de las microvellosidades intestinales, causando así diarrea severa (Blanco *et al.*, 1996; Licois, 2004; Peeters *et al.*, 2000).

Milon ha visto en sus experimentos y estudios que las cepas de *E. coli* aisladas en procesos patogénicos se pueden dividir en dos biotipos: ramnosa negativos, que son altamente patógenos y ramnosa positivos que tienen una débil o nula patogenicidad. Una de estas cepas, la cepa B10 serogrupo O103, ramnosa negativa, produce enfermedad grave y muerte de aproximadamente el 50% de la población. *In vivo* estas cepas se adhieren al epitelio ileal y por histología se ha visto que parecen ser los responsables de lesiones de superficie. Otra cepa análoga GV (O103, ramnosa negativa) induce lesiones en los *microvilli*. Este grupo O103 es pues considerado muy patógeno (Milon *et al.*, 1990). Esta diferenciación en la fermentación o no de la ramnosa es una importante herramienta de trabajo a incluir en el diagnóstico de procesos entéricos en conejos (Camguilhem and Milon, 1989).

En estudios hechos en España (Blanco *et al.*, 1996), también se ha visto que los serotipos aislados de animales enfermos son diferentes de los aislados en animales sanos. Las cepas aisladas de animales enfermos contenían en su gran mayoría el gen *eae* de virulencia y eran: O26, O49, O92, O103 y O128, ramnosa negativos.

Cepas enteropatógenas no se han encontrado en conejos destetados sanos, pero hay evidencias de que conejos adultos pueden ser portadores asintomáticos (Camguilhem and Milon, 1989)

Lo primero que ocurre es una disminución de la capacidad digestiva y de absorción del intestino, seguida de diarrea, disminución del índice de conversión, pérdida de peso y mortalidad. Presentan diarrea amarillenta con distensión abdominal y deshidratación cuando son lactantes, diarrea líquida amarillo-clara al destete y diarrea oscura y pastosa cuando tienen de 40 a 50 días de vida. Las mortalidades serán más o menos importantes en función del recuento de colonias de *E. coli* por gramo (UFC) que tengan en el tracto digestivo, así como de la cepa implicada, pudiendo ser del 5% y llegar a superar el 50%. Esto puede provocar enormes pérdidas económicas no sólo por la muerte de los animales sino también por la pérdida de peso que se produce en los animales que no llegan a morir (Blanco *et al.*, 1996).

En la necropsia de los animales lactantes se aprecian hígados ligeramente anaranjados e ileítis aguda de tipo catarral o hemorrágico, con ausencia de lesiones

en la mucosa cecal y en otros órganos. En los animales de engorde se aprecia una marcada enteritis y tiflitis catarral o hemorrágica aguda. Se observa también fuerte inflamación de los linfonódulos mesentéricos y de las placas de Peyer zonales, así como focos necróticos y úlceras estomacales.

El estómago puede estar lleno de líquido o de aire. El intestino delgado contiene líquido y su mucosa se desprende con facilidad. El ciego puede estar lleno de aire, con claro timpanismo.

El diagnóstico es complejo ya que en la investigación bacteriológica de cualquier proceso diarreico aparece *E. coli*. Puede haber confusión clínica y de lesiones con coccidiosis intestinal, enteropatía mucoide, salmonelosis, etc. Actualmente se ha evolucionado mucho en la identificación y detección de los factores de virulencia que intervienen, gracias a las técnicas moleculares (Licois, 2004).

2.2.2.1.3. Prevención

Los gazapos de 4 a 5 semanas de edad son los más sensibles a la colibacilosis. Por eso, mantener siempre a las hembras reproductoras sanas es la mejor prevención. La mayoría de procesos colibacilares tienen su origen en los progenitores que, al ser adultos y más resistentes, no presentan la enfermedad pero si, transmiten las cepas enteropatógenas a sus descendientes. El cambio del alimento y de las condiciones ambientales puede tener efectos positivos. Suministrar paja de cereal enriquece la dieta en fibra y mejora el tránsito digestivo. Se debe vigilar que el agua de bebida no esté contaminada, manteniéndola clorada y con pH ácido o utilizando peróxidos. Enriquecer la microbiota digestiva con prebióticos o probióticos también puede ser de utilidad.

Al realizar el destete hay que evitar causas de estrés, por lo que suministrar durante los primeros días del postdestete un producto antiestrés en el agua o a través del alimento, puede ser positivo.

Es importante la higiene de las granjas. Se ha visto que cepas poco patógenas pueden actuar como patógenas en granjas con poca higiene. Es por lo tanto un factor importante a tener en cuenta (Blanco *et al.*, 1996).

La vacunación tiene eficacia limitada. La protección es incompleta y la inhibición de la excreción de *E. coli* enteropatógenos en heces es sólo parcial. La vacunación no limita el número de portadores inaparentes.

2.2.2.1.4. Tratamiento

Difícil por el carácter multifactorial en unos casos y por la presencia de cepas de alto poder patógeno en otros. La aplicación de productos terapéuticos puede, en algunos casos, ser arma de doble filo y en lugar de corregir el problema, acentuarlo y potenciarlo. La antibioterapia para tratar o prevenir diarreas por colibacilosis no es la mejor solución por muchas razones: las peculiaridades del sistema digestivo del conejo y su microbiota, la alta susceptibilidad del conejo a algunos antibióticos (algunos macrólidos y β -lactámicos son tóxicos), las dificultades para la dosificación correcta en condiciones de campo, el alto precio de estos tratamientos, las multiresistencias adquiridas y el efecto colateral sobre otras bacterias de la microbiota (Licois, 2004). No obstante, algunos antibióticos (aminoglucósidos, quinolonas y colistina) pueden, una vez corregidas las causas predisponentes, frenar las diarreas.

2.2.2.2. Enterotoxemia

2.2.2.2.1. Etiología

La enterotoxemia es una toxi-infección provocada por las toxinas de algunas especies de *Clostridium*. Hay dos especies de *Clostridium* implicadas: *C. perfringens* (tipos A, B, C y D) y *C. spiroforme*. La enfermedad es provocada no por el microorganismo directamente sino a través de las toxinas producidas por él. Puede confundirse con otras infecciones gastroentéricas (Peeters *et al.*, 2000).

Los factores nutricionales juegan un papel fundamental: falta de agua, cambios de alimento, sobrealimentación, alimentos en mal estado, piensos ricos en proteína o almidón, falta de fibra, los cambios climáticos bruscos y, principalmente, el calor. Las parasitosis y el abuso y uso de antibióticos inadecuados para el conejo (lincomicina, amoxicilina, penicilinas orales) también favorecen claramente la aparición de las enterotoxemias.

El *C. spiroforme* está presente en el intestino de conejos sanos, pero a baja concentración. Cuando hay infección clínica, el número aumenta muchísimo, y producen toxina iota en altas concentraciones. Esto significa que ha de haber factores que favorezcan la colonización masiva del animal.

Se ha visto en laboratorio y en granja que la administración de clindamicina o lincomicina puede provocar enterotoxemia iota en el 50% de los animales tratados (Peeters *et al.*, 2000).

Parece también, en pruebas *in vitro*, que incrementos del porcentaje de glucosa en el ciego favorece el incremento de estos *Clostridium*.

2.2.2.2. Síntomas y lesiones

En principio la toxina iota produce el incremento de la permeabilidad capilar y una vasodilatación de los vasos sanguíneos de la mucosa intestinal. A continuación se produce necrosis de las células del endotelio capilar y del epitelio intestinal. Esto provoca la hemorragia, la descamación de las células del epitelio, el edema de la pared del ciego y la pérdida de agua y electrolitos hacia la luz del intestino, típicas de la enterotoxemia iota (Peeters *et al.*, 2000).

Se presenta en gazapos y adultos, y entre estos principalmente en hembras en lactación de 8 a 30 días después del parto. La infección se presenta preferentemente desde finales de invierno hasta inicios de verano. En los conejos afectados aparece una súbita y profunda postración; no comen ni beben, se detienen las funciones digestivas, se forman gases que distienden el estómago e intestinos, y el abdomen se abulta extraordinariamente, se timpaniza; la temperatura corporal disminuye hasta alcanzar 36 a 35,5° C. La enfermedad evoluciona en 4 a 5 días y ordinariamente el animal muere.

C. spiriforme es una bacteria de fácil aislamiento en medios selectivos, pero su terapia no es tan simple, ya que son frecuentes las resistencias a antimicrobianos. Por esto es mejor la prevención, para evitar la predisposición a la infección, que la antibióticoterapia (Agnoletti, 2012).

En cuanto a las toxinas de *C. perfringens*, encontramos 17 en la literatura (Nauerby *et al.*, 2003) aunque las diferentes cepas sólo producen un número reducido de ellas. Algunas son más frecuentes que otras, y la combinación de expresión de las cuatro más comunes, (alfa, beta, épsilon y iota) ha permitido dividir las cepas de *C. perfringens* en cinco tipos específicos: A, B, C, D o E (Uzal and McClane, 2012):

- A- sólo producen toxina alfa.
- B- producen toxinas alfa, beta y épsilon.
- C- producen toxinas alfa y beta.
- D- producen toxinas alfa y épsilon.

E- producen toxinas alfa e iota.

Además las cepas pueden producir otra serie de toxinas.

Los signos de la enfermedad se producen por una enorme proliferación de *C. perfringens* en el intestino, pudiendo detectarse incluso en órganos parenquimatosos de animales recién muertos o en estadios avanzados de la enfermedad. La toxina alfa produce efectos diferentes según el estado fisiológico del animal infectado (Uzal and McClane, 2012).

En la necropsia se observa gran dilatación de los intestinos, meteorismo, con las paredes hemorrágicas o ulceradas. El hígado esta degenerado, de aspecto friable, con focos necróticos. La vesícula biliar está muy dilatada. Los riñones aparecen grisáceos y tumefactos. Los ganglios mesentéricos y el bazo se hallan hipertrofiados. No obstante, no ha sido posible reproducir experimentalmente la enterotoxemia únicamente con *C. perfringens* (Agnoletti, 2012).

Últimamente se ha estudiado su posible implicación en le enteropatía epizoótica del conejo (Agnoletti, 2012).

2.2.2.2.3. Prevención

No hay tratamiento preventivo específico. El cunicultor no debe administrar alimentos fermentables y debe mantener rigurosamente las reglas de higiene en general.

Hay que tener en cuenta que es una enfermedad causada por el abuso de antibióticos, no sólo por clindamicina y lincomicina. También por ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina o neomicina.

La profilaxis vacunal mediante la inoculación por vía subcutánea a los animales de toxinas inactivadas, no suele garantizar la prevención.

2.2.2.2.4. Tratamiento

Como he dicho antes, es difícil. Lo primero que ha de hacerse al detectarse la enfermedad es parar el tratamiento antibiótico, si se estuviera aplicando alguno (Peeters *et al.*, 2000).

Al instaurarse la enfermedad, hay que aislar a los animales que aparezcan afectados y hay que cambiar la dieta alimenticia aumentando el aporte celulósico y disminuyendo

el proteico. La acidificación del agua de bebida, junto con la supresión de toda terapia antibiótica vía oral, es una medida imprescindible para el control del proceso.

2.2.2.3. Enfermedad de Tyzzer

2.2.2.3.1. Etiología

Es una enfermedad causada por el *Clostridium piliformis*.

Esta enfermedad afecta a muchos roedores y otras especies de mamíferos, además del conejo. La transmisión ocurre mediante la ingestión de esporas infecciosas que se encuentran en el ambiente. La incidencia es mayor en conejos entre las 5 y 8 semanas de edad, pero pueden afectarse conejos de cualquier edad. La presentación clínica está asociada a episodios de estrés. Los signos clínicos incluyen anorexia, diarrea profusa aguda que puede ser hemorrágica, deshidratación, letargia y muerte usualmente en las primeras 24-72 horas. Los adultos pueden desarrollar la forma crónica de esta enfermedad que se caracteriza por heces blandas y pérdida de peso (García, 2004; Peeters *et al.*, 2000).

Aunque había sido muy común, actualmente no es frecuente.

2.2.2.3.2. Síntomas y lesiones

Se manifiesta con meteorismo, diarrea acuosa y sanguinolenta, adelgazamiento y gran postración, ocasionando elevada mortalidad en un breve periodo de tiempo. El cuadro de lesiones, de enteritis catarral hemorrágica, es el que da nombre al proceso. En los animales adultos, el abdomen hinchado, la sed, el adelgazamiento, el rechinar de dientes y la debilidad general son síntomas que pueden preceder, en pocos días, a la muerte de los animales, que puede llegar del 50-85% (Peeters *et al.*, 2000).

El intestino delgado presenta contenido mucoso (enteritis catarral) e inflamación, el ciego presenta un proceso inflamatorio y dilatación con visualización de estrías hemorrágicas en su pared, contenido líquido y gas llegando hasta la meteorización; el colon suele estar hemorrágico presentando secreción mucosa y líquida.

En la actualidad, es fácil detectar DNA de *C. piliforme*, en el hígado de animales muertos, mientras que antes, con técnicas histológicas la detección era más lenta y difícil (Agnoletti, 2012).

2.2.2.3.3. Prevención

La alimentación y el ambiente juegan un papel decisivo para mantener controlada la infección. El control sanitario del agua de bebida y del alimento, la higiene y la vigilancia de los factores de confort, son decisivos para evitar la enfermedad.

2.2.2.3.4. Tratamiento

En primer lugar habrá que reducir la proteína del pienso y aumentar el suministro de fibra. También habrá que ver el estado del parasitismo interno (especialmente coccidios y nematodos), para minimizar su presencia. En el caso de que hubiera parásitos, habrá que eliminarlos antes de pasar a la acción curativa de la enteritis basada principalmente en la utilización de antibióticos. Los mejores resultados se obtienen con oxitetraciclina y tetraciclina aunque por la rapidez con que cursa la enfermedad no siempre es efectiva (Peeters *et al.*, 2000).

2.2.2.4. Salmonelosis

2.2.2.4.1. Etiología

Es una enfermedad aguda que afecta a conejos de todas las edades, causada por diferentes serovariedades de *Salmonella enterica*, en especial *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* de la subespecie IIIa. Este microorganismo es una bacteria Gram negativa que no se presenta de forma natural en el intestino del conejo. La entrada a la explotación se realiza a través principalmente de dos vías: pienso contaminado por *Salmonella*, o por contacto directo con un portador: roedores presentes en la explotación, aves con acceso al interior de la granja o reproductores infectados.

Borrelli y cols. en uno de sus experimentos demuestran que hay contaminación ambiental a través de las heces. Se ha demostrado que *Salmonella* spp. tiene la capacidad de sobrevivir en el ambiente durante varios días (Borrelli *et al.*, 2011).

Estos microorganismos colonizan el íleon y el intestino grueso y proliferan dentro de los fagosomas del epitelio intestinal y en las células linfoides (Peeters *et al.*, 2000).

2.2.2.4.2. Síntomas y lesiones

Esta enfermedad presenta alta variabilidad dependiendo de la edad de los animales infectados, pero principalmente afecta a hembras gestantes y a gazapos lactantes. En

estos últimos predomina la diarrea verdosa, la lesión inflamatoria en intestino delgado y ciego, así como peritonitis fibrinosa. En el caso de los gazapos de engorde es más frecuente la diarrea de color oscuro, y la presencia de nódulos blanquecinos en la pared del ciego y del apéndice cecal. En las reproductoras predominan los abortos y las piometras, con abundante diarrea negra. En todos los casos es una grave enfermedad que provoca elevadas tasas de mortalidad en caso de no tomarse medidas correctivas (Peeters *et al.*, 2000).

2.2.2.4.3. Prevención

En la salmonelosis puede haber animales enfermos, con signos clínicos, y animales portadores, aparentemente sanos.

La prevención pasa por controlar las vías de entrada de la enfermedad (pienso, roedores, aves, animales de otras granjas). Hay que mantener las correctas condiciones de higiene y sanitarias en la explotación y eliminar a los enfermos o sospechosos.

Debido al carácter recurrente y recidivante del proceso, es de utilidad la administración de autovacunas específicas a los reproductores, ya que es el único mecanismo capaz de eliminar el proceso de las explotaciones (Peeters *et al.*, 2000).

2.2.2.4.4. Tratamiento

En un primer momento se puede aplicar tratamiento de urgencia, con gentamicina o enrofloxacinina o una combinación a base de enrofloxacinina en agua y apramicina y trimetoprim+sulfamida por vía oral y parenteral. Después, con los resultados del laboratorio se escogerán los antibióticos más adecuados en cada caso (Peeters *et al.*, 2000).

2.2.2.5. Enteropatía epizoótica del conejo- Enteropatía mucoide.

2.2.2.5.1. Etiología

La Enteropatía Epizoótica del Conejo (EEC) se trata de un complejo patológico, aparecido de forma panzoótica en 1996, que hoy se encuentra extendido por toda Europa. Aunque en 1996 parecía una nueva enfermedad, se encuentran descripciones de cuadros similares desde mucho antes: fue descrita inicialmente como compactación y enteritis mucoide en 1914 por Hutrya y Marek (Rosell, 2000a).

Se observa en granjas de todo tipo, pero en animales silvestres es difícil de ver porque va asociado a otros patógenos comunes que enmascaran los síntomas (Licois *et al.*, 2005).

Genera mortalidades de hasta el 80% en caso de no aplicarse tratamiento, provocando pérdidas económicas muy graves. Padecen este proceso los gazapos lactantes a partir de 15 días de vida, los reproductores y muy especialmente los gazapos de engorde.

Por su alta mortalidad y su elevada prevalencia, hacen que sea la enfermedad más importante de la cunicultura en la actualidad.

Sigue siendo una enfermedad de etiología desconocida. Se ha discutido mucho sobre el origen vírico o bacteriano. La difusión del patógeno, la transmisión de la enfermedad y la existencia de lesiones en hígado favorecían la hipótesis vírica, aunque el único virus que se encontró en diferentes muestras de animales con enteropatía fue un rotavirus, con el que luego no se pudo reproducir la enfermedad (Licois, 2004; Licois *et al.*, 2005).

En cuanto al origen bacteriano de la enfermedad, *E. coli* se descartó enseguida porque los serotipos aislados no eran constantes. Las que sí parecen estar implicadas son bacterias del género *Clostridium*.

Se han desarrollado estudios para determinar la causa infecciosa, intentar reproducir experimentalmente la clínica que se ha visto en campo e intentar desarrollar una vacuna, pero por ahora todo han sido intentos fallidos: se han estudiado los efectos de diferentes tipos de fibra, procesos patológicos relacionados con la digestión y la presencia de un exceso de hidratos de carbono fermentables, tipos de materias primas, se han utilizado microorganismos individuales y combinaciones de los mismos (Coudert *et al.*, 2000; Licois, 2004), pero con resultados no concluyentes.

Está claro que es un proceso infeccioso porque se ha demostrado contagio entre lotes. Además con antibióticos se consigue controlar la enfermedad, por lo que se están utilizando antimicrobianos de una forma generalizada para prevenir los efectos de la disbiosis que es la causa de muerte de esta enfermedad. Por otro lado lo que está ocurriendo es que debido a esta antibioterapia masiva, otras enfermedades e infecciones que podríamos decir menores han disminuido, aunque no están controladas en absoluto: *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* (Badiola, 2003).

En el 2001 el INIA concedió la financiación de un proyecto en el que intervinieron diferentes grupos de investigación que se dedicaban al estudio de diferentes problemáticas de los conejos: CReSA, ETSIA-UPM, NANTA, Microbiología-UAB, y ETSIA-UPV.

El proyecto se centró en el estudio de los factores etiológicos de la EEC y de las medidas necesarias para su control (Pérez de Rozas *et al.*, 2005).

En los primeros estudios que se hicieron sobre conejos con cuadros naturales de enteropatía mucoide pudimos detectar una gran cantidad de *Bacteroides* spp. y de *Clostridium perfringens*, lo que apuntaba a que ambas especies podían estar implicadas en la enfermedad.

Hasta la fecha, sólo se ha logrado reproducir la enfermedad inoculando alícuotas de contenido cecal de animales enfermos a animales SPF (Licois *et al.*, 2005). El grupo del CReSA ha conseguido reproducir la compactación cecal, junto a tasas de mortalidad de hasta el 45%, tras la inoculación de cultivos puros de una de las cepas de *Clostridium perfringens* (GP-0658), aislada de un conejo con EEC, a animales procedente de una granja con alta calificación sanitaria (Pérez de Rozas *et al.*, 2005). En esta cepa pudimos observar un perfil electroforético de proteínas, del sobrenadante de cultivos *in vitro*, significativamente diferente a otras cepas de *Clostridium perfringens* sin capacidad patogénica, con aparición de nuevas bandas que será importante caracterizar, tanto con fines de diagnóstico y de patogenia, como vacunales. Estos resultados apuntan a que ciertas cepas de *Clostridium perfringens* pudieran jugar algún papel en la EEC. No obstante este tipo de cepas de *Clostridium perfringens* podrían no ser desencadenantes de la enfermedad, aunque sí pueden estar implicadas en las altas tasas de mortalidad. Dewrée y cols. también encontraron cierta asociación entre *Clostridium perfringens* y enteropatía (Dewrée *et al.*, 2007).

Se hizo también la inoculación de *Bacteroides* spp. sobre animales procedentes de hembras de una granja con EEC crónica, y se hizo de dos formas diferentes: en el momento del destete o al inicio de los signos clínicos. En ambos casos se obtuvieron buenos resultados tanto de prevención como de curación. Es decir, que diferentes especies de *Bacteroides*, que forman parte de la microbiota intestinal del conejo de forma natural, cuando hay EEC, aumentan mucho su número porque actúan como mecanismo de defensa (Pérez de Rozas *et al.*, 2005).

Los resultados anteriores nos hicieron plantear la utilización de *Bacteroides* como probiótico contra la EEC.

La EEC puede considerarse un síndrome etiológico (Coudert *et al.*, 2000).

2.2.2.5.2. Síntomas y lesiones

La EEC es un proceso del aparato digestivo, sin inflamación y que presenta mucosidad.

Se caracteriza por la aparición de compactación del contenido cecal, por dilatación gástrica con ausencia de comida en su interior, junto a la presencia de secreciones mucosas en el colon u otras partes del intestino. Hay reducción importante del tránsito intestinal (Coudert *et al.*, 2000).

	EEC	No EEC
Estómago	0,72+/-0,47	2,32+/-1,09
Duodeno	6,20+/-1,11	6,56+/-0,35
Íleon	7,18+/-0,62	7,02+/-0,27
Ciego	6,08+/-0,49	6,05+/-0,11
Colon	7,15+/-0,51	5,97+/-0,17
Orina	5,16+/-0,54	8,20+/-0,10

Tabla 5: Promedio de pH (+/- DE) del pH del contenido de diferentes tramos digestivos y de la orina de gazapos con (EEC) y sin (no EEC) signos aparentes de Enteropatía Epizoótica del Conejo (J.V. Díaz, comunicación personal).

Estudios realizados por J.V. Díaz (comunicación personal) permitieron observar cambios significativos en el pH de diferentes tramos digestivos y de orina (Tabla 4). La acidificación significativa del pH gástrico puede estar asociada a la ausencia de pienso en el estómago, mientras que el aumento del pH en el colon puede estar asociado a la presencia de moco en este tramo intestinal. Finalmente, la bajada significativa del pH en orina pudiera ser signo de acidosis metabólica, resultado del desequilibrio hidroelectrolítico asociado a la enfermedad (Pérez de Rozas *et al.*, 2005).

Se presentan animales con anorexia, letargia, pérdida de peso, diarrea que evoluciona a compactación fecal con exceso de producción de moco e hipotermia. El diagnóstico es presuntivo a partir de la historia clínica y la exploración de los conejos. Los animales enfermos dejan de comer, padecen una progresiva dilatación abdominal con borborigmo, rechinan dientes, tienen hipotermia, acidosis metabólica y por palpación presentan una masa dura en el lado derecho del abdomen. Los conejos más afectados

adelgazan rápidamente y mueren. Podemos observar moco de gran consistencia en las fosas y es frecuente la presencia de cecotrofos debajo de las jaulas con animales afectados.



Figura 8: Enteropatía mucoide. Secreciones mucosas (Coudert *et al.*, 2000)

Los animales no tienen comida en el estómago, tan solo líquido y gas (borborismo); el ciego está aumentado de tamaño, de contenido oscuro, impactado y con gas; el colon puede presentar moco gelatinoso en su interior. Los enfermos tienen la región anogenital sucia, el pelo erizado y sin brillo (Agnoletti, 2012; Coudert *et al.*, 2000; Pérez de Rozas *et al.*, 2013; Pérez de Rozas *et al.*, 2005).

Cuando el cuadro de la granja es grave, las hembras no aceptan al macho y las cubriciones deben suprimirse. Los primeros en enfermar son los gazapos (Coudert *et al.*, 2000).

El síndrome está relacionado con la estación del año. Aunque puede existir durante todo el año, temperaturas inferiores a 20°C o cambios bruscos de temperatura pueden favorecer su aparición.

Un problema añadido desde el punto de vista clínico es la variedad de cuadros clínicos que aparecen en una misma granja: desde animales con síntomas parecidos al VHD, es decir, con forma septicémica, hasta individuos con cuadros subagudos y crónicos (Rosell, 1999).

2.2.2.5.3. Prevención

No existe vacuna ni una prevención específica para su control, sin embargo las medidas higiénicas, la banda única con salida del cebo completo y limpieza posterior, el control térmico con temperaturas confortables y las medidas nutricionales con alimentos donde se limiten los niveles proteicos y de almidón y donde se incremente las tasas de fibra efectiva, tienen importancia en el control del proceso.

2.2.2.5.4. Tratamiento

Hay que administrar antibióticos al inicio del proceso para evitar los efectos más negativos de la infección. Los antimicrobianos más eficaces y utilizados son:

bacitracina de zinc, tiamulina, valnemulina, tilmicosina, tilosina y oxitetraciclina. Estos antibióticos son de eficacia probada en bacterias Gram positivas como son los *Clostridium*. En ocasiones es necesario realizar terapia combinada de alguno de los anteriores con otros productos como aminoglucósidos, colistina o quinolonas.

En la ETSIA de la Universidad Politécnica de Madrid se realizaron diferentes experimentos para analizar el efecto de la fibra y de la proteína sobre las tasas de mortalidad de los conejos durante la fase de engorde. En estos experimentos se pudo comprobar que el aumento de fibra soluble en el pienso de conejos reduce la tasa de mortalidad durante la fase de engorde, reducción asociada a la disminución de *Clostridium perfringens* en la microbiota cecal. Este aumento de fibra produjo también la mejora en la morfología de la mucosa intestinal, valorada por la relación entre longitud de microvellosidades/profundidad de criptas (García *et al.*, 2005; Gomez-Conde *et al.*, 2007).

En paralelo, el mismo grupo de Madrid, comprobó que la reducción del flujo de proteína ileal, es decir la cantidad de proteína que llega a ciego, reduce la tasa de mortalidad durante el engorde y, en el caso de animales sin medicación, se asoció también a la disminución de *Clostridium perfringens* en la microbiota cecal (Chamorro *et al.*, 2007; García *et al.*, 2005).

La restricción de pienso supone una forma de reducir los efectos negativos de la EEC, disminuyendo la aparición de signos clínicos y especialmente de las tasas de mortalidad (Pérez de Rozas *et al.*, 2013).

2.2.3. ENFERMEDADES PARASITARIAS

Por su importancia nosológica y económica en las explotaciones cunícolas, dentro de este apartado sólo mencionaré las producidas por coccidios.

La coccidiosis es una de las enfermedades que puede causar altas tasas de morbilidad y mortalidad en el conejo y puede agravar otros procesos digestivos. Es la enfermedad parasitaria causada por protozoos del género *Eimeria*, que son obligatoriamente intracelulares y que especialmente, pero no exclusivamente, invaden enterocitos (Dkhil *et al.*, 2012).

El género *Eimeria* forma parte del *phylo* Apicomplexa, clase Sporozoa, subclase Coccidia, suborden Eimeriina y familia Eimeriidae (Coudert *et al.*, 2000).

La elevada prevalencia de la coccidiosis en el conejo está relacionada principalmente con las condiciones higiénico–sanitarias de las explotaciones (Gutiérrez, 2003).

El papel patógeno que ejercen las coccidias depende de la especie de *Eimeria*, la edad del hospedador y de la cantidad de parásitos presentes. Una de sus características importantes, en relación a su papel patógeno, es que tiene acción sinérgica con otras infecciones entéricas, provocando problemas de malabsorción y reducción del rendimiento alimenticio, por lo que es responsable de importantes pérdidas económicas.

La problemática de las coccidias reside en su efecto multiplicador: un solo ooquiste puede colonizar a un centenar de células intestinales. Además los ooquistes, que representan la fase externa de su ciclo reproductivo, se caracterizan por su extraordinaria resistencia en el medio ambiente. Tienen gran resistencia a los agentes químicos, y su destrucción sólo es posible por el calor (>40°C), desecación prolongada o ambos (Coudert *et al.*, 2000). Por el contrario, los ooquistes son muy resistentes a las bajas temperaturas: *E. stiedai* sobrevive hasta 6 años a 4°C (Gutiérrez, 2003).

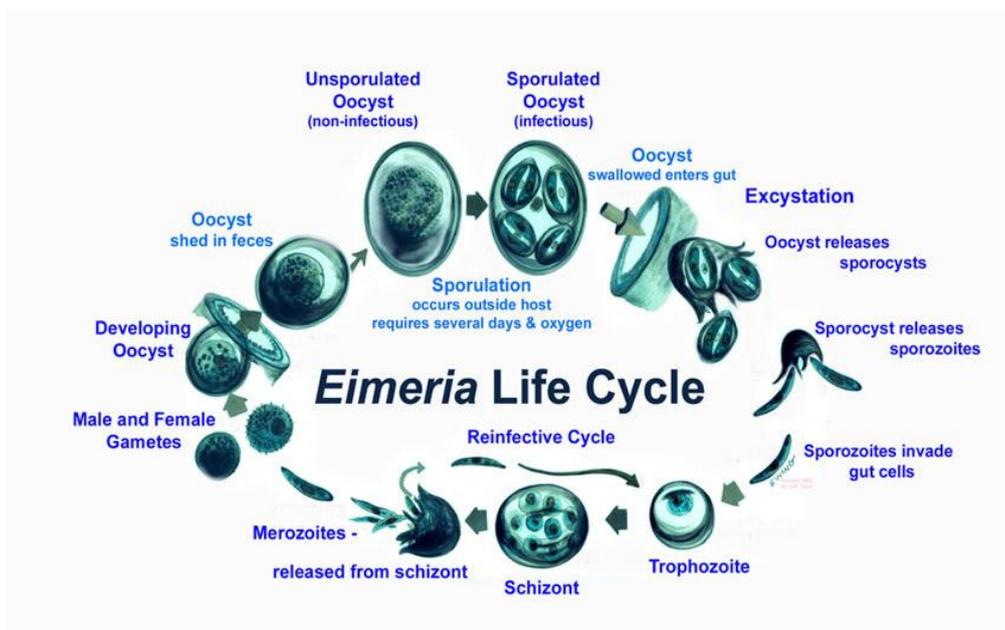


Figura 9: Ciclo biológico de *Eimeria* spp.

En el ciclo biológico de estos parásitos se distinguen dos fases (Gutiérrez, 2003).

- Una **fase interna**, siempre dentro de células epiteliales, al final de la cual se eliminan ooquistes al medio ambiente en las heces de los animales, y en la que hay dos tipos de multiplicación: esquizogonia (asexual) y gametogonia (sexual).
- Una **fase externa**, durante la cual los ooquistes se hacen infestantes mediante la llamada esporogonia o esporulación, siempre que encuentren condiciones favorables de humedad, temperatura y oxigenación.

Los coccidios se reproducen tanto de forma asexual como sexual. El ciclo, una vez dentro del conejo, se inicia con la reproducción asexual y posteriormente se realiza la reproducción sexual: con la consecución de esta segunda fase se producen los ooquistes que son las formas infestantes de este parásito, las cuales se eliminan con las heces. El número de generaciones de reproducción asexual depende de la especie (Pakandl, 2009).

Los conejos se infestan por ingestión de los ooquistes esporulados, que contienen en su interior 8 esporozoítos. En el aparato digestivo de los animales quedan libres los esporozoítos capaces de penetrar en las células epiteliales (Gutiérrez, 2003).

Hay dos formas de coccidiosis: (Hepatica, 1994)

1-Coccidiosis hepática:

Afecta exclusivamente al hígado y está causada por *E. stiedae*. Es una forma fundamentalmente crónica, insidiosa y raramente mortal.

2-Coccidiosis intestinales:

Las especies más patógenas son *E. intestinalis*, *E. piriformis* y *E. flavescens*, que son capaces de provocar diarrea y mortalidad; *E. exigua*, *E. irrisidua* y *E. magna* son de agresividad intermedia, causando coccidiosis subclínicas que afectan a la velocidad del crecimiento; mientras que *E. coecicola* y *E. media* son escasamente patógenas.

El status inmunitario de los animales juega un papel importante en las especies intestinales: la introducción de ooquistes determina el establecimiento de un estado defensivo ante las siguientes agresiones. La intensidad de la inmunidad puede variar durante la vida de los animales.

La gravedad de las coccidias viene condicionada por la inmunidad local, la existencia de una o más especies, la dosis de infestación y la posible asociación con otros agentes patógenos, especialmente colibacilosis (Pakandl, 2009).

Hay unas 800 especies diferentes de *Eimeria*, pero sólo hay 11 se han encontrado en los conejos (Coudert *et al.*, 2000; Dkhil *et al.*, 2012). En la Tabla 6 podemos ver un resumen de algunas de las características de las especies más importantes en cunicultura.

Tabla 6: Coccidias detectadas en el conejo, características y poder patógeno (Gutiérrez, 2003; Hepatica, 1994; Pakandl, 2009)

ESPECIE	FORMA	ASPECTO DEL OOQUISTE	LOCALIZACIÓN	PATOGENICIDAD
<i>E. stiedae</i>	Elipsoidal	Liso, amarillo Micropilo pequeño	Epitelio de los conductos biliares	Variable Según localización
<i>E. irresidua</i>	Ovoide	Liso, amarillo claro Micropilo destacado	Íleon	Patógena
<i>E. magna</i>		Amarillo oscuro Micropilo prominente	Yeyuno Íleon	Patógena
<i>E. media</i>	Elipsoidal	Rosado pálido liso Micropilo no destacado	Duodeno Yeyuno	Patógena
<i>E. perforans</i>	Elipsoidal	Liso, incoloro No se ve micropilo	Yeyuno	Poco patógena
<i>E. intestinalis</i>		Micropilo pequeño	Yeyuno Íleon	Muy patógena
<i>E. coecicola</i>	Ovoide	Liso, blanquecino	Íleon Ciego	No patógena
<i>E. exigua</i>	de barril	Liso, incoloro Sin micropilo	Intestino delgado	Poco patógena
<i>E. flavescens</i>	Ovoide	Liso Micropilo pequeño	Íleon Ciego-colon	Muy patógena
<i>E. vej dovsky</i>	Elipsoidal alargado	Liso, amarillo	Íleon	Poco patógena
<i>E. piriformis</i>	Elipsoidal con polos agudos	Liso, pardo amarillento Micropilo destacado	Ciego Colon	Patógena

En condiciones normales el coccidio convive en equilibrio con el conejo, pero el conejo es un animal muy excitable y cualquier tipo de estrés puede hacer que desencadene un brote, no sólo en conejos jóvenes destetados, sino también en animales adultos que han estado en contacto con los parásitos.

Las mayores pérdidas se producen cuando las madres eliminan ooquistes durante la lactancia, lo que favorece la presencia de infestaciones masivas en los gazapos. En los nidos se producen condiciones de humedad y temperatura muy favorables para la supervivencia y la esporulación de los ooquistes, ya que los principales factores que determinan el grado de contaminación del medio son la temperatura, la humedad y la oxigenación.

Los gazapos lactantes tienen resistencia natural a la infección antes de los 20 días de edad (Gutiérrez, 2003; Pakandl, 2009). Como ocurre en otras especies animales, la infestación de *Eimeria spp.* no provoca inmunidad cruzada, por lo que la protección es específica y no actúa frente a otras especies del género (Gutiérrez, 2003).

La respuesta inmune local mediada por el tejido linfoide asociado a la mucosa tiene un papel más importante en la coccidiosis que la respuesta inmunitaria sistémica. En los conejos este tejido recubre el apéndice, *sacculus rotundus*, placas de Peyer y la lámina propia. Según datos de Dkhil, en un estudio con *E. coecicola* se observa que en el momento de máxima excreción el apéndice había aumentado significativamente de tamaño y era hemorrágico. Aunque su diana final es el apéndice y no el bazo, la infección induce respuestas en el bazo que aparentemente no contiene parásitos. Se han visto cambios significativos en la expresión de genes que codifican para las proteínas relacionadas con la inmunidad innata. Es por tanto lógico pensar que *E. coecicola* induce cambios en la expresión de genes del apéndice, mientras que el hospedador es responsable de los cambios en el hígado y bazo (Dkhil *et al.*, 2012; Dkhil *et al.*, 2013). La inmunidad sistémica madura desde el nacimiento hasta la edad adulta (Pakandl, 2009).

Para confirmar el diagnóstico hay que hacer el examen coprológico en el laboratorio para cuantificarlos y detectar la presencia de distintas especies.

La forma de controlar la coccidiosis es la administración de coccidiostáticos en el alimento, principalmente como forma preventiva, y obviamente una correcta higiene de las instalaciones. Pero no es un problema resuelto, sino que sigue siendo una amenaza para la productividad y sanidad de las granjas. Es importante trabajar en vacunas sobre todo de las especies más patógenas.

3. ANTIBIÓTICOS, PREBIÓTICOS Y PROBIÓTICOS

Se denomina antimicrobiano (del griego, *anti*, 'contra'; *mīkr(o)*, 'pequeño'; *bio*, 'vida'), a cualquier compuesto químico utilizado para eliminar o inhibir el crecimiento de organismos vivos. En un principio, el término antibiótico sólo se empleaba para referirse a los compuestos orgánicos producidos por bacterias u hongos con actividad inhibitoria frente a otros microorganismos, pero en la actualidad también se emplea para denominar a compuestos sintéticos o semisintéticos, por lo que frecuentemente se utiliza como sinónimo de antimicrobiano.

Lo que en un principio se consideró la panacea de la salud, debido al uso indiscriminado o al uso inadecuado de los antibióticos, se ha contrarrestado por la aparición de resistencias microbianas que conlleva la disminución de la eficacia, siendo necesario el descubriendo nuevos antibióticos o la implementación de medidas alternativas (Cotter *et al.*, 2013; Hooper and Gordon, 2001; Lapeña, 1999).

Las bacterias tienen gran capacidad de adaptación a los principios activos que contienen los antibióticos. Es frecuente ver que después de un primer tratamiento con un antibiótico, en una segunda infección se tenga que modificar la posología o incluso cambiar el producto, porque la eficacia ya no es la misma.

Los antibióticos tienen dos mecanismos de acción diferentes: inhibición del crecimiento bacteriano (bacteriostáticos) o destrucción de las bacterias (bactericidas).

Los agentes antimicrobianos actúan, por diferentes mecanismos, sobre diferentes estructuras o funciones de la célula atacada. Las dianas de los antibacterianos se pueden resumir en: (FAO/Errecalde, 2004 Roma)

- Pared bacteriana
- Membrana bacteriana
- Síntesis de proteínas
- Síntesis de ácidos nucleicos

Los antimicrobianos que actúan sobre la pared bacteriana ejercen su efecto a través del bloqueo de su síntesis. Interfieren con la síntesis de peptidoglicanos, elementos esenciales de la estructura de la pared. Cuando hay defectos en la pared celular se puede producir la lisis bacteriana. Actúan solamente frente a microorganismos que

están en crecimiento activo. Pertenecen a este grupo: β -lactámicos, glucopéptidos (vancomicina, teicoplanina y avoparcina), bacitracina y estreptograminas (virginiamicina, quinupristina-dalfopristina) (FAO/Errecalde, 2004 Roma).

Los agentes que actúan sobre la membrana celular bacteriana son las polimixinas (polimixina B y colistín). Estas moléculas son péptidos de tipo catiónico, con mecanismo de acción similar a los detergentes catiónicos, disrumen la porción fosfolipídica de la membrana de las bacterias Gram negativas (FAO/Errecalde, 2004 Roma)

Interfiriendo con la síntesis de proteínas, a diversos niveles actúan un cúmulo de agentes, a saber: aminoglucósidos y aminociclitolos, tetraciclinas, cloranfenicol y similares, lincosamidas y macrólidos. Pueden inducir errores en la lectura de la información contenida en el RNA mensajero. De esta manera, la proteína sintetizada contendrá errores y no tendrá la misma actividad que la proteína nativa. También son capaces de inducir alteraciones en la permeabilidad de las membranas, por alteración en la síntesis de proteínas estructurales de la membrana o de enzimas necesarios para la síntesis de esta estructura bacteria. Otros inhiben la transpeptidasa, lo que impide que se formen los péptidos, otros inhiben la traslocación. Todos estos mecanismos, de una u otra manera, detienen o inhiben la síntesis de proteínas (FAO/Errecalde, 2004 Roma).

Los agentes que actúan sobre los ácidos nucleicos son varios y sus sitios de acción diversos. Entre ellos tenemos a las sulfamidas y trimetoprima cuya acción como antimetabolitos, impidiendo la síntesis de purinas, los distingue del resto. Las fluoroquinolonas y novobiocina actúan sobre las cadenas de DNA, impidiendo el superenrollamiento, por inhibición de la acción de diferentes topoisomerasas, la DNA girasa (fluoroquinolonas y novobiocina) y la topoisomerasa IV (fluoroquinolonas). Los nitroimidazoles, como dimetridazol, metronidazol y tinidazol dañan el DNA bacteriano mediante oxidación, impidiendo su reparación. Los nitrofuranos, a parte de la inhibición del metabolismo de los carbohidratos, por inhibición de la formación de acetil-CoA a partir de piruvato, también son capaces de producir la rotura de la cadena del DNA bacteriano (FAO/Errecalde, 2004 Roma).

Cuando se aplican tratamientos con antibióticos se producen efectos colaterales (Lofmark *et al.*, 2006). Tanto en humanos como en animales, se ha visto que los tratamientos tienen efectos sobre la microbiota y que incluso después del tratamiento los cambios pueden perdurar durante bastante tiempo. Además se producen

resistencias por lo que hay que sopesar siempre el beneficio y el riesgo que nos reporta el uso de antimicrobianos (Crowell *et al.*, 2009; Lofmark *et al.*, 2006)

Esto ha ocurrido tanto en medicina humana, como en medicina veterinaria, donde se han empleado con fines profilácticos y terapéuticos; y se han usado como promotores de crecimiento. En este último caso se han usado a dosis subterapéuticas y se han considerado como “un factor de seguridad”, aunque en realidad ha tenido el efecto contrario. (EUR-Lex-52001DC0333-ES, 2001; Hedin *et al.*, 2007; Lapeña, 1999).

Los antibióticos se administran por diferentes vías. En el caso de su utilización vía digestiva, no pueden distinguir entre microbiota saprófita y patógena, por lo que pueden provocar alteraciones importantes del ecosistema intestinal. (Isolauri *et al.*, 2004; Nomoto, 2005).

El uso prolongado de promotores de crecimiento ha sido muy perjudicial: los animales que los toman son para consumo humano, ha habido escaso control en su uso y se ha producido riesgo sanitario. En un principio no se tuvo en cuenta que el efecto del consumo de estos “factores” llevaba a un incremento en las resistencias. Cuando se vio que existía el riesgo de selección de bacterias resistentes en animales que posteriormente pudieran pasar al ser humano la CEE publicó la directiva 70/524 sobre los aditivos en sanidad animal (Torres and Zarazaga, 2002).

En esta directiva se decía que sólo podían utilizarse como promotores aquellos antibióticos que tuvieran un efecto demostrado sobre el crecimiento del animal, que fueran activas frente a bacterias Gram positivas y que no presentaran absorción intestinal para prevenir residuos en la carne. También se eliminaron los antibióticos que se usaran en medicina humana o animal. Así en Europa se prohibió el uso de tetraciclinas o β -lactámicos mientras que en EEUU aún se utilizan (Torres and Zarazaga, 2002).

Este problema obliga ahora a la utilización de antibióticos más complejos y costosos, por lo que se incrementa el gasto en las explotaciones, es decir, que el mal uso que se ha hecho de los antibióticos no sólo ha afectado a problemas de salud directamente, sino también a la economía de las granjas (Cotter *et al.*, 2013).

Los mecanismos que hacen a una bacteria resistente a los antibióticos pueden ser de varios tipos: inactivación del antibiótico por enzimas, por alteraciones de la diana que evitan que el antibiótico pueda unirse al receptor bacteriano, por disminución de la concentración del antibiótico en el interior de la bacteria, tanto por disminución de la

permeabilidad, como por bombeo del antibiótico hacia el exterior. Los cambios en el grado de sensibilidad pueden producirse por mutación, espontánea o inducida, o por transferencia de mecanismos de resistencia desde otras bacterias. En este caso, la resistencia no sólo se transfiere entre bacterias de grupos relacionados (que han evolucionado de antepasados comunes) sino también entre grupos que no están filogenéticamente emparentados (Lapeña, 1999).

En estudios hechos con animales a los que se han administrado antibióticos se observan variaciones de la microbiota: *Barnesiella* spp. prácticamente desaparece, siendo por lo tanto muy sensible a los antibióticos, mientras que *Bacteroides* spp. se convierte en grupo dominante, ya que tiene la habilidad de controlar el medio, interaccionando con el sistema inmune para poder controlar así el crecimiento de otras bacterias. Cuando los animales se recuperan de la administración de un antibiótico, se observa aumento de la diversidad en la microbiota y cambios en los perfiles fecales. La asociación entre microbiota y metabolitos fecales nos da información muy importante sobre la actividad bacteriana, lo cual puede ser importante en el desarrollo y optimización de una base de microbiota como prevención de enfermedades e intervenciones terapéuticas (Zhao *et al.*, 2013).

Actualmente la alta movilidad de personas y animales hace que portadores de cepas patógenas resistentes las diseminen por áreas geográficas muy extensas. La existencia de reservorios de cepas resistentes a antibióticos en poblaciones de bacterias no patógenas constituye también un factor importante de riesgo para el mantenimiento y difusión de diferentes mecanismos de resistencia.

Se hace necesario regular el uso de antibióticos en los animales, sobre todo como prevención si los animales que forman parte de la cadena alimentaria no están enfermos. Para disminuir el uso de antibióticos, se deben mejorar las condiciones higiénicas en las granjas, utilizar vacunas para estimular las defensas específicas, o utilizar otras medidas alternativas.

En algunos países por ejemplo en Dinamarca tras la prohibición del uso no terapéutico de cuatro antibióticos: avoparcina, tilosina, avilamicina y virginamicina, se logró reducir la presencia de bacterias resistentes a estos fármacos en los animales de granja, y a su vez, a otros relacionados con el uso en humanos. (Aarestrup *et al.*, 2001; Torres and Zarazaga, 2002).

Para examinar la evolución del grado de resistencia de diferentes microorganismos, varios países europeos, como Francia, Dinamarca, Francia o España, realizan

estudios, en humanos y en animales, de los niveles de resistencias desde el año 2000 (EUR-Lex-52001DC0333-ES, 2001; Martel *et al.*, 2000). En los últimos años se han creado, en diferentes países de la UE, redes de vigilancia de la resistencia a antibióticos en bacterias de origen animal y humano para poder cuantificar el problema, estudiar su evolución y ver el resultado de las políticas de cada país respecto a este tema. El Comité de Medicamentos Veterinarios (CVMP) de la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos ha elaborado un plan estratégico de gestión del riesgo en el que se presentan propuestas para la contención de la resistencia a antimicrobianos: evaluación de los datos, elaboración de directrices, normalización de los informes, etc. (EUR-Lex-52001DC0333-ES, 2001). En Europa, desde 2006 está prohibida la utilización de antimicrobianos como promotores del crecimiento.

Como he apuntado antes, en EEUU la situación no tiene nada que ver. Actualmente como promotores del crecimiento se usan: penicilina, clortetraciclina, eritromicina, estreptomicina, bacitracina y espectinomicina (antibióticos de uso humano), tilosina y virginamicina (estos son antibióticos que tienen estructuras muy similares a otros de humana), entre otros. En la actualidad se está estudiando la posible prohibición de algunos de ellos (Torres and Zarazaga, 2002). Pero este proceso será largo porque es una tarea voluntaria (Miller *et al.*, 2012).

Otro problema añadido que se presenta es que hasta el 90% de los antibióticos utilizados son excretados por los animales al medio ambiente. Esto puede causar presión de selección de bacterias resistentes en el medio.

Por último, se debe tener en cuenta la resistencia que se puede propagar de forma directa o indirecta a través de los fertilizantes fabricados con residuos animales, a través de los alimentos, del agua... La magnitud del problema es mayor de lo que puede pensarse y no obedece únicamente a los animales que han sido tratados de forma no terapéutica. Actualmente, las muestras positivas en lo que se refiere a residuos es del 1% aproximadamente. Pero dentro de estos resultados positivos, los antibióticos representan el 70% aproximadamente. El importante número de sustancias autorizadas en el mercado con los años, hace necesario que las autoridades competentes, especialmente la EMA y la EFSA, sigan estudiando el problema (EUR-Lex-52001DC0333-ES, 2001).

Por toda esta problemática se ha empezado hace unos años a profundizar en el posible uso de prebióticos y probióticos como medidas alternativas a los antimicrobianos.

El término **prebiótico** fue introducido por Gibson y Roberfroid en 1995, cambiando los términos “pre” que significa “antes de” o “delante de” y “biōtikós” que significa “relativo a la vida”, para referirse a cualquier componente “promotor de vida”: son productos alimenticios no digeribles por el hospedador pero sí fermentables por algunos microorganismos digestivos y que pueden provocar la estimulación del crecimiento o de la actividad de diferentes bacterias que producen efectos beneficiosos para la salud del hospedador (Fotiadis *et al.*, 2008; Gibson and Roberfroid, 1995; Guarner and Malagelada, 2003; Markovic *et al.*, 2009; Quigley, 2010; Tuohy *et al.*, 2003). Generalmente son carbohidratos de cadena corta que permiten cambios tanto en la composición como en la actividad de la microbiota, incrementando la salud intestinal (Hedin *et al.*, 2007). Afectan al hospedador estimulando selectivamente el crecimiento y la actividad de una o varias bacterias del colon (Kaur *et al.*, 2009).

Para que un alimento se pueda considerar un prebiótico debe cumplir diferentes condiciones: (Gibson and Roberfroid, 1995)

- No puede ser hidrolizado ni absorbido en la parte superior del tracto gastrointestinal.
- Debe ser un sustrato selectivo para una o un limitado número de bacterias comensales beneficiosas, que son así estimuladas para crecer o activarse metabólicamente.
- Debe poder alterar la microbiota a favor de una composición saludable.
- Debe inducir efectos en el lumen o sistémicos que resultan beneficiosos para el animal.

Los productos producidos a partir de los prebióticos ayudan a normalizar las bacterias reguladoras del lumen, reducen la actividad proinflamatoria de diferentes metabolitos secundarios y atenúan la inflamación. Además se producen moléculas que inhiben la inflamación de la mucosa intestinal afectando tanto al epitelio como a la función de las células dendríticas. (Hedin *et al.*, 2007).

Una de las primeras definiciones de **probiótico** consideraba al mismo como suplemento alimenticio de microorganismos vivos que produce efectos beneficiosos en

el animal hospedador mejorando el balance de su microbiota intestinal. En realidad actualmente se define como microorganismo vivo, cuya ingestión en cierto número produce efectos beneficiosos no inherentes a la nutrición normal (FAO/WHO, 2002; Fotiadis *et al.*, 2008; Gorbach, 2002; Guarner and Malagelada, 2003; Isolauri *et al.*, 2004; Nomoto, 2005; Quigley, 2008; Tuohy *et al.*, 2003). Para ser considerado como probiótico, el microorganismo necesita sobrevivir, y multiplicarse, en el tracto gastrointestinal, por lo que debe adaptarse al medio ácido y a las sales biliares (van de Guchte *et al.*, 2012).

Tanto animales como humanos pueden beneficiarse de la ingesta de probióticos con la comida o como suplemento del alimento (van de Guchte *et al.*, 2012). El concepto probiótico es aplicable independientemente del lugar de actuación y la ruta de administración. Puede incluir sitios como cavidad oral, intestino, vagina y piel (Schrezenmeir and Vrese, 2001).

Según la FAO (FAO/WHO, 2002) los aspectos que deben tenerse en cuenta en los probióticos son:

- Conocer el género, la especie y la cepa del microorganismo utilizado.
- Debe estar caracterizado fenotípica y genotípicamente.
- Hacer pruebas *in vitro* y determinar su grado de seguridad y los efectos *in vivo*.

Así, los probióticos son microorganismos vivos, no tóxicos y no patógenos, resistentes a pH bajos, sales biliares, etc., capaces de sobrevivir y multiplicarse en el tracto gastrointestinal. Deben producir algún efecto beneficioso al hospedador y tener condiciones fáciles para su conservación.

En el caso de producción industrial, el proceso que se utilice para la producción no debe alterar las características del producto. Se debe contemplar también que durante el almacenamiento del producto, el probiótico debe mantener su viabilidad y funcionalidad (Saarela *et al.*, 2000).

El término probiótico data de 1965 cuando Lilly y Stillwell lo utilizaron para describir cualquier sustancia o microorganismo que contribuyera al balance intestinal (Lilly and Stillwell, 1965)

A partir de 1987, con la primera publicación de las propiedades de *Lactobacillus GG* (Gorbach y Goldin) y de sus sustancias antibacterianas, se inició la investigación sistemática de los probióticos (Silva *et al.*, 1987). Anteriormente ya se habían estudiado en profundidad los *Lactobacillus*, la producción de lactocidinas (un tipo de bacteriocina) y su efecto sobre diversas especies bacterianas (Barefoot and Klaenhammer, 1984; Vincent *et al.*, 1959). Las bacterias del ácido láctico han sido de gran importancia cultural y económica y han sido ampliamente estudiadas desde la antigüedad, aunque en muchos casos de forma empírica. Carre en 1887 y Metchnikoff en 1907 ya hablan de los beneficios de los productos fermentados de la leche. Es de bien conocida la elaboración de yogures, quesos, salsas, etc., como forma de conservación de lacto-derivados, durante largos periodos de tiempo de almacenamiento, y de mejora de sus propiedades organolépticas. Se vio también el importante papel sobre la microbiota intestinal y su efecto sobre la resistencia a enfermedades (Bohnhoff *et al.*, 1954).

Una de sus acciones importantes está asociada a la mejora de la respuesta inmune del hospedador (Gorbach, 2002; Shenderov, 2011; Tuohy *et al.*, 2003). Hay múltiples estudios dirigidos al análisis del efecto de las bacterias de ácido láctico sobre la protección del sistema inmune del hospedador induciendo la producción de ciertas citoquinas: interferón- γ , TNF- α y otras (Fotiadis *et al.*, 2008; Maldonado *et al.*, 2007; Tuohy *et al.*, 2003)

Hay estudios en pollos, que utilizan probióticos como tratamiento profiláctico contra la cojera sin utilizar antibióticos. Se han probado dos probióticos: uno que contiene una mezcla de *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium animalis*, *Pedococcus acidilactici* y *Lactobacillus reuteri* (Biomim probiotic Poultry Star) y otro con sólo una cepa de *Enterococcus faecium* (Biomim IMBO). En ambos casos con resultados positivos (Wideman *et al.*, 2012).

En otros estudios con animales se ha visto la capacidad del organismo probiótico de modular el peso corporal y el contenido y composición de la grasa corporal (Wall *et al.*, 2009).

Se han hecho estudios en humanos y animales del efecto de los prebióticos y probióticos sobre la inflamación intestinal (IBD), con resultados contradictorios. Hay una gran variedad de tratamientos de probióticos, prebióticos y de ambos a la vez, pero en unos casos, es decir en unas enfermedades como por ejemplo la inflamación

intestinal, los resultados son positivos y en otros, como la enfermedad de Crohn, no tanto (Hedin *et al.*, 2007).

En una serie de enfermedades parece claro el mecanismo de acción: problemas intestinales, alergias, infecciones del tracto urinario, pero hay otras en las que se empieza a conocer su papel: reducen el riesgo de osteoporosis, obesidad, diabetes tipo 2 (Isolauri *et al.*, 2004; Kaur *et al.*, 2009; Quigley, 2010, 2008).

En medicina humana se está estudiando la supresión de tumores mediante probióticos, por el incremento que producen en la respuesta inmune haciendo que el tumor desaparezca o se reduzca de tamaño. Hay también numerosos estudios con *Lactobacillus casei*, sobre modelos animales, en los que se ha demostrado que tiene un efecto antitumoral y anti metastásico (Fotiadis *et al.*, 2008; Saarela *et al.*, 2000).

La posibilidad de introducir genes concretos en los probióticos, para que produzcan determinados productos, es otro aspecto que abre un campo enorme a la investigación probiótica (Gorbach, 2002).

Al mismo tiempo hay que tener en cuenta que el beneficio de los probióticos hay que entenderlos desde un punto de vista más amplio que el efecto de un antibiótico: controla la microbiota intestinal, previene enfermedades, reduce procesos alérgicos interfiere la entrada de microorganismos patógenos y suprime actividades enzimáticas que puedan tener efectos negativos (Gorbach, 2002; Nomoto, 2005).

Para tener efecto sobre la microbiota intestinal, la cepa de probiótico debe tener acción antagonista contra otras bacterias intestinales, bien mediante sustancias antimicrobianas producidas por él, bien por exclusión competitiva (compitiendo por los receptores de colonización o por los sustratos esenciales para el crecimiento). Inicialmente se consideró que las bacteriocinas producidas por microorganismos probióticos sólo afectaban a la misma especie o especies próximas. Actualmente se ha visto que metabolitos secundarios, de bajo peso molecular, actúan contra otras especies como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. o *Clostridium* spp. (Saarela *et al.*, 2000).

Las bacterias intestinales han desarrollado una serie de adaptaciones para poder vivir en este ambiente tan competitivo, por ejemplo mecanismos para evitar o modular la respuesta inflamatoria. Considerando el tamaño del intestino y la cantidad de bacterias presentes, la relación entre ellas es de verdadera importancia (Quigley, 2010).

Estas bacterias pueden influir en el fenotipo del individuo como resultado de la producción de diferentes metabolitos (Shenderov, 2011).

Los probióticos deben conferir beneficios al hospedador. Estos beneficios pueden ser directos o indirectos, y específicos o no específicos. Hay algunos puntos y condiciones que se deben tener en cuenta para conseguir efectos beneficiosos en el hospedador:

- Tipo de microorganismo (especie, cepa, genoma, lugar de aislamiento).
- Genotipo del hospedador.
- Características específicas de la bacteria probiótica (metabolitos secundarios, competencia con otras bacterias, interacción con el sistema inmunológico...)
- Ruta y frecuencia de administración.
- Dosis.
- Viabilidad del preparado probiótico.
- Estado de salud del hospedador.
- Condiciones físico-químicas del intestino.
- Resistencias a antibióticos.

A pesar de lo mencionado, todavía no se conoce bien el patrón de actuación de los probióticos. En muchos casos resulta difícil entender como con la administración diaria de cantidades muy pequeñas de probiótico se puede conseguir un efecto tan significativo en las funciones fisiológicas y reacciones metabólicas del animal, cuyo contenido en microorganismos intestinales es enorme. La producción de ciertos metabolitos por parte del probiótico nos puede ayudar a entender su mecanismo de acción (Shenderov, 2011).

Para explicar la acción de los probióticos debemos considerar que se trata de un proceso multifactorial (Kaur *et al.*, 2009; Quigley, 2010, 2008; Tuohy *et al.*, 2003):

1- Puede producirse competición por el receptor. El probiótico compite con el patógeno por un número limitado de receptores que se encuentran en la superficie de la mucosa intestinal (O'Hara and Shanahan, 2007; Saarela *et al.*, 2000).

2- Los probióticos producen compuestos: ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas..., que pueden tener acción antagónica contra patógenos. Por ejemplo, este acúmulo de productos pueden producir una bajada de pH en el medio, que impide el crecimiento de los microorganismos no deseados (este es el mecanismo de acción de *Lactobacillus*) (O'Hara and Shanahan, 2007; Vesterlund *et al.*, 2005)

3- Se induce la secreción de mucina, de manera que puede interferir la adhesión de los patógenos a la mucosa intestinal y modular la respuesta inmune (Vesterlund *et al.*, 2005).

4- Puede haber competición por los nutrientes en el tracto intestinal (Gibson and Roberfroid, 1995; Vesterlund *et al.*, 2005).

5- Los probióticos pueden también modificar diferentes toxinas, reduciendo los efectos negativos producidos por las mismas (O'Hara and Shanahan, 2007).

6- Estimulan el sistema inmune no específico del hospedador. Se ha visto que estimulan la producción de IFN- γ e interleucinas, especialmente de IL-2, IL-12 y IL-18 (Fasano and Shea-Donohue, 2005; Rook and Brunet, 2005).

7- Los probióticos estabilizan la barrera intestinal, restringiendo así la translocación de patógenos, eliminando antígenos extraños que hayan penetrado en la mucosa y regulando la respuesta inmune frente a antígenos específicos (Fasano and Shea-Donohue, 2005).

8- Las bacterias probióticas son una pieza clave en la maduración del tejido linfoide asociado al intestino y del mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune asociado a mucosas, no sólo la digestiva, y del sistema inmune general (Fasano and Shea-Donohue, 2005).

No obstante el listado anterior, no todos los probióticos cumplen con todas las características: unos actúan fundamentalmente produciendo péptidos antibacterianos, otros actúan como potentes antiinflamatorios, mientras que otros son, primordialmente, estimulantes del sistema inmune.

En la práctica se administran probióticos, prebióticos, o la combinación de ambos, también conocido como **simbióticos** (Fotiadis *et al.*, 2008; Hedin *et al.*, 2007; Quigley, 2010; Tuohy *et al.*, 2003). Gibson y Roberfroid los definen como mezcla de probióticos y prebióticos que produce beneficios en el hospedador incrementando la supervivencia

e implantación de suplementos dietéticos de microorganismos vivos, estimulando selectivamente el crecimiento o activando el metabolismo de una o unas pocas bacterias promotoras de la salud y aumentando el bienestar del hospedador (Gibson and Roberfroid, 1995); (Tuohy *et al.*, 2003). Puede producir también efecto sobre la velocidad de crecimiento y el índice de conversión de los animales, similar al producido por los antibióticos utilizados como promotores de crecimiento, minimizándose sus efectos secundarios. Con el uso de simbióticos, se puede observar un efecto sinérgico que produce un resultado superior al obtenido al administrarlos por separado. Aunque queda mucho camino por recorrer, el uso de probióticos y prebióticos parecen ser una alternativa a los promotores de crecimiento, tanto desde el punto de vista patológico, nutricional, productivo o económico (Hooper and Gordon, 2001; Kaur *et al.*, 2009; Markovic *et al.*, 2009; Saarela *et al.*, 2000).

Debido a que el ecosistema del intestino se caracteriza por ser dinámico, y con relaciones recíprocas entre la microbiota, el epitelio y el sistema inmune, los trabajos con cultivos celulares no son apropiados utilizándose, aunque no siempre inferibles, modelos en ratones axénicos, con los que puede estudiarse el impacto de la colonización de diferentes especies bacterianas (Hooper *et al.*, 2001; Stappenbeck *et al.*, 2002). Además, la complejidad del Tracto Gastro Intestinal (TGI) hace que sea muy difícil reproducir el sistema *in vitro*, aunque hay modelos que tratan de simular parte del sistema digestivo, por lo que las pruebas con bacterias *in vivo* son más apropiadas (van de Guchte *et al.*, 2012).

En cuanto al futuro y progreso de los probióticos hay que tener en cuenta diferentes aspectos (Kaur *et al.*, 2009; Nomoto, 2005):

1- Adherencia temporal. Para que produzca un efecto en la microbiota intestinal, el probiótico debería ser capaz de adherirse a la mucosa durante periodos largos de tiempo. Se ha visto en muchos estudios que el probiótico no es capaz de colonizar el sistema digestivo, por lo que hay que administrarlo de forma continua, lo que conlleva un mayor gasto económico (Saarela *et al.*, 2000).

2- Producción de alteraciones en la actividad metabólica. Los *Lactobacillus* por ejemplo intervienen en el metabolismo de los ácidos biliares aunque en este caso no se producen alteraciones fisiológicas remarcables (Henriksson *et al.*, 2005).

3- Transferencia genética. Si se utilizan probióticos con diferentes mecanismos de resistencia, existe el peligro de que haya transferencias de resistencias a antibióticos intra e inter especie (Henriksson *et al.*, 2005; Saarela *et al.*, 2000).

4- Alteraciones del sistema inmune. Estas pueden ser negativas en pacientes con desórdenes autoinmunes, provocando infecciones severas (Saarela *et al.*, 2000).

A pesar de los problemas de dosificación, de la viabilidad del microorganismo utilizado, de la falta de estandarización industrial, y de los potenciales problemas de seguridad, hay un futuro muy prometedor para los probióticos por su gran capacidad para controlar diferentes problemas clínicos, pero para un uso racional se deben conocer mejor los mecanismos de acción (Kaur *et al.*, 2009; Nomoto, 2005).

Hacen falta más estudios a largo plazo para ver con más detalle los resultados que se obtienen tras la administración de los probióticos (Quigley, 2010, 2008). Quedan pendientes cuestiones, como la identificación de marcadores moleculares de cepas específicas que favorezcan la salud, que una vez resueltas pueden servir para seleccionar, de forma no empírica, nuevos probióticos y adquirir conocimientos sobre sus mecanismos de acción y los efectos producidos (van de Guchte *et al.*, 2012).

Es muy importante tener en cuenta las variaciones que hay entre diferentes cepas de una misma especie bacteriana con capacidad probiótica, respecto a la seguridad y a los efectos de las mismas en el hospedador (Nomoto, 2005; O'Hara and Shanahan, 2007; Tuohy *et al.*, 2003). Diferentes cepas de la misma especie pueden tener diferencias significativas en adherencia, efectos inmunológicos específicos e incluso efectos sobre la salud del hospedador (Isolauri *et al.*, 2004).

En un principio se pensó que una mezcla de varios probióticos produciría un efecto amplificado, pero hay que tener en cuenta que algunas combinaciones pueden tener, en algunos casos, efectos antagónicos en lugar de sinérgicos (Quigley, 2010). Lo anterior, junto a las dificultades para el registro de probióticos complejos, hace que las empresas se centren prioritariamente en productos con uno o dos microorganismos.

Hasta ahora los probióticos han estado más relacionados con la alimentación que con la salud, pero esta situación tanto en Europa como en EEUU está empezando a cambiar y sus agencias reguladoras están empezando a controlar los productos. La EFSA (*European Food Safety Authority*) ha publicado un estudio de QPS (*Qualified presumption of safety of microorganisms in food and feed*) en el que se concluye que la designación QPS puede ser aplicada únicamente a microorganismos identificados a nivel de cepa y que tenga un largo historial de aparente seguridad (EFSA, 2004).

4. BACTEROIDES

Los *Bacteroides* constituyen uno de los géneros más importantes y abundantes del sistema digestivo de muchos mamíferos.

Los *Bacteroides* aislados más frecuentemente son de las especies pertenecientes al grupo de *Bacteroides fragilis*, y que son, a parte del propio *B. fragilis*, *Bacteroides eggerthii*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides uniformis* y *Bacteroides vulgatus*. Se han hecho muchos estudios de este grupo y se ha visto que tiene una enorme variabilidad genética (Miranda *et al.*, 2013; Salyers, 1984).

Los miembros del género *Bacteroides* se han adaptado al intestino de los mamíferos (Karlsson *et al.*, 2011). Proliferan donde el tránsito intestinal es más lento y la energía obtenida por la alimentación del hospedador es suficiente para permitir una fermentación anaeróbica. Otros anaerobios facultativos de la microbiota intestinal, así como los microaerófilos, son capaces de utilizar el oxígeno que entra con la ingesta y que se filtra a través de la mucosa intestinal, reduciendo así la tensión de oxígeno para permitir el crecimiento de anaerobios estrictos como *Bacteroides*.

Aunque algunas especies de *Bacteroides* colonizan el intestino a los dos días de vida en el caso de los conejos (Kovacs *et al.*, 2006), en la mayoría de estudios hechos con ratones libres de bacterias, *B. thetaiotaomicron* es capaz de colonizar el intestino en el momento del destete (Eckburg *et al.*, 2005; Hooper *et al.*, 2001; O'Hara and Shanahan, 2007; Shanahan, 2002; Stappenbeck *et al.*, 2002),

B. thetaiotaomicron puede inducir la expresión de la α 1,2-flucosiltransferasa en el epitelio intestinal de estos ratones dando como resultado en la superficie glicoconjugados fucosilados que pueden influir en la diferenciación de células M del GALT. Estas células del sistema inmune sirven para interaccionar con bacterias capaces de internalizarse en el hospedador (Bry *et al.*, 1996),

B. fragilis es uno de los patógenos oportunistas más importantes del género *Bacteroides*. Sus factores de virulencia más importantes son la enterotoxina *bft* y el polisacárido capsular PSA (Ulsemer *et al.*, 2012). Cuando los animales se colonizan con *B. fragilis*, el polisacárido PSA, dirige la maduración física y celular del desarrollo del sistema inmune. La PSA producida por las bacterias intestinales es presentada por las células dendríticas a las células T, con la consecuente señal, activación inmune, y producción de citoquinas. El complejo polisacárido capsular de *B. fragilis* está compuesto por al menos 4 polisacáridos capsulares distintos: PSA, PSB, PSC, y PSD,

que tienen características zwitterónicas (Mazmanian *et al.*, 2005). Los polisacáridos zwitterónicos (ZPSs) son los únicos antígenos células-T dependientes que intervienen en la proliferación de Linfocitos T CD4⁺ *in vitro* (Brubaker *et al.*, 1999; Sommese *et al.*, 2012)

Se ha visto también que la inoculación única de *B. thetaiotaomicron* a ratones libres de bacterias, produce inducción de la angiogénesis y producción de proteínas por parte del hospedador (Hooper and Gordon, 2001; Stappenbeck *et al.*, 2002).

Más del 50% de los polisacáridos de origen vegetal ingeridos por el hospedador son degradados en el colon. Muchas especies de *Bacteroides* intervienen en este proceso aunque también utilizan azúcares solubles para obtener energía. Fruto de esta utilización pueden producirse compuestos tóxicos para otras bacterias, por ejemplo para *E. coli* (Flint, 1999; Tuohy *et al.*, 2003).

Los *Bacteroides*, no sólo los encontramos en el colon, sino que también colonizan cavidad oral, tracto respiratorio superior y tracto genital femenino (Eitel *et al.*, 2013). Se ha visto que algunos *Bacteroides*, como *B. vulgatus*, *B. thetaiotaomicron* y *B. ovatus*, pueden producir cápsulas pero no hay correlación entre estas cápsulas y problemas en el hospedador. No obstante, hay cepas de *Bacteroides* encapsuladas que son resistentes a bacteriófagos (Salyers, 1984). La cápsula producida por *B. fragilis* está compuesta por dos polisacáridos. Esta cápsula es el mayor factor de virulencia que interviene en la formación de abscesos; además una neuraminidasa de *B. fragilis* actúa como factor de crecimiento y hace que el tamaño de la cápsula sea mayor (Mundy and Sears, 1996).

La especie humana no puede ser infectada por *Bacteroides* a través del consumo de carne infectada, debido a su propiedad de anaerobiosis estricta. Este dato puede ser importante de cara a la bioseguridad de los *Bacteroides* como posibles probióticos.

Se ha visto un incremento de resistencias en *Bacteroides* a antibióticos tanto en Europa como en EUA. En el grupo de *B. fragilis* hay expansión de las resistencias de tipo horizontal, por genes de resistencias transferibles por conjugación, por plásmidos movilizables y también a través de transposones conjugativos (Eitel *et al.*, 2013).

El poder conocer genes de resistencias de bacterias anaeróbicas puede resultar útil en tratamientos y así poder preservar ciertos antibióticos para ocasiones que realmente lo requieran (Miranda *et al.*, 2013). Además, la ausencia de marcadores de resistencia movilizables, es uno de los requisitos de la EFSA (Agencia Europea de Seguridad

Alimentaria) para los probióticos. Los *Bacteroides* son intrínsecamente resistentes a los antibióticos de la familia de los aminoglicósidos porque no pueden atravesar la membrana protoplasmática en condiciones anaeróbicas. (Lapeña, 1999) Muchos son resistentes a antibióticos β -lactámicos: el gen *cepA* codifica la proteína β -lactamasa que hidroliza la mayoría de cefalosporinas y penicilinas. (Eitel *et al.*, 2013)

Es importante poder detectar cambios de la susceptibilidad de las bacterias con el paso del tiempo sobre todo de carbapenems: el gen *cfIA* puede expresarse en varios grados o permanecer silente por lo que se obtiene gran variedad en el espectro de sensibilidad/resistencia. Una secuencia de inserción (IS) en el gen *cfIA* puede producir incremento en su expresión. (Eitel *et al.*, 2013)

En cuanto al metronidazol, los *Bacteroides* son generalmente sensibles excepto algún grupo de cepas de origen africano. (Eitel *et al.*, 2013; Justesen *et al.*, 2013)

La clindamicina es un antibiótico utilizado por muchos clínicos frente a infecciones de anaeróbicos, lo que está provocando un incremento en las resistencias de anaerobios. En esta resistencia intervienen los genes *ermB*, *ermF* y *ermG*, junto a bombas de flujo. (Eitel *et al.*, 2013; Justesen *et al.*, 2013).

En la resistencia a tetraciclinas suelen ir asociados los genes *ermF* y *tetQ* en transposones conjugativos. Los genes *tetQ*, *tetM* y *tet36* protegen los ribosomas de las bacterias de la tetraciclina. (Eitel *et al.*, 2013)

Generalmente, los *Bacteroides* son resistentes a la 1ª y 2ª generación de quinolonas, pero son sensibles a las de 3ª y 4ª generación (Eitel *et al.*, 2013).

Los *Bacteroides* son capaces de producir bacteriocinas. La producción de bacteriocinas fue observada por primera vez en 1925 por Andre Gratia en un estudio que hizo con dos cepas de *E. coli* (Gillor *et al.*, 2008). Las bacteriocinas son proteínas o péptidos, o incluso proteínas complejas con lípidos y carbohidratos, producidas por algunas bacterias y que poseen actividad antimicrobiana, lítica o inhibidora del crecimiento, frente a grupos bacterianos estrechamente relacionados con los que las producen (Avelar *et al.*, 1999).

Hay bastantes estudios sobre bacteriocinas en organismos aeróbicos o anaerobios facultativos, pero en anaerobios hay pocos debido a la dificultad que representa su estudio (Southern *et al.*, 1984).

En diferentes estudios se ha visto que las cepas de *B. fragilis* aisladas de infecciones intestinales eran altamente productoras y menos susceptibles a diferentes bacteriocinas que otras cepas. Por otro lado, cepas de *B. fragilis* aisladas de infecciones abdominales y bacteriemias, no producen bacteriocinas, pero en cambio son muy sensibles a las sustancias producidas por otras bacterias. Algunas cepas de *B. fragilis* de diferentes orígenes son productoras de nivel medio y también susceptibles a otras bacteriocinas (Avelar *et al.*, 1999).

Las bacteriocinas de *Bacteroides* permanecen activas calentando hasta 60°C durante 20 min, pero pierden actividad a 100°C durante 30 min y después de autoclavar; únicamente un 3% de ellas son estables a esas temperaturas (Mossie *et al.*, 1979). Las bacteriocinas permanecen estables en un amplio rango de pH, pero pierden la actividad a pH inferiores a 4. Son también inactivadas por tripsina y pronasa (Avelar *et al.*, 1999; Booth *et al.*, 1977; Southern *et al.*, 1984).

Se ha observado que en el colon conviven cepas de *Bacteroides* productoras y no productoras de bacteriocinas (Booth *et al.*, 1977).

Se sabe también que las bacteriocinas son expulsadas al medio durante la fase logarítmica de crecimiento, y que cesa al llegar a la fase estacionaria (Booth *et al.*, 1977).

El hecho de que tengan una potencia significativa, que actúen tanto sobre bacterias tanto cercanas como lejanas, filogenéticamente hablando, y que sean tan estables, les confiere el papel de sustitutas de muchos antibióticos. Pueden actuar contra patógenos sin alterar de forma negativa a las poblaciones comensales (Cotter *et al.*, 2013).

El uso de bacteriocinas puede representar una alternativa viable al uso de ciertos antibióticos. Esto incluye potencia, baja toxicidad, espectro bacteriano más o menos amplio, y la posibilidad de producirlos *in situ* a través de probióticos (Cotter *et al.*, 2013).

Las bacteriocinas tienen diferentes mecanismos de acción que a su vez son diferentes al modo de actuación de los antibióticos. Estos mecanismos se pueden dividir entre los que actúan a nivel de la pared celular y los que actúan dentro de las células:

- A nivel de la pared actúan sobre la síntesis del lípido II del peptidoglicano de la pared (patógenos Gram positivos). Este mismo lípido alterado puede provocar poros en la membrana celular haciendo que la célula se muera por lisis.

- Otras bacteriocinas también producen daños en la membrana y forman poros a través de los cuales se introducen en la bacteria.

- Se ha visto también que alguna bacteriocina afecta a la producción de un enzima (fosfolipasa A2) inhibiendo su producción. (Cotter *et al.*, 2013)

- Dentro de la célula, inhibe la expresión génica y la producción de proteínas, interfiriendo en el metabolismo bacteriano (Cotter *et al.*, 2013). Se ha visto que inhibe la síntesis de RNA inhibiendo la actividad de la RNA polimerasa (Mossie *et al.*, 1981).

Las bacteriocinas de *Bacteroides* inhiben la síntesis del RNA y, consecuentemente, la inhibición de síntesis de proteínas. Hay inactivación de la RNA polimerasa. Sin embargo no hay efectos en la síntesis del DNA ni en los niveles de ATP intracelular (Mossie *et al.*, 1979).

En general parece que las bacteriocinas de *Bacteroides* son muy parecidas y actúan de forma similar, pero siempre hay excepciones. Por ejemplo, *Bacteroides melaninogenicus* produce una bacteriocina, denominada melaninocina, que es muy lábil al calor y es destruida durante la digestión por varios enzimas proteolíticos. Su peso molecular es muy elevado. Este *Bacteroides* forma parte de la microbiota de la boca pero parece también el responsables de problemas de gingivitis y periodontitis (Nakamura *et al.*, 1981).

Los estudios realizados con *Bacteroides* y sus bacteriocinas han sido y son difíciles de realizar porque no hay un método de clasificación fácil y claro de las bacteriocinas (Riley and Mee, 1982).

En un principio parecía que los *Bacteroides*, como parte de la microbiota saprófita de los animales, eran siempre beneficiosos. Sin embargo, en 1984 se describió un nuevo factor de virulencia: una enterotoxina (ETBF) asociada a trastornos digestivos (Avila-Campos *et al.*, 2007). Los factores de virulencia de mayor importancia de *B. fragilis*, a parte de la enterotoxina, son: la cápsula, el lipopolisacárido (LPS), algunas proteínas de la membrana externa (Vandesompele *et al.*), los pili y los ácidos grasos de cadena corta (Luczak *et al.*, 2001).

Aproximadamente entre el 4-30% de individuos sanos, sin ningún tipo de síntomas, tienen *Bacteroides* que secretan una metaloproteasa zinc-dependiente de 20-kDa, llamada fragilisina o toxina de *B. fragilis*. Un enzima que se destruye con el calor. Existen tres isoformas de esta toxina: *bft-1*, *bft-2*, y *bft-3*, y la diferencia entre ellas parece estar en la potencia de su actividad. Provocan una acumulación intestinal de líquido, una disrupción de la barrera epitelial y proliferación de células epiteliales (Mundy and Sears, 1996; Nakano *et al.*, 2007; Shetab *et al.*, 1998; Yim *et al.*, 2013). La enterotoxina de *B. fragilis* está asociada a diarreas en granjas y en niños. Sería interesante conocer si la variación de los genes *bft* produce una variación en el efecto de la enterotoxina (Nakano *et al.*, 2007).

En estudios *in vitro* provoca efecto citotóxico en células HT-29 (Shetab *et al.*, 1998).

Según algunos estudios, la toxina puede funcionar tanto dentro como fuera del lumen intestinal. La enterotoxina produce daños importantes en la mucosa intestinal. Sin embargo faltan estudios para conocer su papel patogénico (Pantosti *et al.*, 1997). Sin embargo, parece que la fragilisina tiene cierto papel en el cancer colorectal al estimular la producción de interleuquina-8 por parte de las células epiteliales del intestino, provocando una respuesta inflamatoria y un aumento de la secreción intestinal. Parece también que provoca una proliferación de células epiteliales en el colon (Wu *et al.*, 2013).

Actualmente varios grupos están poniendo a punto una serie de técnicas para determinar la presencia de la enterotoxina y diferenciar cepas enterotoxigénicas de no enterotoxigénicas (Pantosti *et al.*, 1997; Shetab *et al.*, 1998) y también para diferenciar los diferentes subtipos del gen *bft*, incluyendo una PCR multiplex (Avila-Campos *et al.*, 2007). La composición de su lipopolisacárido es diferente al de otros Gram negativos. Esta diferencia está asociada a infecciones menos tóxicas que las de otras bacterias entéricas: tiene promotores diferentes en estructura al del resto de bacterias cercanas, por ejemplo *E. coli*, lo que hace que no puedan expresar genes de otros Gram negativos (Flint, 1999; Salyers, 1984; Wegmann *et al.*, 2013).

OBJETIVOS

El aumento sistemático de la tasa de resistencias en bacterias que afectan a la producción animal, junto a la restricción del uso de antimicrobianos que se está planteando por la exigencia del denominado uso prudente o racional de antibióticos, fuerza a encontrar alternativas prácticas que potencien la salud y el bienestar de los animales de granja y, al mismo tiempo, resulten compatibles con el balance económico de las explotaciones.

Por ello en esta Tesis se ha planteado como objetivo primordial:

- La selección de cepas de *Bacteroides* spp. que puedan tener características probióticas para conejos.

Para cumplir con este objetivo primordial se han planteado dos objetivos secundarios:

- Examinar diferentes características positivas y negativas *in vitro* que permitan ayudar a la preselección de cepas de *Bacteroides* spp con potencial probiótico.
- Examinar el efecto *in vivo* de las cepas de *Bacteroides* spp., preseleccionadas por su potencial probiótico *in vitro*, sobre diferentes parámetros microbiológicos y del sistema inmunitario asociado a la mucosa intestinal que permitan establecer el posible efecto positivo sobre salud de los conejos de granja.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MÉTODOS PARA LA DIFERENCIACIÓN DE CEPAS DE *Bacteroides* spp. *in vitro*

Para obtener un producto probiótico uno de los elementos más importantes es la selección de la cepa o cepas que se incluirán en él.

Se necesita escoger una especie adecuada y métodos que muestren las diferencias entre cepas de la misma especie para ver cuáles son las más útiles.

Después de ciertos resultados previos y de comprobar en la bibliografía la importancia de la especie *Bacteroides* como promotor de la salud intestinal empezamos por examinar todos los *Bacteroides* incluidos en nuestro cepario: 172 de diferentes especies. De ellas seleccionamos 97 para empezar a estudiar sus características. Todas las cepas fueron aisladas de muestras intestinales de conejos de diferentes granjas con y sin problemas digestivos.

Tabla 7: Cepas de *Bacteroides* utilizadas en las primeras pruebas del estudio

Nº	Cepa	Especie	Nº	Cepa	Especie	Nº	Cepa	Especie
1	CV-0001	<i>B.fragilis</i>	34	CV-0277	<i>B.thetaiotaomicron</i>	67	CV-0363	<i>B.acidifaciens</i>
2	CV-0125	<i>B.thetaiotaomicron</i>	35	CV-0278	<i>B.vulgatus</i>	68	CV-0365	<i>B.acidifaciens</i>
3	CV-0126	<i>B.vulgatus</i>	36	CV-0293	<i>B.fragilis</i>	69	CV-0367	<i>B.acidifaciens</i>
4	CV-0129	<i>B.thetaiotaomicron</i>	37	CV-0294	<i>B.fragilis</i>	70	CV-0368	<i>B.acidifaciens</i>
5	CV-0130	<i>B.thetaiotaomicron</i>	38	CV-0295	<i>B.fragilis</i>	71	CV-0369	<i>B.acidifaciens</i>
6	CV-0131	<i>B.fragilis</i>	39	CV-0305	<i>B.thetaiotaomicron</i>	72	CV-0370	<i>B.acidifaciens</i>
7	CV-0183	<i>B.dorei</i>	40	CV-0307	<i>B.thetaiotaomicron</i>	73	CV-0371	<i>B.acidifaciens</i>
8	CV-0184	<i>B.dorei</i>	41	CV-0308	<i>B.thetaiotaomicron</i>	74	CV-0372	<i>B.acidifaciens</i>
9	CV-0185	<i>B.fragilis</i>	42	CV-0309	<i>B.thetaiotaomicron</i>	75	CV-0373	<i>B.acidifaciens</i>
10	CV-0222	<i>B.vulgatus</i>	43	CV-0310	<i>B.fragilis</i>	76	CV-0374	<i>B.acidifaciens</i>
11	CV-0225	<i>B.thetaiotaomicron</i>	44	CV-0315	<i>B.fragilis</i>	77	CV-0375	<i>B.acidifaciens</i>
12	CV-0227	<i>B.thetaiotaomicron</i>	45	CV-0317	<i>B.thetaiotaomicron</i>	78	CV-0376	<i>B.acidifaciens</i>
13	CV-0228	<i>B.thetaiotaomicron</i>	46	CV-0323	<i>B.fragilis</i>	79	CV-0377	<i>B.fragilis</i>
14	CV-0229	<i>B.xylanisolvens</i>	47	CV-0324	<i>B.fragilis</i>	80	CV-0378	<i>B.fragilis</i>
15	CV-0230	<i>B.thetaiotaomicron</i>	48	CV-0325	<i>B.fragilis</i>	81	CV-0379	<i>B.vulgatus</i>
16	CV-0231	<i>B.xylanisolvens</i>	49	CV-0332	<i>B.thetaiotaomicron</i>	82	CV-0380	<i>B.acidifaciens</i>
17	CV-0232	<i>B.fragilis</i>	50	CV-0333	<i>B.thetaiotaomicron</i>	83	CV-0384	<i>B.thetaiotaomicron</i>
18	CV-0234	<i>B.intestinalis</i>	51	CV-0335	<i>B.thetaiotaomicron</i>	84	CV-0389	<i>B.fragilis</i>
19	CV-0235	<i>B.thetaiotaomicron</i>	52	CV-0336	<i>B.thetaiotaomicron</i>	85	CV-0390	<i>B.acidifaciens</i>
20	CV-0263	<i>B.fragilis</i>	53	CV-0337	<i>B.thetaiotaomicron</i>	86	CV-0391	<i>B.fragilis</i>
21	CV-0264	<i>B.fragilis</i>	54	CV-0339	<i>B.thetaiotaomicron</i>	87	CV-0392	<i>B.fragilis</i>
22	CV-0265	<i>B.fragilis</i>	55	CV-0340	<i>B.thetaiotaomicron</i>	88	CV-0393	<i>B.fragilis</i>
23	CV-0266	<i>B.thetaiotaomicron</i>	56	CV-0341	<i>B.thetaiotaomicron</i>	89	CV-0394	<i>B.acidifaciens</i>
24	CV-0267	<i>B.thetaiotaomicron</i>	57	CV-0342	<i>B.thetaiotaomicron</i>	90	CV-0395	<i>B.fragilis</i>
25	CV-0268	<i>B.thetaiotaomicron</i>	58	CV-0345	<i>B.vulgatus</i>	91	CV-0396	<i>B.fragilis</i>
26	CV-0269	<i>B.fragilis</i>	59	CV-0348	<i>B.acidifaciens</i>	92	CV-0464	<i>B.acidifaciens</i>
27	CV-0270	<i>B.xylanisolvens</i>	60	CV-0349	<i>B.acidifaciens</i>	93	CV-0466	<i>B.fluxus</i>
28	CV-0271	<i>B.fragilis</i>	61	CV-0350	<i>B.acidifaciens</i>	94	CV-0586	<i>B.fragilis</i>
29	CV-0272	<i>B.fragilis</i>	62	CV-0351	<i>B.acidifaciens</i>	95	CV-0587	<i>B.fragilis</i>
30	CV-0273	<i>B.massiliensis</i>	63	CV-0352	<i>B.acidifaciens</i>	96	CV-0606	<i>B.fragilis</i>
31	CV-0274	<i>B.massiliensis</i>	64	CV-0357	<i>B.acidifaciens</i>	97	CV-0607	<i>B.acidifaciens</i>
32	CV-0275	<i>B.thetaiotaomicron</i>	65	CV-0360	<i>B.acidifaciens</i>			
33	CV-0276	<i>B.thetaiotaomicron</i>	66	CV-0361	<i>B.acidifaciens</i>			

Estas cepas se fueron cribando, en función de diferentes características, con el fin de seleccionar un número reducido que pudiera servir para el desarrollo de un producto probiótico para su uso en granja.

1.1. Crecimiento de los *Bacteroides*

El medio de cultivo utilizado para hacer crecer los *Bacteroides* tras la descongelación hasta hacer las pruebas necesarias fue el Agar Columbia +5% sangre de cordero — AS— (bioMerieux, 43041).

Los *Bacteroides* crecen bien tras 24-48h a 37°C en condiciones anaeróbicas.

Para crear la atmósfera anaerobia se utilizaron jarras de anaerobios (bioMerieux) con sobres (bioMerieux, 96124) e indicadores de anaerobiosis (bioMerieux, 96118).

1.2. Análisis de la producción de sustancias inhibitorias del crecimiento bacteriano

Para el análisis de la producción de sustancias inhibitorias del crecimiento bacteriano se utilizó *Brain Hearth Infusion* —BHI— (VWR, 1.10493.0500) suplementado (tanto en caldo como en agar), en condiciones de anaerobiosis a 37°C (BHIS)

BHI-suplementado (BHIS): Brain Hearth Infusion (BHI) (VWR, 1.10493.0500)

+ 0,0005% hemina (Sigma, H5533)

+ 0,002% menadiona (Sigma, M5750)

+ 0,5% extracto de levadura (Gibco, 18180-059)

+ 1,5% agar (Difco, 214010), en el caso de medio sólido

El suplemento de hemina + menadiona (Vitamina K) se añade al medio puesto que algunos anaerobios estrictos, como *Bacteroides spp.*, lo requieren para un mejor crecimiento.

Para ver la producción de bacteriocinas utilizamos inicialmente la técnica de Riley y Mee (Riley and Mee, 1981):

- ✓ En una placa de agar BHIS se pone un filtro de 90 mm de diámetro de 0.22 µm de tamaño de poro (Millipore, GSWP 09000).
- ✓ Gotas de 20 µL de cultivos anaeróbicos de 24h en caldo BHIS de diferentes cepas de *Bacteroides* se inoculan encima del filtro.

- ✓ Después de incubar a 37°C durante 48h en jarra de anaerobios, el filtro se saca y se cubre toda la superficie de la placa con 1 mL del cultivo de 18-24h de la bacteria diana, ajustado a la concentración del 1 McFarland (3×10^8 UFC/ml).
- ✓ El exceso de líquido se retira y las placas se dejan secar, en la cabina de flujo laminar, durante 2-3 minutos.
- ✓ Tras la incubación, durante 18-24h, en jarra de anaerobios se examinan las zonas de inhibición del crecimiento de la bacteria diana asociada a cada gota de las cepas de *Bacteroides* a analizar.

Ante las dificultades de interpretación del método anterior, cambiamos la técnica y pasamos a utilizar la técnica de doble agar, con agar BHIS para el crecimiento de la cepa diana y agar BHI semisólido sin suplementar inoculado con la cepa de *Bacteroides* a examinar:

- ✓ Las cepas de *Bacteroides* a probar se hacen crecer en anaerobiosis a 37°C en AS (bioMerieux, 43041) durante 24h para tener los cultivos frescos.
- ✓ Placas de agar BHIS se siembran con hisopo, a partir de una suspensión ajustada a la concentración del 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml) de la cepa que actuará como diana, para obtener cultivo confluyente.
- ✓ Inmediatamente después se añaden 10mL de agar BHI semisólido (0,5% agar) sin suplementar con *Bacteroides* a la concentración de 10^3 UFC/placa de la cepa de *Bacteroides* a examinar.
- ✓ Las placas se incuban en anaerobiosis durante 48h a 37°C (Mossie *et al.*, 1979).
- ✓ Transcurrido este tiempo se observan las placas para ver la presencia de zonas de inhibición del crecimiento de la bacteria diana.

Para ajustar las concentraciones bacterianas utilizamos un fotocolorímetro que mide la transmitancia a 450nm (bioMerieux).

La utilización de agar BHI semisólido no suplementado, como soporte de las cepas a examinar su capacidad de producir sustancias inhibitorias del crecimiento de otras bacterias, se hizo para favorecer la expresión de los genes implicados en la producción de inhibidores, ya que muchas veces estos genes se inducen en las fases de dificultad de crecimiento de las bacterias.

1.3. Estudio de proteínas de superficie

1.3.1. Presencia del gen que codifica para la PSA

Para este análisis realizamos la amplificación del gen estructural del PSA (polisacárido A) por PCR convencional. Primero realizamos el estudio sobre las cepas de *B. fragilis* y después analizamos cepas de otras especies de *Bacteroides*.

Para la extracción de DNA utilizamos la matriz Chelex de Bio-Rad (InstaGene Matrix, 732-6030). Es una extracción rápida en la que es suficiente hervir la muestra con la matriz, que absorbe los productos resultantes de la lisis que pueden interferir en la amplificación posterior. Se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante. El DNA se guarda congelado a -20°C hasta su uso.

Para la amplificación por PCR se diseñaron los cebadores de la Tabla 8.

Tabla 8: Cebadores diseñados por I. Badiola para detectar la presencia del gen de la PSA en *Bacteroides*.

Nombre	Secuencia	Amplicón
Bfra-PSA-F	AATGTGCCTTACCTTTGTGTTTAT	148 pb
Bfra-PSA-R	AGAGGTTACTTTCGGGTGC	

El volumen de PCR utilizado fue de 25 µl finales con la siguiente composición:

- 16 µl Master Mix (AmpliTaq Gold PCR Master Mix, Life Technologies, 43270586).
- 2,5 µl Tween 20 (1/00) (Sigma, P9416)
- 2 µl Cebador F (Sigma Genosys)
- 2 µl Cebador R (Sigma Genosys)
- 2.5µl DNA

El termociclador utilizado fue el Gene Amp PCR System 9700 de Applied Biosystems. El programa utilizado fue: 94°C durante 4 min, 35 ciclos de 94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min y 72°C 1,15 min, seguido de 1 ciclo final a 72°C durante 15 min y finalización de la reacción de amplificación por descenso de la temperatura a 4°C.

Los productos de PCR se corrieron después en geles de agarosa (Sigma A2790) al 2% con buffer tris EDTA- borato (Sigma, T4415) más bromuro de etidio (Sigma,

E8751) al 0,05%, y utilizando como marcador de peso molecular el Step Ladder 50pb (50-3000pb, Sigma, S7025-50UG).

Aunque está descrito en *B. fragilis* la PCR la probamos con las 97 cepas del cepario, que se detallan en la Tabla 1.

1.3.2. Estudio del grado de expresión de la síntesis de la PSA

Además de estudiar la presencia o no del operón implicado en la síntesis del PSA, estudiamos también su grado de expresión, para seleccionar *Bacteroides* spp. altamente productores.

Para valorar el grado de expresión de la PSA lo hicimos por RT-PCR cuantitativa del transcriptoma de la PSA en relación al transcriptoma de un gen constitutivo: *housekeeping gene* (HKG).

La cuantificación de la expresión de los genes de interés se normaliza relativizando su nivel de expresión con el nivel de expresión de estos HKG. Los HKG se expresan de manera constitutiva, de manera bastante independiente de la situación fisiológica de las células examinadas. Se trata de genes encargados de funciones básicas de la célula, involucrados en el buen funcionamiento celular (Barber *et al.*, 2005).

Para decidir el HKG a utilizar estudiamos tres posibles: GAPDH, *gyrA*, y *670*.

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa es un enzima implicado en una de las reacciones más importantes de la glucólisis: ruta de Embden-Meyerhof. Este gen es uno de los HKG más usados para comparar la expresión de diferentes genes. En estudios de Barber y colaboradores se ha visto que entre diferentes tipos de tejidos hay variabilidad. Por lo tanto las comparaciones deben realizarse dentro de un mismo tejido como control interno (Barber *et al.*, 2005; Vandesompele *et al.*, 2002).

***gyrA*:** la DNA girasa es una de las topoisomerasas de DNA que actúa durante la replicación del DNA para reducir la tensión molecular causada por el superenrollamiento. Las topoisomerasas son enzimas capaces de actuar sobre la topología del DNA, ya sea enredándolo para permitir que se almacene de manera más compacta o desenredándolo para que controle la síntesis de proteínas y para facilitar la replicación del mismo. Estos enzimas son necesarios debido a los inherentes problemas causados por la configuración estructural del DNA. La DNA- girasa produce cortes de doble cadena y después son unidos por las ligasa. Consta de dos subunidades A y B que son productos de los genes *gyrA* y *gyrB* respectivamente. La

región génica que determina la resistencia a quinolonas por la *gyrA* es una región muy conservada (Oh *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 1990).

670: Factor sigma 70. Los miembros de la familia de factores sigma o factores σ son proteínas que se encuentran en los procariontes como subunidades de la RNA polimerasa. Le permiten reconocer las secuencias promotoras del DNA para iniciar la transcripción. Los factores sigma más comunes son los factores $\sigma 70$ y $\sigma 54$. Son factores reguladores (Paget and Helmann, 2003).

Para la extracción del RNA a cuantificar en los extractos de cultivos de *Bacteroides* spp tras 48h de incubación a 37°C en BHIS, (VWR, 1.10493.0500+suplementos) utilizamos el kit NucleoSpin RNA Virus (Machery Nagel, 740956.250), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Se diseñaron unos cebadores utilizados para encontrar un *housekeeping gene* de *Bacteroides* spp, que pueden verse en la Tabla 9.

Tabla 9: Cebadores diseñados por I. Badiola para seleccionar el HKG más adecuado en *Bacteroides* spp.

Nombre	Secuencia
Bf-GAPDH-F	GGCTGGTGCTAAGAAAGTT
Bf-GAPDH-R	GAAATGATGTCCTGTCCTGC
Bact-rpoD-F	ATTCGTAAGGGTGACCGTGT
Bact-rpoD-R	CCTTGTTCTGGTACTGCTT
Bact-gyrA-F	GAGGAGGAAATGAAGTCATCG
Bact-gyrA-R	GGCTTAAATCCATCTCTAACATC

Para la amplificación de los RNAs bacterianos utilizamos el kit para RNA *one step*: Quantitec SYBR-Green RT-PCR kit (Qiagen, QIA210212). Debido a que la *mix* va con SYBR-Green, y no utilizamos sonda específica para la cuantificación del amplicón, después de los ciclos de amplificación se realiza automáticamente la curva de *melting* o de disociación que nos indica si la amplificación es específica o no.

El volumen de RT-PCR utilizado fue de 15 μ l finales con la siguiente composición:

- 7,5 μ l MasterMix SYBR-Green (Qiagen)
- 1,5 μ l Cebador F (Sigma)
- 1,5 μ l Cebador R (Sigma)
- 2,8 μ l H₂O de PCR (Sigma, W4502)

- 0,19 µl RT (Qiagen)
- 1,5 µl RNA

El programa de amplificación utilizado en el sistema de RT-PCR, ABI-Prism 7500-fast de Applied Biosystem fue el siguiente: 50°C durante 30 min, 95°C 15 min, 40 ciclos con 95°C 30 seg, 50°C 30 seg y 72°C 30 seg.

Realizando una PCR-real time cuantitativa combinada con una transcripción inversa, se examinaron los Ct obtenidos de los posibles genes a utilizar como HKG: GAPDH, *gyrA*, y *670* de varios *Bacteroides*. (El Ct es el ciclo a partir del cual la fluorescencia traspasa el *threshold* o umbral de detección).

Este estudio fue realizado sobre los RNA obtenidos en una cinética de crecimiento de la cepa CV-325, que es un *Bacteroides fragilis*, ATCC25285. En la cinética se tomaron muestras a hora 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 y se probaron todas las horas con las tres parejas de cebadores posibles. Tras analizar los resultados decidimos utilizar el GAPDH como HKG para para examinar las diferencias en el nivel de producción relativa del amplicón de la *PSA* entre diferentes cepas examinadas.

Tabla 10: *Bacteroides* a los que se hizo la cuantificación de la *PSA* por RT-PCR

Cepa	Especie
CV-0130	<i>B. thetaiotaomicron</i>
CV-0183	<i>B. dorei</i>
CV-0232	<i>B. fragilis</i>
CV-0268	<i>B. thetaiotaomicron</i>
CV-0293	<i>B. fragilis</i>
CV-0294	<i>B. fragilis</i>
CV-0295	<i>B. fragilis</i>
CV-0309	<i>B. thetaiotaomicron</i>
CV-0315	<i>B. fragilis</i>
CV-0323	<i>B. fragilis</i>
CV-0325	<i>B. fragilis</i>
CV-0350	<i>B. acidifaciens</i>
CV-0357	<i>B. acidifaciens</i>
CV-0375	<i>B. acidifaciens</i>
CV-0376	<i>B. acidifaciens</i>
CV-0378	<i>B. fragilis</i>
CV-0393	<i>B. fragilis</i>
CV-0464	<i>B. acidifaciens</i>
CV-0466	<i>B. fluxus</i>
CV-0607	<i>B. acidifaciens</i>

Se utilizó el método $2^{-\Delta C_t}$, el método más conveniente para analizar los cambios de expresión génica utilizando datos de la RT-PCR cuantitativa (Livak and Schmittgen, 2001).

Con este método, el software del sistema (7500 Fast System Abi Prism) valora el C_T del amplicón de las muestras, del control endógeno (HKG) en las muestras a testar y de la muestra de referencia. El software determina la cantidad relativa del amplicón en cada muestra comparando con la cantidad de la muestra normalizada de referencia. La validación de este método está descrito en Applied Biosystems User Bulletin N°2 (P/N 4303859).

1.4. Estudio de los perfiles antibióticos

Otro factor que se ha utilizado para la diferenciación de cepas ha sido su perfil de sensibilidad a los antibióticos. Se han hecho antibiogramas de representantes de la mayoría de las familias de antibióticos: gentamicina (Neosensitabs, 56774512-5) (aminoglucósido), tetracilina (Neosensitabs, 56778412-5) (tetraciclinas), tilosina (Neosensitabs, 79212-5) (macrólido), amoxicilina (Neosensitabs, 56770112-5) (β -lactámico), ceftiofur (Neosensitabs, 72412N-5) (cefalosporina), rifampicina (Neosensitabs, 62712) (rifamicina), colistina (Neosensitabs, 77512-N) (péptido cíclico), ácido nalidíxico (Neosensitabs, 61412) (quinolonas), cloranfenicol (Neosensitabs, 567NR60712-5) (fenicoles), lincomicina (Neosensitabs, 56774912-5) (lincosamidas); sulfamidas (78112N); eritromicina (Neosensitabs, 61012) (macrólido); bacitracina (Neosensitabs, 567NR70812N-5) (péptido cíclico); fosfomicina (Becton and Dickinson, 231709) (fosfonados); clindamicina (Becton and Dickinson, 254752) (lincosamina); teicoplanina (Becton and Dickinson , 291311) (glicopéptidos).

Para los antibiogramas utilizamos el medio de cultivo Mueller-Hinton-Sangre (MH - Sangre; bioMerieux) y los discos de sensibilidad de neosensitabs (ROSCO) y de Becton and Dickinson, El procedimiento utilizado en ambos casos fue esencialmente el mismo.

Para la realización de los antibiogramas se siguieron las recomendaciones del National Comitee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS, actualmente CLSI), publicadas en el documento NCCLS M31-A3 (2007). Para la traducción de los halos de inhibición a las categorías: sensible, intermedio, resistente; se siguieron las indicaciones de los fabricantes.

Para hacer el antibiograma seguimos el siguiente protocolo:

- ✓ Se parte de cultivos frescos en AS (Agar Sangre, bioMerieux) a 37°C durante 18-24 horas, en anaerobiosis.
- ✓ A partir de los crecimientos obtenidos tras el paso 1, se hacen suspensiones bacterianas, en 1 ml de suero fisiológico. Estas suspensiones se ajustan a densidades equivalentes al 0,5 de la escala de McFarland utilizando un fotocolorímetro (bioMerieux) con un filtro de 450 nm.
- ✓ Para inocular las placas se utiliza un hisopo estéril empapado en la solución de las bacterias sembrando en cultivo confluyente.
- ✓ Mediante un dispensador del fabricante se depositan encima del agar los discos de los antibióticos seleccionados.
- ✓ Las placas son incubadas a 37°C, durante 18-48 horas, en condiciones de anaerobiosis.
- ✓ Se mide el halo de inhibición del crecimiento de la bacteria producido por el disco del antibiótico correspondiente.
- ✓ Este halo nos dará según las tablas de la NCCLS o las de Becton and Dickinson, en cada caso, el resultado de Resistencia o Sensibilidad.

Como control de procedimiento se utilizó la cepa de *E. coli* ATCC®25922.

En una primera prueba se probaron: gentamicina, tetraciclina, tylosina, amoxiciclina, ceftiofur, rifampicina y colistina.

Los *Bacteroides* analizados son los mismos que se encuentran en la Tabla 1.

La segunda prueba con antibióticos se realizó sobre un número inferior de cepas, ya que se descartaron las que tenían muchas resistencias y los que no tenían el gen de la PSA.

En esta ocasión los antibióticos que se probaron fueron: ácido nalidixico, cloramfenicol, lincomicina, eritromicina, penicilina, bacitracina, nitrofurantoina, enrofloxacina, sulfonamidas, fosfomicina, clindamicina y teicoplanina.

Los *Bacteroides* estudiados en este caso corresponden a los 20 seleccionados de la Tabla 10.

1.5. Estudio de sensibilidad a coccidiostáticos

Los coccidiostáticos que se probaron fueron: salinomina (Sigma, S4526), icarbacina (Sigma, N3905), monensina (Sigma, M5273), narasin (Sigma, N1271) y diclazuril (Fluka, 34057) (Kant *et al.*, 2013; Sorum *et al.*, 2004).

Esta prueba se realizó sobre los 20 *Bacteroides* de la Tabla 10.

Para el estudio de la sensibilidad de las cepas de *Bacteroides* spp. a los coccidiostáticos utilizamos técnicas de dilución en agar, según el método siguiente:

- ✓ En primer lugar se hicieron las diluciones del coccidiostático. La primera dilución la ajustamos a 512 µg/mL, e hicimos diez diluciones en base 2 hasta conseguir la concentración de 1 µg/mL.
- ✓ Se atemperaron las placas de Mueller-Hinton Sangre Agar (bioMerieux).
- ✓ En cada una de las placas se dispensaron 100 µL de la dilución adecuada y se distribuyeron con asa de Digralsky.
- ✓ Se hicieron suspensiones de las cepas de *Bacteroides*, a partir de un cultivo fresco de 24h, en 1 ml de suero fisiológico. Estas suspensiones se ajustaron a densidades equivalentes al 0,5 de la escala de McFarland utilizando un fotocolorímetro (bioMerieux) con un filtro de 450 nm.
- ✓ Para inocular las placas se utilizó un asa de cultivo desechable de 1 µL y se pasó por la superficie de la placa empezando por la placa control (que no tenía coccidiostático y actuaba como control de crecimiento) y seguimos sembrando la serie de placas de menor a mayor concentración de coccidiostáticos.
- ✓ Las placas se incubaron a 37°C, durante 18-48 horas, en condiciones de anaerobiosis.
- ✓ La concentración menor de coccidiostático en la que se produjo la inhibición significativa del crecimiento en relación al control negativo se consideró la concentración mínima inhibitoria (CMI).

1.6. Producción de mucinasa

1.6.1. Presencia del gen de la mucinasa

El estudio de la presencia del gen de mucinasa se hizo por PCR de los extractos de DNA de las cepas analizadas, obtenidos con la matriz Chelex de Bio-Rad (InstaGene Matrix, 732-6030).

Para la PCR hemos utilizado unos cebadores diseñados *in silico* para amplificar un fragmento de la mucinasa (*mucin-desulfating sulfatase*) de *B. thetaiotaomicron*, única descrita en la bibliografía. No obstante las secuencias de los amplicones obtenidos dan cierto grado de homología con otras sulfatasas de *B. fragilis*, *B. xylanisolvens*, *B. vulgatus* y *B. helcogenes*. La prueba se realizó sobre los 20 *Bacteroides* de la Tabla 10.

En la tabla siguiente se muestran el nombre de los cebadores, las secuencias, el uso y los diferentes emparejamientos de los cinco cebadores utilizados junto al tamaño de los amplicones obtenidos.

Tabla 11: Secuencias de los cebadores para la detección de los genes que codifican para las mucinasas de *B. thetaiotaomicron*. Diseño I. Badiola.

Nombre	Secuencia	Uso	F+R/pb del amplicón
1-MucBT-F	GTCAGGGCGATTACTACAA	<i>B. thetaiotaomicron</i> (mucinasa)	1+2/647 pb
2-MucBT-R	GTCAAACCAACCATGCTCA	<i>B. thetaiotaomicron</i> (mucinasa)	
3-MucBTCom-F	CTGGACAATACACTGGTAGT	<i>B. thetaiotaomicron</i> (mucinasa)	3+4/319 pb
4-MucBTCom01-R	GTTCCGGCAGGATATTCATA	<i>B. thetaiotaomicron</i> (mucinasa)	
5-MucBTCom02-R	AATGAATCAGTTTATAGCGTT	<i>B. thetaiotaomicron</i> (mucinasa)	

El volumen de PCR utilizado fue de 25 µl con la siguiente composición:

- 16 µl AmpliTaq Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems, 43270586).
- 2,5 µl Tween 20 (1/00) (Sigma, P9416)
- 2 µl Cebador F (Sigma Genosys)
- 2 µl Cebador R (Sigma Genosys)
- 2,5µl DNA

El termociclador utilizado fue el Gene Amp PCR System 9700 de Applied Biosystems, programado con los siguientes pasos: 94°C durante 4 min, 30 ciclos de 94°C durante 1 min, 50°C durante 1 min 30 seg y 72°C 2 min, seguido de 1 último ciclo a 72°C durante 15 min y finalización de la reacción de amplificación por descenso de la temperatura a 4°C.

Los productos de PCR se examinaron por electroforesis en geles de agarosa (Sigma, A2790) al 2% y buffer trisEDTA- borato (Sigma, T4415) con bromuro de etidio (Sigma, E8751) al 0,05%. Como control de tamaño fue utilizado el marcador de peso molecular *Step Ladder* 50pb (50-3000pb, Sigma, S7025-50UG).

1.6.2. Estudio del grado de expresión de la síntesis mucinasa

Además de estudiar la presencia o no de los genes que intervienen en la síntesis de la mucina, hemos estudiado también su grado de expresión, para seleccionar *Bacteroides* altamente productores.

Para valorar el grado de expresión de las diferentes mucinasas hicimos RT-PCR cuantitativa del transcriptoma de las mucinasas en relación al transcriptoma de los genes HKG.

El transcriptoma a analizar se obtuvo por extracción de RNA con el kit NucleoSpin RNA Virus (Macherey-Nagel, 740956.250) y estudiamos los tres posibles genes a utilizar como HKG (ver Tabla 9), después de escoger el HKG más adecuado para los diferentes juegos de cebadores de la mucinasa (ver Tabla 11), se cuantificaron los transcriptomas de las diferentes cepas positivas al gen de la mucinasa utilizando el HKG seleccionado.

Se cuantificaron los 20 *Bacteroides* de la Tabla 10.

En este caso cambiamos el kit de la *MasterMix* únicamente por razones prácticas, y nos decantamos por una *MasterMix fast*. Utilizamos para la amplificación un kit para RNA *one step*: Express one-step SYBR green (Invitrogen, 11780200). Igual que con el otro kit, utilizamos la *MasterMix* con SYBR green.

El volumen de RT-PCR utilizado fue de 15 µl con la siguiente composición:

- 7.5 µl MasterMix SYBR-Green
- 0,5 µl Cebador F (Sigma)
- 0,5 µl Cebador R (Sigma)
- 3,6 µl H₂O de PCR (Sigma)
- 0,04 µl Rox
- 0,5 µl Super Script
- 2,5 µl RNA

El programa de amplificación utilizado en el sistema de RT-PCR, ABI-Prism 7500-fast de Applied Biosystem fue el siguiente: 50°C durante 20 min, 95°C 10 min, 40 ciclos con 95°C 15 seg, 60°C 1min.

1.7. Detección de genes de enterotoxinas

Como característica negativa en posibles cepas probióticas orales, la capacidad de producción de enterotoxinas debe descartarse.

Para analizar la presencia de genes codificantes de toxinas en los *Bacteroides* de la Tabla 10 utilizamos diferentes cebadores (Tabla 12) que permiten la amplificación de fragmentos de diferentes genes de enterotoxinas en *B. fragilis*.

El estudio de la presencia del gen de enterotoxinas se hizo por PCR de los extractos de DNA de las cepas analizadas, obtenidos con la matriz Chelex de Bio-Rad (InstaGene Matrix, 732-6030).

El volumen de PCR utilizado fue de 25 µl con la siguiente composición:

- 16 µl AmpliTaq Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems, 43270586).
- 2,5 µl Tween 20 (1/00) (Sigma, P9416)
- 2 µl Cebador F (Sigma Genosys)
- 2 µl Cebador R (Sigma Genosys)
- 2,5µl DNA

Tabla 12: Secuencias de los cebadores utilizados para detectar la presencia o ausencia de genes que codifican para enterotoxinas.

Nombre	Secuencia	Uso	Amplicón
BF/RS-3	TGAAGTTAGTGCCCAGATGCAGG	Enterotoxina <i>B. fragilis</i> (Shetab <i>et al.</i> , 1998)	367
BF/RS-4	GCTCAGCGCCCAGTATATGACC	Enterotoxina <i>B. fragilis</i> (Shetab <i>et al.</i> , 1998)	
BF/ENTEROTOX-404	GAGCCGAAGACGGTGTATGTGATTTGT	Enterotoxina <i>B. fragilis</i> (Luczak <i>et al.</i> , 2001)	400
BF/ENTEROTOX-407	TGCTCAGCGCCCAGTATATGACCTAGT	Enterotoxina <i>B. fragilis</i> (Luczak <i>et al.</i> , 2001)	
BF/ENTEROTOX-01	GACGGTGTATGTGATTTGTCTGAGAGA	Enterotoxina <i>B. fragilis</i> (Pantosti <i>et al.</i> , 1997)	
BF/ENTEROTOX-02	ATCCCTAAGATTTTATTATCCCAAGTA	Enterotoxina <i>B. fragilis</i> (Pantosti <i>et al.</i> , 1997)	294
BF/ENTEROTOX-03	GTTAGTGCCCAGATGCAGG	Enterotoxina <i>B. fragilis</i> (Gutacker <i>et al.</i> , 2000)	
BF/ENTEROTOX-04	TAGTTCGTGTGCCATCACCC	Enterotoxina <i>B. fragilis</i> (Gutacker <i>et al.</i> , 2000)	341

El termociclador utilizado en este caso fue el T-Gradient (Biometra), que nos permite probar los cebadores que se utilizan en un gradiente de Tm tan grande como queramos probar, dando Tm diferentes a cada columna de la placa.

El programa utilizado fue: 94°C durante 4 min, 35 ciclos de 94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min y 72°C 2 min, seguido de 1 último ciclo a 72°C durante 15 min y finalización de la reacción de amplificación por descenso de la temperatura a 4°C..

55°C durante 1 minuto fue la Tm central del gradiente de temperaturas. En este caso el gradiente fue: 40.0/ 40.7/ 42.8/ 46.1/ 49.6/ 53.2/ 56.8/ 60.3/ 63.9/ 67.25/ 69.3/ 70.0 °C, para las comunas 1-12 del sistema, respectivamente.

Los productos de PCR se examinaron por electroforesis en geles de agarosa (Sigma, A2790) al 2% y buffer trisEDTA- borato (Sigma, T4415) con bromuro de etidio (Sigma, E8751) al 0,05%. Como control de tamaño fue utilizado el marcador de peso molecular *Step Ladder* 50pb (50-3000pb, Sigma, S7025-50UG).

1.8. Detección de genes resistencia a antimicrobianos

Por ser la segunda característica negativa en posibles cepas probióticas orales, se analizó la presencia de genes de resistencia a antimicrobianos mediante PCR.

Por los resultados de los antibiogramas, el estudio de la presencia de genes de resistencia a macrólidos y a tetraciclinas se hizo por PCR de los extractos de DNA de las cepas analizadas (Tablado *et al.*), obtenidos con la matriz Chelex de Bio-Rad (InstaGene Matrix, 732-6030). Para la PCR se utilizó el termociclador Gene Amp PCR System 9700 de Applied Biosystems.

Los cebadores empleados fueron los que usamos, de forma habitual, para el análisis de la presencia de genes de resistencia antimicrobiana en *Enterococcus sp.* (Aarestrup *et al.*, 2000) y en *E. coli* (Ng *et al.*, 2001)

Tabla 13: En la parte superior, secuencias de cebadores de genes de resistencia a macrólidos y tetraciclinas de *Enterococcus* y, en la inferior, secuencias de cebadores de genes de resistencia a tetraciclinas de *E. coli*.

Nombre	Secuencia	Uso	Amplicón
ErmB-F	CATTTAACGACGAAACTGGC	Resist eritromicina/ <i>Enterococcus</i> (Jensen <i>et al.</i> , 1999)	400
ErmB-R	GGAACATCTGTGGTATGGCG	Resist eritromicina/ <i>Enterococcus</i> (Jensen <i>et al.</i> , 1999)	
Tet(M)-F	GTAAATAGTGTCTTGGAG	Resist tetraciclinas/ <i>Enterococcus</i> (Aarestrup <i>et al.</i> , 2000)	620
Tet(M)-R	CTAAGATATGGCTCTAACAA	Resist tetraciclinas/ <i>Enterococcus</i> (Aarestrup <i>et al.</i> , 2000)	
TetA-F	GCTACATCCTGCTTGCCCTTC	Bomba de eflujo tetraciclina/ <i>E.coli</i> (Ng <i>et al.</i> , 2001)	210
TetA-R	CATAGATCGCCGTGAAGAGG	Bomba de eflujo tetraciclina/ <i>E.coli</i> (Ng <i>et al.</i> , 2001)	
TetM-F	GTGGACAAAGGTACAACGAG	Protección ribosómica tetraciclina/ <i>E.coli</i> (Ng <i>et al.</i> , 2001)	400
TetM-R	CGGTAAAGTTCGTCACACAC	Protección ribosómica tetraciclina/ <i>E.coli</i> (Ng <i>et al.</i> , 2001)	

Además de los cebadores anteriores, Tabla 13, se utilizaron los cebadores de la Tabla 14, todos basados en diferentes artículos, pero modificados para optimizar la reacción de PCR.

Tabla 14: Secuencias de cebadores específicos de resistencias a antibióticos en *Bacteroides*. Las secuencias se han obtenido de los autores indicados pero han sido modificados por I. Badiola.

Nombre	Secuencia	Uso	Amplicón
Bact-cfxA-F	GTTCCATAAATCAGCGACAA	Detec. del gen <i>cfxA</i> (Eitel <i>et al.</i> , 2013)	341
Bact-cfxA-R	GCAAATCTCTCACTGTCAAT	Detec. del gen <i>cfxA</i> (Eitel <i>et al.</i> , 2013)	
Bact-cepA-F	TTATCTTCTTTCTGCTATGTC	Detec. del gen <i>cepA</i> (Piriz <i>et al.</i> , 2004)	911
Bact-cepA-R	ATTGTAAACGGAGGTGTATTC	Detec. del gen <i>cepA</i> (Piriz <i>et al.</i> , 2004)	
Bact-tetQ-F	AGCAGTCCTCATCTTATCCG	Detec. del gen <i>tetQ</i> (I. Badiola)	516
Bact-tetQ-R	CTTTTATGTCCTTTGGGGTC	Detec. del gen <i>tetQ</i> (I. Badiola)	
Bact-ermF-F	TAGATATTGGGGCAGGCAAG	Detec. del gen <i>ermF</i> (Eitel <i>et al.</i> , 2013)	501
Bact-ermF-R	ACAGACAGGAAATAAATGCTAAG	Detec. del gen <i>ermF</i> (Eitel <i>et al.</i> , 2013)	

El volumen de PCR utilizado fue de 25 µl con la siguiente composición:

- 16 µl AmpliTaq Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems, 43270586).
- 2,5 µl Tween 20 (1/00) (Sigma, P9416)
- 2 µl Cebador F (Sigma Genosys)
- 2 µl Cebador R (Sigma Genosys)
- 2,5µl DNA

El termociclador utilizado en este caso fue el T-Gradient (Biometra), que nos permite probar los cebadores que se utilizan en un gradiente de T_m tan grande como queramos probar, dando T_m diferentes a cada columna de la placa.

El programa utilizado fue: 94°C durante 4 min, 35 ciclos de 94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min y 72°C 2 min, seguido de 1 último ciclo a 72°C durante 15 min y finalización de la reacción de amplificación por descenso de la temperatura a 4°C.

55°C durante 1 minuto fue la T_m **central** del gradiente de temperaturas. En este caso el gradiente fue: 40.0/ 40.7/ 42.8/ 46.1/ 49.6/ 53.2/ 56.8/ 60.3/ 63.9/ 67.25/ 69.3/ 70.0 °C, para las comunas 1-12 del sistema, respectivamente.

Los productos de PCR se examinaron por electroforesis en geles de agarosa (Sigma, A2790) al 2% y buffer trisEDTA- borato (Sigma, T4415) con bromuro de etidio (Sigma, E8751) al 0,05%. Como control de tamaño fue utilizado el marcador de peso molecular *Step Ladder* 50pb (50-3000pb, Sigma, S7025-50UG).

1.9. Estudio de la presencia de secuencias de inserción

Los fragmentos de inserción van asociados a diferentes marcadores de resistencia a antimicrobianos.

Las secuencias de inserción examinadas fueron: IS4351, IS942 y IS1186. Su presencia se analizó por PCR de los extractos de DNA de las cepas analizadas (Tabla 4), obtenidos con la matriz Chelex de Bio-Rad (InstaGene Matrix, 732-6030).

Las secuencias de los cebadores utilizados se describen en la Tabla 15.

Tabla 15: Secuencias de cebadores para amplificar fragmentos de las secuencias de inserción más frecuentes en *Bacteroides*.

Nombre	Secuencia	Uso	F+R
1-IS4351-F	GAGAATCAAGCTTCTCGCC	Sec de Insercion <i>B. fragilis</i> -ermF (Gutacker <i>et al.</i> , 2000)	1+2
2-IS4351-R	CCCCGAATTCGCCTTTGCCCGTA	Sec de Insercion <i>B. fragilis</i> -ermF (Gutacker <i>et al.</i> , 2000)	
3-IS942-F	TCCTCAATACATGAGCCGC	Sec de Insercion <i>B. fragilis</i> -ermF (Gutacker <i>et al.</i> , 2000)	3+5
4-IS1186-F	TGACCTACAACATCTTCCCG	Sec de Insercion <i>B. fragilis</i> -ermF (Gutacker <i>et al.</i> , 2000)	4+5
5-CfiA3-R	GGTTGTTGATAACAATCATCCC	Sec de Insercion <i>B. fragilis</i> -ermF (Gutacker <i>et al.</i> , 2000)	1+5

El volumen de PCR utilizado fue de 25 µl finales con la siguiente composición:

- 16 µl AmpliTaq Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems, 43270586).
- 2,5 µl Tween 20 (1/00) (Sigma, P9416)
- 2 µl Cebador F (Sigma Genosys)
- 2 µl Cebador R (Sigma Genosys)
- 2,5µl DNA

El termociclador utilizado en este caso fue el T-Gradient (Biometra).

El programa utilizado fue: 94°C durante 4 min, 35 ciclos de 94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min y 72°C 2 min, seguido de 1 último ciclo a 72°C durante 15 min y finalización de la reacción de amplificación por descenso de la temperatura a 4°C.

55°C durante 1 minuto fue la T_m central del gradiente de temperaturas. En este caso el gradiente fue: 40.0/ 40.7/ 42.8/ 46.1/ 49.6/ 53.2/ 56.8/ 60.3/ 63.9/ 67.25/ 69.3/ 70.0 °C.

Los productos de PCR se examinaron por electroforesis en geles de agarosa (Sigma, A2790) al 2% y buffer trisEDTA- borato (Sigma, T4415) con bromuro de etidio (Sigma, E8751) al 0,05%. Como control de tamaño fue utilizado el marcador de peso molecular *Step Ladder* 50pb (50-3000pb, Sigma, S7025).

2. EXPERIMENTOS EN GRANJA. Pruebas *in vivo*

Para realizar las pruebas con animales, acudimos a una granja de engorde conocida y el propietario, Sr. Miquel Queralt, se prestó a ello. Nos cedió una parte de su nave de cría y las conejas que nos hicieran falta.

Pedimos doce hembras preñadas para las cuatro cepas a probar, el control negativo y dos más por si teníamos algún problema y se les administró pienso blanco desde ese momento hasta el final de la prueba.

Las conejas parieron una media de 10-11 gazapos por hembra.

A los 8 días postparto se hizo la inoculación de los *Bacteroides* directamente en el estómago de los gazapos, por vía tras-pared abdominal. Con la ayuda de una jeringa de 5 mL y aguja del nº 25G, cada gazapo recibió 0.5 mL de la suspensión bacteriana correspondiente ajustada a 10^7 UFC/mL. Esta vía de inoculación la habíamos probado una semana antes y gazapos de la misma edad no habían presentado ningún problema durante todo el periodo de observación.

Las jaulas de las hembras estaban distribuidas en fila, con un comedero común cada dos jaulas adyacentes. Esta distribución de los comederos forzó a formar grupos experimentales de dos jaulas, las que compartían comedero.

A los gazapos de dos hembras del primer grupo se les inoculó la cepa CV-0183 (*B. dorei*), a los gazapos de las hembras del segundo grupo se les inoculó la cepa CV-0293 (*B. fragilis*), a los gazapos de las hembras del tercer grupo se les inoculó la cepa CV-0315 (*B. fragilis*) y a los gazapos de las hembras del cuarto grupo se les inoculó la cepa CV-0607 (*B. acidifaciens*). Los gazapos de las dos conejas del quinto grupo fueron inoculados con agua de peptona tamponada para constituir el grupo control negativo.

Tabla 16: Distribución de los inóculos según las jaulas y nº de gazapos de cada jaula.

Jaula	Nº Gazapos	Cepa inoculada
1	10	CV-0183
2	11	CV-0183
3	11	CV-0293
4	9	CV-0293
5	11	CV-0315
6	10	CV-0315
7	11	CV-0607
8	11	CV-0607
9	11	C -
10	11	C -

Al final del periodo de lactancia (28 días de vida), se procedió al sacrificio de los animales a analizar y la toma de muestras.

De cada hembra se sacrificaron 5 gazapos, por lo que de cada tratamiento fueron muestreados 10 animales por grupo experimental.

De cada gazapo fueron tomadas las siguientes muestras:

- Raspado de mucosa en RNA later para extracción de RNA.
- Raspado de mucosa en alcohol para extracción de DNA.
- Contenido ileal en alcohol para extracción de DNA.
- Contenido ciego, en válvula ileo cecal en alcohol para extracción de DNA.

Raspado de mucosas para extracción de RNA y estudio de marcadores inmunitarios

Las mucosas se recogieron por raspado de de la mucosa del apéndice cecal y almacenamiento en crioviales con 1 mL de RNA later (Qiagen, QIA76106). Las muestras fueron congeladas a -80°C hasta su procesamiento.

El RNA later es un estabilizador del RNA que permite mantenerlo congelado mucho tiempo sin degradarse.

Tabla 17: Secuencias de los cebadores utilizados en el estudio de marcadores inmunitarios de la mucosa intestinal de gazapos inoculados, durante la primera semana de vida, con diferentes cepas de *Bacteroides* y sacrificados en el momento del destete.

Nombre	Secuencia	Uso
Rab_GAPDH-F	TGACGACATCAAGAAGGTGGTG	Cuantific. del GAPDH (Schnupf and Sansonetti, 2012)
Rab_GAPDH-R	GAAGGTGGAGGAGTGGGTGTC	Cuantific. del GAPDH (Schnupf and Sansonetti, 2012)
Rab_GIFN-F	TGCCAGGACACACTAACCAGAG	Cuantific. IFN- γ (Schnupf and Sansonetti, 2012)
Rab_GIFN-R	TGCTACTCTCCTTTTCCAATTCC	Cuantific. IFN- γ (Schnupf and Sansonetti, 2012)
Rab_IL2-F	GCCCAAGAAGGTCACAGA	Cuantific. IL-2 (Schnupf and Sansonetti, 2012, modific. I. Badiola)
Rab_IL2-R	GATTCTCTGGTATTTCCCCC	Cuantific. IL-2 (Schnupf and Sansonetti, 2012, modific. .Badiola)
Rab_IL-10-F	GAGAACCACAGTCCAGCCAT	Cuantific. IL-10 (Godornes <i>et al.</i> , 2007)
Rab_IL-10-R	CATGGCTTTGTAGACGCCTT	Cuantific. IL-10 (Godornes <i>et al.</i> , 2007)
Rab_TNFa-F	CTGCACTTCAGGGTGATCG	Cuantific. TNF- α (Schnupf and Sansonetti, 2012)
Rab_TNFa-R	CTACGTGGGCTAGAGGCT	Cuantific. TNF- α (Schnupf and Sansonetti, 2012)
Rab_TLR2-F	GAGAACCACAGTCCAGCCAT	Cuantific. TLR2 (Kajikawa <i>et al.</i> , 2005)
Rab_TLR2-R	CATGGCTTTGTAGACGCCTT	Cuantific. TLR2 (Kajikawa <i>et al.</i> , 2005)
Rab_MHCI-F	ACCAGACCCAGGACACGGA	Cuantific. de marcadores de superficie MHC I (I. Badiola)
Rab_MHCI-R	TGTATCTCTGCTCCTCCCA	Cuantific. de marcadores de superficie MHC I (I. Badiola)
Pig_MHCII-F	TGGAACAGCCAGAAGGAC	Cuantific. de marcadores de superficie MHC II (I. Badiola)
Pig_MHCII-R	TCACAGAGCAGACCAGGAG	Cuantific. de marcadores de superficie MHC II (I. Badiola)

Con el RNA obtenido por extracción con el kit RNeasy Minil Kit (Qiagen, 74106), se hizo el estudio de diferentes marcadores inmunitarios.

El mRNA asociado a los genes: γ IFN, IL-2, IL-10, TNF α , TLR2, MCHI, MCHII, junto al GAPDH como HKG fue cuantificado por RT-PCR.

Los cebadores utilizados fueron los mostrados en la Tabla 17.

Para la amplificación del mRNA se utilizó el kit Quantitec SYBR-Green RT-PCR kit (Qiagen, QIA210212), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El volumen de RT-PCR utilizado fue de 15 μ l finales con la siguiente composición:

- 7,5 μ l MasterMix SYBR-Green (Qiagen)
- 1,5 μ l Primer-F (Sigma)
- 1,5 μ l Primer-R (Sigma)
- 2,8 μ l H₂O de PCR (Sigma, W4502)
- 0,19 μ l RT (Qiagen)
- 1,5 μ l RNA

El programa de amplificación utilizado en el aparato de RT-PCR, ABI-Prism 7500-fast de Applied Biosystem, fue el siguiente: 50°C durante 30 min, 95°C 15 min, 40 ciclos con 95°C 30 seg, 50°C 30seg, y por último 72°C 30 seg.

Para la cuantificación y comparación del grado de expresión de los marcadores inmunitarios se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por (Livak and Schmittgen, 2001). Aplicando este método, en primer lugar se relativiza el grado de expresión de los diferentes genes de cada muestra, respecto al grado de expresión del gen GAPDH de la misma muestra; y en un segundo paso se relativiza el grado de expresión del gen analizado de cada animal, respecto al promedio del grado de expresión del mismo gen de los animales del grupo Control Negativo.

Raspado de mucosa en alcohol para extracción de DNA y análisis de la variabilidad genética de la región hipervariable de las inmunoglobulinas

Se hizo la extracción de DNA de los raspados de las mucosas del apéndice cecal fijados en alcohol y mantenidos a 4°C hasta su procesamiento. El DNA de las muestras fue extraído utilizando el DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, QIA51104).

Los primers utilizados fueron los que se describen en la Tabla 18.

Tabla 18: Secuencias de primers que definen la región hipervariable de las inmunoglobulinas de conejo.

Nombre	Secuencia (R= A o G, Y= C o T)	Uso
VDJ-Rabbit-F	ACCCTGGTCACCRTCTCYTCA	región hiper-variable de las inmunoglobulinas de conejo (Zhu <i>et al.</i> , 1999)
VDJ-Rabbit-R	ˆGARGAGACGGTGACCAGGGT	región hiper-variable de las inmunoglobulinas de conejo (Zhu <i>et al.</i> , 1999)

La reacción de amplificación se llevó a cabo utilizando el termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystem): 94°C 4min, 35 ciclos a 94° 4 min, 60°C 2 min, 72°C 1 min 15 seg, seguido de 1 último ciclo a 72°C durante 15 min y finalización de la reacción de amplificación por descenso de la temperatura a 4°C.

El volumen de PCR utilizado fue de 25 µl finales con la siguiente composición:

- 12,5 µl SYBR Green PCR- MasterMix (Applied Biosystems, 43270586)
- 2 µl Primer-F (Sigma)
- 2 µl Primer-R (Sigma)
- 2,5 µl Tween-20 (1/100) (Sigma, P9416)
- 2,5 µl DNA

Los fragmentos obtenidos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa de alta resolución al 2 % (Sigma, A2790), tras aplicar una corriente de 150 V durante 60 minutos.

Las bandas de amplificación obtenidas fueron extraídas del gel, utilizando el kit Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up (Machery Nagel, 740609.250) y agrupándose todos los fragmentos de 241 y 305 pb de cada muestra.

Tras la cuantificación de cada una de las 50 muestras analizadas, se hicieron alícuotas equimolares de las cinco muestras de los gazapos de cada hembra, obteniéndose 10 alícuotas, cada una de ellas constituida por los amplicones de la región hipervariable de las inmunoglobulinas obtenidos de las muestras de los cinco gazapos de las 10 hembras del estudio.

Se hizo la cuantificación de cada pool con el sistema de picogreen (Invitrogen, P7589), para ver la calidad y la concentración del DNA y, tras las correcciones necesarias para homogeneizar la concentración de DNA de las muestras, éstas fueron enviadas al CRAG (Centre de Recerca en Agrigenomica) para la secuenciación por el sistema Ion Torrent, método de secuenciación masiva de DNA basado en la detección de iones de hidrógeno durante la polimerización del DNA. El DNA de cada una de las

alícuotas fue marcado con una de las etiquetas moleculares del Ion Xpress™ Barcode Adapter 1-96 Kit (Life Technologies), para poder diferenciar las secuencias correspondientes a cada alícuota de la mezcla de alícuotas que se introdujeron en el sistema Ion Torrent. Los *Barcode* 33 a 42 fueron los utilizados para el marcaje de las muestras de los gazapos de las jaulas 1 a 10, respectivamente.

Partiendo de la información de los archivos FASTQ, creados por el sistema Ion Torrent en función de las etiquetas moleculares utilizadas, se realizaron los siguientes pasos para analizar y comparar el grado de diversidad de las secuencias de la región hipervariable de las inmunoglobulinas de las muestras analizadas:

1. Transformación de los archivos FASTQ a FASTA.
2. Selección de las secuencias más pequeñas limitadas por los cebadores utilizados para la amplificación y generación de un nuevo archivo FASTA.
3. Determinación del número de secuencias filtradas por la presencia de los cebadores utilizados para la amplificación.
4. Orientación de las secuencias con el cebador VDJ-Rabbit-F en la posición 5'. Esta reordenación hace coincidir la orientación y fase de lectura de la secuencia de aminoácidos de la región hipervariable de las inmunoglobulinas.
5. Traducción de las secuencias de nucleótidos a secuencias de aminoácidos, iniciando el marco de lectura en el primer nucleótido de la secuencia de DNA, y generación de un nuevo archivo FASTA.
6. Eliminación de las secuencias repetidas en los archivos FASTA, tanto los de secuencias de nucleótidos, como los de secuencias de aminoácidos.
7. Determinación del número de secuencias únicas de los archivos generados en el paso 6.
8. En paralelo, partiendo de los archivos obtenidos en el paso 2, se crearon 5 archivos, cada uno de ellos con el 20% de las secuencias de los archivos originales. Las secuencias incluidas en cada nuevo archivo fue seleccionada de manera aleatoria del total de secuencias contenidas en el archivo original.
9. Repetición de los pasos 3 a 7 para cada uno de los archivos aleatorios generados en el paso 8.
10. Adicionalmente fueron realizados diferentes cálculos para analizar la proporción de secuencias en los tres diferentes marcos de lectura y la de secuencias sin presencia de codones de finalización (TAA, TAG ó TGA) en relación a los diferentes inóculos utilizados.

Todos los pasos anteriores fueron realizados con la ayuda de programas *ad hoc*, diseñados por I. Badiola, realizados en el lenguaje Python (*Python Software Foundation*). Con los datos obtenidos en los pasos 3 y 7, así como los obtenidos en sus equivalentes del paso 9 de los archivos aleatorios, se calculó la relación entre el número de secuencias únicas (paso 7) y el número de secuencias totales (paso 3). Este valor, denominado como diversidad relativa, permitió comparar los resultados de cada muestra, minimizando el efecto de las diferencias del número de secuencias totales obtenido de cada muestra analizada.

Los valores obtenidos en el paso 10 fueron tratados de forma semejante, calculándose la relación del parámetro examinado frente al número total de secuencias analizadas de cada archivo FASTA.

Los valores de diversidad relativa fueron analizados por análisis paramétricos (GLM, T de Student) y no paramétricos (Kruskal-Wallis), con la cepa utilizada para la inoculación como único factor controlado de variabilidad.

Muestras de contenido ileal y cecal

Estas muestras se recogieron para el estudio de los perfiles de la microbiota intestinal, que se realizaron mediante métodos moleculares.

Las muestras de contenido digestivo a la altura de la porción media del intestino delgado (contenido ileal) y de la porción más próxima a la válvula ileo-cecal del ciego (contenido cecal), se recogieron en viales eppendorf con 1 mL de alcohol y se guardaron a 4°C hasta su procesamiento.

Se hizo la extracción del DNA con el kit QIamp DNA stool mini kit (Qiagen, QIA51604), utilizando 400 mg de la muestra original y siguiendo las indicaciones del fabricante, con algunas modificaciones:

- La temperatura recomendada lisis se incrementó a 90°C.
- Se agregó un paso de incubación con lisozima (10 mg/mL, 37°C, 30 minutos) con el fin de mejorar la ruptura de determinadas poblaciones bacterianas (Gram-positivos).
- El DNA obtenido se estabilizó por la adición de 4 µL de una solución de 40 mg/mL de BSA (albúmina sérica bovina, Sigma, B4287) y de 2 µL de ribonucleasa A (Sigma, R4642) y se almacenó a -20°C hasta uso.

Las muestras fueron analizadas utilizando la técnica de la PCR-*Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP). Esta técnica se utiliza para el estudio de los cambios en el perfil global de microbiota digestiva.

Con el fin de analizar el perfil de las bacterias mayoritarias presentes en las muestras, se amplificó un fragmento de 580-750 pb del gen que codifica para el rRNA 16S mediante la tecnología de la PCR y utilizando los cebadores descritos en la Tabla 19.

Tabla 19: Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación del gen 16S rRNA.

Nombre	Secuencia	Uso
R0358-F	CCGTCWATTCMTTGGAGTTT	Amplificación del 16S rRNA (Lane, 1991)
R0907-R	CTACGGGAGGCAGCAGT	Amplificación del 16S rRNA (Lane, 1991)

La reacción de amplificación se llevó a cabo utilizando el termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystem) programado con la siguiente secuencia de cambios de temperatura y tiempos: 94°C 4 min; 35 ciclos de (desnaturalización a 94°C 1 min, hibridación a 65°C 1 min, con un incremento de 0,1°C/ciclo, extensión a 72°C 1 min 15 s), seguido de 1 último ciclo a 72°C durante 15 min y finalización de la reacción de amplificación por descenso de la temperatura a 4°C.

El volumen de PCR utilizado fue de 50 µl finales con la siguiente composición:

- 25 µl AmpliTaq Gold MasterMix (Applied Biosystems, 43270586)
- 4 µl Primer-F (Sigma)
- 4 µl Primer-R (Sigma)
- 5 µl Tween-20 (1/100) (Sigma, P9416)
- 5 µl DNA

Tras la amplificación por PCR, se realizaron cuatro reacciones independientes con cuatro enzimas de restricción: *AluI* (10239275001), *RsaI* (10729132001), *HpaI* (10656330001), *CfoI* (10688541001) (Hoffmann-LaRoche Ltd.).

Las digestiones se llevaron a cabo conforme a lo recomendado por el fabricante, con el búfer de restricción apropiado, a 37°C durante 3 h. Los fragmentos obtenidos se separaron por electroforesis en gel de agarosa de alta resolución al 2 % (Sigma, A2790), tras aplicar una corriente de 150 V durante 60 minutos.

El tamaño y la intensidad de las bandas obtenidas se analizaron con el sistema ChemiGenius (Syngene), mediante el programa GeneTools (Syngene, Cambridge) y un programa *ad hoc* diseñado por nuestro grupo. Con el número total de bandas obtenidas de las cuatro digestiones de restricción independiente se midió el grado de diversidad microbiana. La comparación de perfiles RFLP se realizó mediante dendrogramas y el análisis de las matrices del grado de similitud (Kaufman and Rousseeuw, 1990) de los electroferogramas entre 700 pb y 50 pb obtenidos para cada una de las muestras analizadas.

A partir del DNA extraído de las muestras se llevó a cabo también la cuantificación por RT-PCR del nº total de *Bacteroides*.

Los cebadores utilizados para esta cuantificación fueron los descritos en la Tabla 20.

Tabla 20: Secuencias de los cebadores utilizados para el recuento de *Bacteroides* totales por RT-PCR diseñados por I.Badiola.

Nombre	Secuencia (Y= C+T)	Uso
BacteroRT-F	CTATGGGTYGTAACCTTCTT	Recuento <i>Bacteroides</i> totales
BacteroRT-R	CGCTCCCTTTAAACCCAATAAA	Recuento <i>Bacteroides</i> totales

El volumen de PCR utilizado fue de 25 µl finales con la siguiente composición:

- 12,5 µl AmpliTaq Gold MasterMix (Applied Biosystems, 43270586)
- 1,5 µl Primer-F (Sigma)
- 1,5 µl Primer-R (Sigma)
- 7 µl H₂O de PCR (Sigma, W4502)
- 2,5 µl DNA

El programa de amplificación utilizado en el sistema de RT-PCR ABI-Prism 7500-fast de Applied Biosystem, fue el siguiente: 50°C durante 2 min, 95°C 10 min, 40 ciclos con 95°C 15 seg, 60°C 1 min.

Para la cuantificación de *Bacteroides* se utilizó como curva patrón la obtenida por extracción del DNA, de suspensiones con concentraciones diferentes (10^8 a 10^2) de *Bacteroides thetaiotaomicron*, utilizando el kit Qlamp DNA stool mini kit (Qiagen, QIA51604) y las modificaciones descritas anteriormente. Los elementos de la curva patrón de *Bacteroides* fueron incluidos en cada una de las placas utilizadas para el estudio. El sistema ABI-Prism traduce la C_t de cada muestra a concentración bacteriana teniendo en cuenta los valores C_t de la curva patrón.

Programas utilizados para representaciones gráficas y análisis estadístico

Los gráficos presentados en este trabajo fueron realizados con Excel 2010 para Windows (Microsoft Corporation, USA) o con GraphPad Prism 5.01 para Windows (GraphPad Software, Inc., USA).

Para los análisis estadísticos se utilizaron diferentes funciones del paquete Java GUI for R (JGR) versión 1.7-16, escrito en R versión 2.15.3 (The R Foundation for Statistical Computing) por M. Helbig, S. Urbanek y I. Fellows del RoSuDa, Univ. Augsburg.

Para los análisis no paramétricos utilizando la prueba de Kruskal-Wallis fue aplicado el estadístico:

$$K = (N - 1) \frac{\sum_{i=1}^g n_i (\bar{r}_i - \bar{r})^2}{\sum_{i=1}^g \sum_{j=1}^{n_i} (r_{ij} - \bar{r})^2}$$

Para los análisis paramétricos utilizando la prueba de GLM fue aplicado el estadístico:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{i1} + \beta_2 X_{i2} + \dots + \beta_p X_{ip} + \epsilon_i.$$

Para el análisis de la diferencia entre inóculos fue utilizado el test de Tukey aplicando el siguiente estadístico:

$$q_s = \frac{Y_A - Y_B}{SE}$$

Para la construcción del dendrograma se utilizó la función Hierarchical clustering del JGR escrita en R por A. Lucas y S. Jasson, Univ. Toulouse:

`hcluster(x, method = "euclidean", diag = FALSE, upper = FALSE, link = "ward", members = NULL, nbproc = 2, doubleprecision = TRUE).`

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. CEPAS DE *BACTEROIDES* spp.

En el momento de comenzar el estudio, en el cepario del laboratorio contábamos con 172 cepas de *Bacteroides* de especies diferentes.

Las cepas habían sido identificadas por varios métodos: todas según el sistema Vitek (Vitek-2 Compact, bioMerieux), algunas por PCR específica y un número reducido por secuenciación. De este cepario, para la presente tesis fueron descartadas las cepas que no se habían llegado a clasificar de forma definitiva y las que tenían marcada relación epidemiológica con otras cepas seleccionadas.

En la Tabla 21 se muestran las 97 cepas de *Bacteroides* con las que se ha trabajado.

Tabla 21: Lista de las 97 cepas de *Bacteroides* que inicialmente fueron incluidas en el estudio. (Nº: nº de orden, Cepa: referencia del cepario CReSA de Viales, Especie: especie de *Bacteroides* spp.)

Nº	Cepa	Especie	Nº	Cepa	Especie	Nº	Cepa	Especie
1	CV-0001	<i>B.fragilis</i>	34	CV-0277	<i>B.thetaiotaomicron</i>	67	CV-0363	<i>B.acidifaciens</i>
2	CV-0125	<i>B.thetaiotaomicron</i>	35	CV-0278	<i>B.vulgatus</i>	68	CV-0365	<i>B.acidifaciens</i>
3	CV-0126	<i>B.vulgatus</i>	36	CV-0293	<i>B.fragilis</i>	69	CV-0367	<i>B.acidifaciens</i>
4	CV-0129	<i>B.thetaiotaomicron</i>	37	CV-0294	<i>B.fragilis</i>	70	CV-0368	<i>B.acidifaciens</i>
5	CV-0130	<i>B.thetaiotaomicron</i>	38	CV-0295	<i>B.fragilis</i>	71	CV-0369	<i>B.acidifaciens</i>
6	CV-0131	<i>B.fragilis</i>	39	CV-0305	<i>B.thetaiotaomicron</i>	72	CV-0370	<i>B.acidifaciens</i>
7	CV-0183	<i>B.dorei</i>	40	CV-0307	<i>B.thetaiotaomicron</i>	73	CV-0371	<i>B.acidifaciens</i>
8	CV-0184	<i>B.dorei</i>	41	CV-0308	<i>B.thetaiotaomicron</i>	74	CV-0372	<i>B.acidifaciens</i>
9	CV-0185	<i>B.fragilis</i>	42	CV-0309	<i>B.thetaiotaomicron</i>	75	CV-0373	<i>B.acidifaciens</i>
10	CV-0222	<i>B.vulgatus</i>	43	CV-0310	<i>B.fragilis</i>	76	CV-0374	<i>B.acidifaciens</i>
11	CV-0225	<i>B.thetaiotaomicron</i>	44	CV-0315	<i>B.fragilis</i>	77	CV-0375	<i>B.acidifaciens</i>
12	CV-0227	<i>B.thetaiotaomicron</i>	45	CV-0317	<i>B.thetaiotaomicron</i>	78	CV-0376	<i>B.acidifaciens</i>
13	CV-0228	<i>B.thetaiotaomicron</i>	46	CV-0323	<i>B.fragilis</i>	79	CV-0377	<i>B.fragilis</i>
14	CV-0229	<i>B.xylanisolvens</i>	47	CV-0324	<i>B.fragilis</i>	80	CV-0378	<i>B.fragilis</i>
15	CV-0230	<i>B.thetaiotaomicron</i>	48	CV-0325	<i>B.fragilis</i>	81	CV-0379	<i>B.vulgatus</i>
16	CV-0231	<i>B.xylanisolvens</i>	49	CV-0332	<i>B.thetaiotaomicron</i>	82	CV-0380	<i>B.acidifaciens</i>
17	CV-0232	<i>B.fragilis</i>	50	CV-0333	<i>B.thetaiotaomicron</i>	83	CV-0384	<i>B.thetaiotaomicron</i>
18	CV-0234	<i>B.intestinalis</i>	51	CV-0335	<i>B.thetaiotaomicron</i>	84	CV-0389	<i>B.fragilis</i>
19	CV-0235	<i>B.thetaiotaomicron</i>	52	CV-0336	<i>B.thetaiotaomicron</i>	85	CV-0390	<i>B.acidifaciens</i>
20	CV-0263	<i>B.fragilis</i>	53	CV-0337	<i>B.thetaiotaomicron</i>	86	CV-0391	<i>B.fragilis</i>
21	CV-0264	<i>B.fragilis</i>	54	CV-0339	<i>B.thetaiotaomicron</i>	87	CV-0392	<i>B.fragilis</i>
22	CV-0265	<i>B.fragilis</i>	55	CV-0340	<i>B.thetaiotaomicron</i>	88	CV-0393	<i>B.fragilis</i>
23	CV-0266	<i>B.thetaiotaomicron</i>	56	CV-0341	<i>B.thetaiotaomicron</i>	89	CV-0394	<i>B.acidifaciens</i>
24	CV-0267	<i>B.thetaiotaomicron</i>	57	CV-0342	<i>B.thetaiotaomicron</i>	90	CV-0395	<i>B.fragilis</i>
25	CV-0268	<i>B.thetaiotaomicron</i>	58	CV-0345	<i>B.vulgatus</i>	91	CV-0396	<i>B.fragilis</i>
26	CV-0269	<i>B.fragilis</i>	59	CV-0348	<i>B.acidifaciens</i>	92	CV-0464	<i>B.acidifaciens</i>
27	CV-0270	<i>B.xylanisolvens</i>	60	CV-0349	<i>B.acidifaciens</i>	93	CV-0466	<i>B.fluxus</i>
28	CV-0271	<i>B.fragilis</i>	61	CV-0350	<i>B.acidifaciens</i>	94	CV-0586	<i>B.fragilis</i>
29	CV-0272	<i>B.fragilis</i>	62	CV-0351	<i>B.acidifaciens</i>	95	CV-0587	<i>B.fragilis</i>
30	CV-0273	<i>B.massiliensis</i>	63	CV-0352	<i>B.acidifaciens</i>	96	CV-0606	<i>B.fragilis</i>
31	CV-0274	<i>B.massiliensis</i>	64	CV-0357	<i>B.acidifaciens</i>	97	CV-0607	<i>B.acidifaciens</i>
32	CV-0275	<i>B.thetaiotaomicron</i>	65	CV-0360	<i>B.acidifaciens</i>			
33	CV-0276	<i>B.thetaiotaomicron</i>	66	CV-0361	<i>B.acidifaciens</i>			

Las cepas están congeladas con el sistema de crioviales de bolitas (Vials protect, Technical Service).

2. PRODUCCIÓN DE SUSTANCIAS INHIBIDORAS DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

Inicialmente, para el estudio de la producción de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano se utilizó el método descrito por Riley y Mee (Riley and Mee, 1981) utilizando gotas de cultivos de *Bacteroides* spp. sobre papel de filtro como paso previo al cultivo confluyente de las cepas diana, pero las lecturas de inhibición no fueron satisfactorias.

Por eso procedimos a utilizar el método de doble agar con crecimiento de la bacteria diana en la superficie del agar sólido inferior y de la bacteria productora inmerso en la capa superior de agar semiblando. Con este sistema se tuvieron combinaciones en las que se observaba zonas discretas de inhibición del crecimiento de forma irregular (Figura 10) y combinaciones en las que se observaba inhibición general del crecimiento de la bacteria diana.

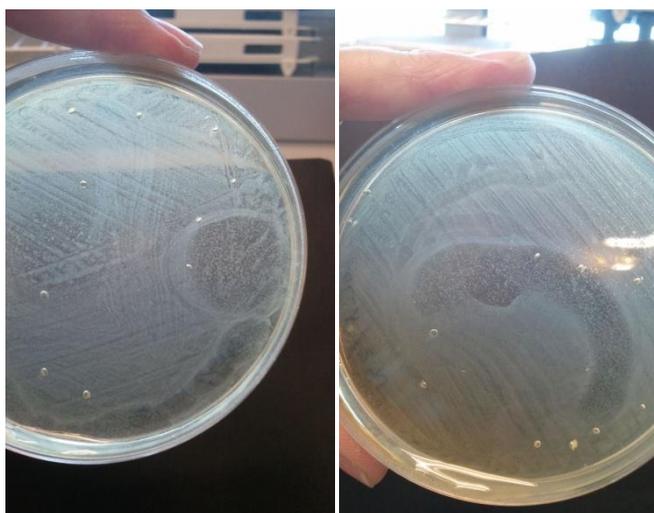


Figura 10: En estas dos fotografías podemos ver el resultado obtenido por la producción de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano por parte de dos cepas de *Bacteroides* spp. sobre una cepa de *Bacteroides* spp. diana.

Con este método pudimos observar que algunas cepas producen sustancias inhibidoras contra un número elevado de cepas de *Bacteroides* spp., mientras que otras sólo inhibían a un número pequeño de cepas de *Bacteroides* spp. En paralelo se pudo observar que algunas cepas de *Bacteroides* spp. fueron sensibles a las sustancias inhibidoras producidas por un amplio número de cepas de *Bacteroides* spp., mientras que otras sólo lo eran a un reducido número de cepas (Tabla 22).

La mayoría de cepas de *Bacteroides* spp. produjeron sustancias inhibitoras del crecimiento, aunque las cepas CV-0131, CV-0228, CV-0232, CV-0264, CV-0273, CV-0349, CV-0350, CV-0369, CV-0370, CV-0371, CV-0396, CV-0464 y CV-0466 y fueron las que mostraron el mayor espectro de actividad.

Por otro lado las cepas CV-0232, CV-0264, CV-0270, CV-0273, CV-0274, CV-464 y CV-466 fueron las que mostraron mayor grado de sensibilidad.

Tabla 22: Resultado de la producción de sustancias inhibitoras del crecimiento (SIC) expresada en cuatro categorías: (-) no productoras, (+) poco productoras, (++) bastante productoras y (+++) muy productoras, de las 110 cepas de *Bacteroides* spp.

Nº	Cepa	SIC	Nº	Cepa	SIC	Nº	Cepa	SIC
1	CV-0001	+	34	CV-0277	-	67	CV-0363	+
2	CV-0125	+	35	CV-0278	-	68	CV-0365	-
3	CV-0126	+	36	CV-0293	+	69	CV-0367	-
4	CV-0129	+	37	CV-0294	+	70	CV-0368	-
5	CV-0130	+	38	CV-0295	+	71	CV-0369	++
6	CV-0131	++	39	CV-0305	-	72	CV-0370	+++
7	CV-0183	+	40	CV-0307	-	73	CV-0371	+++
8	CV-0184	+	41	CV-0308	-	74	CV-0372	+
9	CV-0185	+	42	CV-0309	+	75	CV-0373	-
10	CV-0222	+	43	CV-0310	-	76	CV-0374	+
11	CV-0225	-	44	CV-0315	-	77	CV-0375	+
12	CV-0227	-	45	CV-0317	-	78	CV-0376	+
13	CV-0228	+++	46	CV-0323	-	79	CV-0377	+
14	CV-0229	+	47	CV-0324	-	80	CV-0378	-
15	CV-0230	-	48	CV-0325	+	81	CV-0379	-
16	CV-0231	+	49	CV-0332	-	82	CV-0380	-
17	CV-0232	+++	50	CV-0333	-	83	CV-0384	-
18	CV-0234	+	51	CV-0335	+	84	CV-0389	-
19	CV-0235	-	52	CV-0336	+	85	CV-0390	+
20	CV-0263	+	53	CV-0337	+	86	CV-0391	-
21	CV-0264	++	54	CV-0339	-	87	CV-0392	+
22	CV-0265	+	55	CV-0340	-	88	CV-0393	-
23	CV-0266	-	56	CV-0341	-	89	CV-0394	-
24	CV-0267	-	57	CV-0342	-	90	CV-0395	-
25	CV-0268	-	58	CV-0345	-	91	CV-0396	++
26	CV-0269	+	59	CV-0348	-	92	CV-0464	+++
27	CV-0270	+	60	CV-0349	+++	93	CV-0466	++
28	CV-0271	+	61	CV-0350	++	94	CV-0586	-
29	CV-0272	+	62	CV-0351	+	95	CV-0587	-
30	CV-0273	++	63	CV-0352	-	96	CV-0606	-
31	CV-0274	+	64	CV-0357	-	97	CV-0607	+
32	CV-0275	-	65	CV-0360	+			
33	CV-0276	+	66	CV-0361	-			

El análisis de la producción de sustancias inhibitorias sirvió para establecer que 45 cepas tuvieron escasa o ninguna actividad antibacteriana en el modelo *in vitro* utilizado.

El 53,61% de las cepas analizadas de *Bacteroides* spp. produjeron sustancias inhibitoras del crecimiento de otras cepas de *Bacteroides* spp. Aunque en este trabajo no se ha analizado la naturaleza de las sustancias inhibitoras del crecimiento, en *B. fragilis*, *B. ovatus*, *B. thetaiotaomicron*, *Bacteroides* spp. se ha descrito la producción de bacteriocinas (Avelar *et al.*, 1999; Booth *et al.*, 1977; Mossie *et al.*, 1979; Riley and Mee, 1981) que actuarían de reguladores de otras poblaciones bacterianas en el sistema digestivo, especialmente en el intestino grueso (Booth *et al.*, 1977). En los trabajos publicados por otros grupos, el porcentaje de cepas productoras de bacteriocinas va del 9-35% (Booth *et al.*, 1977) al 54,5-100% (Avelar *et al.*, 1999).

3. ESTUDIO DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE

3.1. Estudio de la presencia o ausencia del gen que codifica para la síntesis de la PSA

El estudio de la presencia del gen *PSA* (polisacárido capsular *PSA* antígeno T-dependiente de *Bacteroides* spp.) se realizó por PCR convencional con los cebadores Bfra-*PSA*-F y Bfra-*PSA*-R diseñados para la detección del gen *PSA* de *Bacteroides fragilis* y los resultados obtenidos pueden observarse en la Tabla 23.

Como los cebadores utilizados se basaron en la secuencia del gen *PSA* de *B. fragilis*, el único descrito en la literatura, y otras especies de *Bacteroides* también dieron resultados positivos, los amplicones obtenidos de las cepas de *B. acidifaciens* y de *B. thetaiotaomicron* fueron secuenciados para analizar el grado de homología con el gen *PSA* de *B. fragilis*.

Este examen permitió determinar que el grado de homología de los amplicones analizados fue superior al 99%, demostrándose la presencia de genes con alto grado de homología con el gen *PSA* de *B. fragilis* en otras cepas de *B. acidifaciens* y de *B. thetaiotaomicron*, un hecho no descrito anteriormente en la literatura.

Tabla 23: Cepas de *Bacteroides* spp. con presencia (+) o ausencia (-) del gen PSA

Cepa	Especie	PCR PSA	Cepa	Especie	PCR PSA
CV-0001	<i>B. fragilis</i>	+	CV-0333	<i>B. thetaiotaomicron</i>	+
CV-0125	<i>B. thetaiotaomicron</i>	+	CV-0335	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-
CV-0126	<i>B. vulgatus</i>	-	CV-0336	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-
CV-0129	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-	CV-0337	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-
CV-0130	<i>B. thetaiotaomicron</i>	+	CV-0339	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-
CV-0131	<i>B. fragilis</i>	+	CV-0340	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-
CV-0183	<i>B. dorei</i>	+	CV-0341	<i>B. thetaiotaomicron</i>	+
CV-0184	<i>B. dorei</i>	+	CV-0342	<i>B. thetaiotaomicron</i>	+
CV-0185	<i>B. fragilis</i>	+	CV-0345	<i>B. vulgatus</i>	-
CV-0222	<i>B. vulgatus</i>	+	CV-0348	<i>B. acidifaciens</i>	+
CV-0225	<i>B. thetaiotaomicron</i>	+	CV-0349	<i>B. acidifaciens</i>	-
CV-0227	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-	CV-0350	<i>B. acidifaciens</i>	+
CV-0228	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-	CV-0351	<i>B. acidifaciens</i>	+
CV-0229	<i>B. xylanisolvens</i>	-	CV-0352	<i>B. acidifaciens</i>	+
CV-0230	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-	CV-0357	<i>B. acidifaciens</i>	+
CV-0231	<i>B. xylanisolvens</i>	+	CV-0360	<i>B. acidifaciens</i>	-
CV-0231	<i>B. fragilis</i>	+	CV-0361	<i>B. acidifaciens</i>	+
CV-0234	<i>B.intestinalis</i>	+	CV-0363	<i>B. acidifaciens</i>	+
CV-0235	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-	CV-0365	<i>B. acidifaciens</i>	-
CV-0263	<i>B. fragilis</i>	+	CV-0367	<i>B. acidifaciens</i>	-
CV-0264	<i>B. fragilis</i>	+	CV-0368	<i>B. acidifaciens</i>	-
CV-0265	<i>B. fragilis</i>	+	CV-0369	<i>B. acidifaciens</i>	-
CV-0266	<i>B. thetaiotaomicron</i>	+	CV-0370	<i>B. acidifaciens</i>	+
CV-0267	<i>B. thetaiotaomicron</i>	+	CV-0371	<i>B. acidifaciens</i>	-
CV-0268	<i>B. thetaiotaomicron</i>	+	CV-0372	<i>B. acidifaciens</i>	-
CV-0269	<i>B. fragilis</i>	+	CV-0373	<i>B. acidifaciens</i>	+
CV-0270	<i>B. xylanisolvens</i>	-	CV-0374	<i>B. acidifaciens</i>	-
CV-0271	<i>B. fragilis</i>	+	CV-0375	<i>B. acidifaciens</i>	+
CV-0272	<i>B. fragilis</i>	+	CV-0376	<i>B. acidifaciens</i>	+
CV-0273	<i>B. massiliensis</i>	+	CV-0377	<i>B. fragilis</i>	+
CV-0274	<i>B. massiliensis</i>	-	CV-0378	<i>B. fragilis</i>	+
CV-0275	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-	CV-0379	<i>B. vulgatus</i>	+
CV-0276	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-	CV-0380	<i>B. acidifaciens</i>	+
CV-0277	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-	CV-0384	<i>B. thetaiotaomicron</i>	+
CV-0278	<i>B. vulgatus</i>	-	CV-0389	<i>B. fragilis</i>	+
CV-0293	<i>B. fragilis</i>	+	CV-0390	<i>B. acidifaciens</i>	+
CV-0294	<i>B. fragilis</i>	+	CV-0391	<i>B. fragilis</i>	-
CV-0295	<i>B. fragilis</i>	+	CV-0392	<i>B. fragilis</i>	+
CV-0305	<i>B. thetaiotaomicron</i>	+	CV-0393	<i>B. fragilis</i>	+
CV-0307	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-	CV-0394	<i>B. acidifaciens</i>	+
CV-0308	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-	CV-0395	<i>B. fragilis</i>	+
CV-0309	<i>B. thetaiotaomicron</i>	+	CV-0396	<i>B. fragilis</i>	+
CV-0310	<i>B. fragilis</i>	+	CV-0464	<i>B. acidifaciens</i>	+
CV-0315	<i>B. fragilis</i>	+	CV-0466	<i>B. fluxus</i>	+
CV-0317	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-	CV-0586	<i>B. fragilis</i>	+
CV-0323	<i>B. fragilis</i>	+	CV-0587	<i>B. fragilis</i>	+
CV-0324	<i>B. fragilis</i>	-	CV-0606	<i>B. fragilis</i>	+
CV-0325	<i>B. fragilis</i>	+	CV-0607	<i>B. acidifaciens</i>	+
CV-0332	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-			

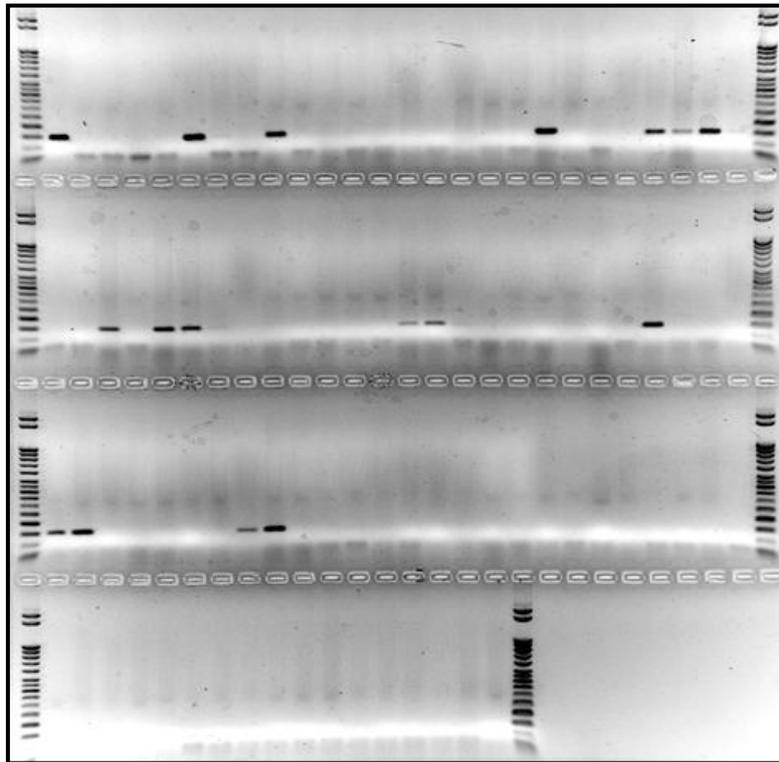


Figura 11: A modo de ejemplo tenemos el Gel B-1302. En los pocillos de los cuatro peines tenemos las muestras del resultado de la PCR de la proteína que codifica para la PSA de diversas muestras (diferentes especies de *Bacteroides*). La banda resultante es de 148 pb. En los extremos tenemos el control de Pm Step Ladder 50 (Sigma).

Los dos casos de *B. fragilis* que dieron negativo para el gen PSA –cepas CV-0324 y CV-0391–, fueron secuenciados para comprobar si eran o no *B. fragilis*, confirmándose por homología del 16S-rDNA que si lo eran.

Como puede verse en la Tabla 24, donde se resumen los resultados obtenidos, el 93,10% de las cepas de *B. fragilis* analizadas fueron positivas al gen PSA. En el caso de *B. acidifaciens* el porcentaje de cepas positivas al gen PSA fue del 64,00% y para *B. thetaiotaomicron* el porcentaje de positividad fue del 41,38%. Para el resto de especies analizadas el porcentaje global de cepas positivas fue del 57,14%.

Tabla 24: Resumen del número de *Bacteroides* de cada especie y resultado de la amplificación por PCR con los cebadores de PSA de *B. fragilis*.

Especie	Nº cepas	Nº positivas	Nº negativas
<i>B. fragilis</i>	29	27	2
<i>B. thetaiotaomicron</i>	29	12	17
<i>B. acidifaciens</i>	25	16	9
<i>B. vulgatus</i>	5	2	3
<i>B. dorei</i>	2	2	0
<i>B. xylanosolvans</i>	3	1	2
<i>B. intestinalis</i>	1	1	0
<i>B. massiliensis</i>	2	1	1
<i>B. fluxus</i>	1	1	0

El hallazgo de la presencia del gen *PSA* en cepas de diferentes especies de *Bacteroides* resulta un hecho relevante, de cara a la utilización de diferentes especies de este género bacteriano como posibles probióticos, máxime si tenemos en cuenta el papel que parece jugar el producto de este gen en la maduración y estimulación del sistema inmunitario asociado a la mucosa intestinal (Brubaker *et al.*, 1999; Mazmanian *et al.*, 2005; Somnese *et al.*, 2012).

3.2. Estudio del grado de expresión del gen *PSA*

Después de comprobar qué *Bacteroides* tenían el gen *PSA* quisimos ver cuál era su grado de expresión. Para ello probamos tres posibles HKG (*Housekeeping genes*) que servirían como expresión génica de referencia: *GAPDH*, *gyrA* y *β70*.

En las pruebas realizadas, tanto el *β70* como el *GAPDH* dieron buenos resultados, escogimos el *GAPDH* por ser el más utilizado en la literatura (Shirkey *et al.*, 2006; Vandesomepele *et al.*, 2002).

Tabla 25: Nº de cepa, la especie de *Bacteroides* a que corresponde y el promedio del grado de expresión del gen *PSA* en relación al grado de expresión del *GAPDH* utilizando el algoritmo $2^{-\Delta Ct}$, junto a la desviación estándar (D.E.) de las dos determinaciones realizadas.

Cepa	Especie	Promedio	D.E.
CV-0130	<i>B. thetaiotaomicron</i>	0,792	0,247
CV-0183	<i>B. dorei</i>	1,376	0,358
CV-0232	<i>B. fragilis</i>	0,356	0,029
CV-0268	<i>B. thetaiotaomicron</i>	0,284	0,049
CV-0293	<i>B. fragilis</i>	3,307	0,008
CV-0294	<i>B. fragilis</i>	0,084	0,000
CV-0295	<i>B. fragilis</i>	0,384	0,119
CV-0309	<i>B. thetaiotaomicron</i>	1,088	0,112
CV-0315	<i>B. fragilis</i>	0,199	0,166
CV-0323	<i>B. fragilis</i>	0,684	0,040
CV-0325	<i>B. fragilis</i>	0,596	0,027
CV-0350	<i>B. acidifaciens</i>	0,067	0,000
CV-0357	<i>B. acidifaciens</i>	0,185	0,010
CV-0375	<i>B. acidifaciens</i>	0,426	0,129
CV-0376	<i>B. acidifaciens</i>	0,498	0,246
CV-0378	<i>B. fragilis</i>	0,151	0,005
CV-0393	<i>B. fragilis</i>	0,725	0,178
CV-0464	<i>B. acidifaciens</i>	0,446	0,035
CV-0466	<i>B. fluxus</i>	0,225	0,023
CV-0607	<i>B. acidifaciens</i>	0,829	0,031

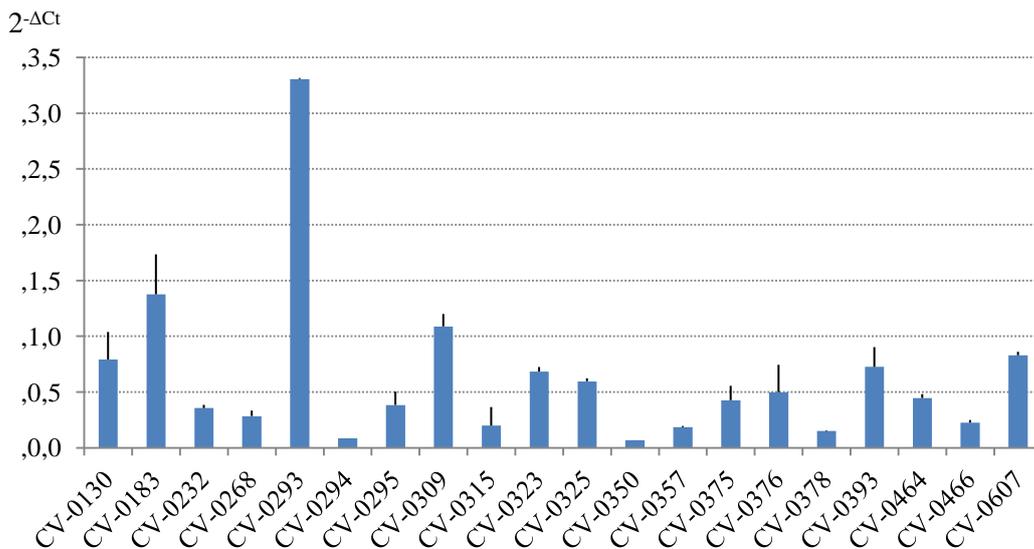


Figura 12: Representación gráfica del promedio+D.E. del grado de expresión del gen *PSA*, relativo al grado de expresión del gen *GAPDH*, para diferentes cepas de *Bacteroides*, evaluado a partir de los valores obtenidos en la PCR cuantitativa utilizando el algoritmo $2^{-\Delta C_t}$.

En la Tabla 25 se muestra el grado de expresión del gen *PSA* de las diferentes cepas de *Bacteroides* spp. relativa al grado de expresión del gen *GAPDH* utilizando el algoritmo $2^{-\Delta C_t}$. Como puede verse, se pudieron observar significativas diferencias en el grado de expresión del gen *PSA* entre las diferentes cepas. Así, en el caso de la cepa CV-0293 de *B. fragilis*, el gen de la *PSA* se expresó $3,307 \pm 0,008$ veces más que el gen *GAPDH*. Por el contrario, en el caso de la cepa CV-0315, también de *B. fragilis*, el gen *PSA* se expresó $0,199 \pm 0,166$ veces el grado de expresión del gen *GAPDH*. En la Figura 12 vemos la representación gráfica del grado de expresión del *PSA*.

Como se tenía el resultado del grado de sensibilidad de la primera batería de antimicrobianos cuando se abordó este estudio y, como se verá más adelante, el perfil de resistencias resultó una criba muy restrictiva a la hora de seleccionar posibles cepas probióticas; en el análisis del grado de expresión del gen *PSA*, el número de cepas de *Bacteroides* analizadas sólo abarcó a las 20 con los perfiles máximos de sensibilidad.

Teniendo en cuenta que los polisacáridos zwitteriónicos, como el *PSA*, son antígenos células-T dependientes que intervienen en la proliferación de Linfocitos T CD4+ *in vitro* (Brubaker *et al.*, 1999; Sommese *et al.*, 2012) y dirigen la maduración física y celular del desarrollo del sistema inmune, el grado de expresión del gen *PSA* puede ser un parámetro a tener en cuenta a la hora de seleccionar cepas con posible efecto probiótico.

4. ESTUDIO DE LOS PERFILES DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

4.1. Primera serie de antibióticos

Inicialmente se analizó una primera serie de antibióticos que correspondían a las moléculas más representativas de las familias básicas de antibióticos utilizadas en producción animal.

Los antibióticos que se probaron fueron: gentamicina (GEN), tetraciclina (TCY), tilosina (TYL), amoxicilina (AMX), ceftiofur (TIO), rifampicina (RIF) y colistina (COL).

Los resultados obtenidos pueden verse en la Tabla 26.

Teniendo en cuenta que la resistencia a aminoglucósidos debe considerarse intrínseca para los anaerobios estrictos (Lambert and O'Grady, 1992) y que colistina es una polimixina para la que *Bacteroides fragilis* es constitutivamente resistente (Lambert and O'Grady, 1992), 35 cepas de la Tabla 26 (remarcadas en negrita) se mantuvieron como posible probiótico, por su bajo perfil de resistencia a antimicrobianos.

Las cepas CV-0315 y CV-0323 se han mantenido como posibles candidatas ya que su perfil de resistencias se limita a gentamicina y colistina y corresponden a dos *B. fragilis* que se aislaron en el 2003 en los estudios iniciales sobre enteropatía, en los que vimos que ambas reducían la tasa de mortalidad de los animales infectados en un 50%.

En resumen, tras esta primera criba de sensibilidad a antibióticos el conjunto inicial de cepas se redujo a 9 cepas de *B. fragilis*, 10 cepas de *B. thetaiotaomicron*, 11 cepas de *B. acidifaciens*, 2 cepas de *B. vulgatus*, 1 cepa de *B. dorei*, 1 cepa de *B. xylanosolvens* y 1 cepa de *B. fluxus*

Tras la eliminación de las cepas PSA negativas redujimos las posibles cepas probióticas a 20. Esta reducción probablemente fue muy estricta ya que, como veremos más tarde, el criterio de la presencia del gen PSA puede que no sea el único indicador del potencial de estimulación del sistema inmunitario asociado a la mucosa intestinal.

Tabla 26: N° de cepa, la especie de *Bacteroides* a que corresponde, el antibiótico probado y su resultado en categorías sensible (S), intermedio (I) y resistente (R) según el CLSI. En la siguiente columna el n° de antibióticos para los que la cepa es resistente/ sensible/ intermedia. En la última columna de la derecha tenemos el resultado de la presencia (+) o no (-) del gen que codifica para el PSA. (GEN=gentamicina, TCY=tetraciclina, TYL=tilosina, AMX=amoxicilina, TIO=ceftiofur, RIF=rifampicina, COL=colistina). Las coincidencias de color indican la misma categoría del grado de susceptibilidad en la columna R/S/I.

Cepa	Especie	GEN	TCY	TYL	AMX	TIO	RIF	COL	R/S/I	PSA
CV-0001	<i>B. fragilis</i>	R	S	S	I	I	S	R	2/3/2	+
CV-0125	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	S	R	S	I	S	R	3/3/1	+
CV-0126	<i>B. vulgatus</i>	R	R	S	S	S	S	R	3/4/0	-
CV-0129	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	R	R	R	R	S	R	6/1/0	-
CV-0130	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	S	S	S	R	S	R	3/4/0	+
CV-0131	<i>B. fragilis</i>	R	S	R	S	I	S	R	3/3/1	+
CV-0183	<i>B. dorei</i>	R	S	S	S	I	S	R	2/4/1	+
CV-0184	<i>B. dorei</i>	R	R	I	S	I	S	S	2/3/2	+
CV-0185	<i>B. fragilis</i>	R	S	R	I	S	S	R	3/3/1	+
CV-0222	<i>B. vulgatus</i>	R	R	I	I	I	S	R	3/1/3	+
CV-0225	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	S	I	S	R	S	R	3/3/1	+
CV-0227	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	S	S	S	R	S	R	3/4/0	-
CV-0228	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	S	S	S	R	S	R	3/4/0	-
CV-0229	<i>B. xylanisolvans</i>	R	R	S	S	R	S	R	4/3/0	-
CV-0230	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	S	S	S	R	S	R	3/4/0	-
CV-0231	<i>B. xylanisolvans</i>	R	R	S	R	R	S	R	5/2/0	+
CV-0232	<i>B. fragilis</i>	R	R	S	S	S	S	R	3/4/0	+
CV-0234	<i>B. intestinalis</i>	R	S	S	R	I	S	R	3/3/1	+
CV-0235	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	R	S	I	R	S	R	4/2/1	-
CV-0263	<i>B. fragilis</i>	R	S	R	I	R	S	R	4/2/1	+
CV-0264	<i>B. fragilis</i>	R	R	R	R	I	S	R	5/1/1	+
CV-0265	<i>B. fragilis</i>	R	I	R	I	I	S	R	3/1/3	+
CV-0266	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	R	R	R	R	S	R	6/1/0	+
CV-0267	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	R	R	I	R	S	R	5/1/1	+
CV-0268	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	S	S	S	R	S	R	3/4/0	+
CV-0269	<i>B. fragilis</i>	R	I	R	I	I	S	R	3/1/3	+
CV-0270	<i>B. xylanisolvans</i>	R	S	S	S	R	S	S	2/5/0	-
CV-0271	<i>B. fragilis</i>	R	R	R	I	I	S	R	4/1/2	+
CV-0272	<i>B. fragilis</i>	R	R	R	I	S	S	R	4/3/1	+
CV-0273	<i>B. massiliensis</i>	R	R	S	I	S	S	R	3/3/1	+
CV-0274	<i>B. massiliensis</i>	R	R	I	I	S	S	R	3/2/2	-
CV-0275	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	R	I	I	R	S	R	4/1/2	-
CV-0276	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	S	S	I	R	S	R	3/3/1	-
CV-0277	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	R	R	I	R	S	R	5/1/1	-
CV-0278	<i>B. vulgatus</i>	R	R	S	R	S	S	R	4/3/0	-
CV-0293	<i>B. fragilis</i>	R	S	S	S	S	S	R	2/5/0	+
CV-0294	<i>B. fragilis</i>	R	S	S	I	S	S	R	2/4/1	+
CV-0295	<i>B. fragilis</i>	R	S	S	S	S	S	R	2/5/0	+
CV-0305	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	S	S	I	R	S	R	3/3/1	+
CV-0307	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	S	S	I	R	S	R	3/3/1	-
CV-0308	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	S	S	I	R	S	R	3/3/1	-
CV-0309	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	S	S	S	R	S	R	3/4/0	+
CV-0310	<i>B. fragilis</i>	R	S	R	I	S	S	R	3/3/1	+
CV-0315	<i>B. fragilis</i>	R	S	S	I	I	S	R	2/3/2	+
CV-0317	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	R	S	S	I	S	S	2/4/1	-
CV-0323	<i>B. fragilis-</i>	R	S	S	I	I	S	R	2/3/2	+
CV-0324	<i>B. fragilis</i>	R	I	R	R	R	S	R	5/1/1	-
CV-0325	<i>B. fragilis</i>	R	R	S	S	S	S	R	3/4/0	+
CV-0332	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	S	S	S	I	S	R	2/4/1	-
CV-0333	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	S	S	R	R	S	R	4/3/0	+
CV-0335	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	S	S	S	I	S	R	2/4/1	-
CV-0336	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	R	S	S	S	S	R	3/4/0	-
CV-0337	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	S	S	I	R	S	R	3/3/1	-
CV-0339	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	R	S	S	R	S	R	4/3/0	-

CV-0340	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	R	S	S	R	S	R	4/3/0	-
CV-0341	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	R	S	S	I	S	R	3/3/1	+
CV-0342	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	R	R	S	S	S	R	4/3/0	+
CV-0345	<i>B. vulgatus</i>	R	R	S	S	S	S	R	3/4/0	-
CV-0348	<i>B. acidifaciens</i>	R	S	S	I	R	S	R	3/3/1	+
CV-0349	<i>B. acidifaciens</i>	R	S	S	S	R	S	R	3/4/0	-
CV-0350	<i>B. acidifaciens</i>	R	S	S	S	R	S	R	3/4/0	+
CV-0351	<i>B. acidifaciens</i>	R	R	S	I	S	S	R	3/3/1	+
CV-0352	<i>B. acidifaciens</i>	R	R	S	I	I	S	R	3/2/2	+
CV-0357	<i>B. acidifaciens</i>	R	S	S	S	S	S	R	2/5/0	+
CV-0360	<i>B. acidifaciens</i>	R	S	I	S	S	S	R	2/4/1	-
CV-0361	<i>B. acidifaciens</i>	R	S	S	I	R	S	R	3/3/1	+
CV-0363	<i>B. acidifaciens</i>	R	S	S	R	R	S	R	4/3/0	+
CV-0365	<i>B. acidifaciens</i>	R	S	S	S	I	S	R	2/4/1	-
CV-0367	<i>B. acidifaciens</i>	R	S	I	S	R	S	R	3/3/1	-
CV-0368	<i>B. acidifaciens</i>	R	S	S	I	R	S	R	3/3/1	-
CV-0369	<i>B. acidifaciens</i>	R	S	S	S	R	S	R	3/4/0	-
CV-0370	<i>B. acidifaciens</i>	R	S	R	I	R	S	R	4/2/1	+
CV-0371	<i>B. acidifaciens</i>	R	R	R	S	I	S	R	4/2/1	-
CV-0372	<i>B. acidifaciens</i>	R	S	S	I	R	S	R	3/3/1	-
CV-0373	<i>B. acidifaciens</i>	R	R	S	I	I	S	R	3/2/2	+
CV-0374	<i>B. acidifaciens</i>	R	R	S	S	I	S	S	2/4/1	-
CV-0375	<i>B. acidifaciens</i>	R	S	S	S	I	S	R	2/4/1	+
CV-0376	<i>B. acidifaciens</i>	R	I	R	S	S	S	S	2/4/1	+
CV-0377	<i>B. fragilis</i>	R	S	S	R	I	S	R	3/3/1	+
CV-0378	<i>B. fragilis</i>	R	S	S	I	S	S	R	2/4/1	+
CV-0379	<i>B. vulgatus</i>	R	R	S	I	R	S	R	4/2/1	+
CV-0380	<i>B. acidifaciens</i>	R	S	S	I	R	S	R	3/3/1	+
CV-0384	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	I	R	S	S	S	R	3/3/1	+
CV-0389	<i>B. fragilis</i>	R	S	S	I	I	S	R	2/3/2	+
CV-0390	<i>B. acidifaciens</i>	R	R	S	S	I	S	R	3/3/1	+
CV-0391	<i>B. fragilis</i>	R	S	S	I	I	S	R	2/3/2	-
CV-0392	<i>B. fragilis</i>	R	S	R	S	I	S	R	3/3/1	+
CV-0393	<i>B. fragilis</i>	R	S	S	I	S	S	R	2/4/1	+
CV-0394	<i>B. acidifaciens</i>	R	R	R	I	R	S	R	5/1/1	+
CV-0395	<i>B. fragilis</i>	R	S	R	S	I	S	R	3/3/1	+
CV-0396	<i>B. fragilis</i>	R	S	S	I	I	S	R	2/3/2	+
CV-0464	<i>B. acidifaciens</i>	R	S	S	S	I	S	R	2/4/1	+
CV-0466	<i>B. fluxus</i>	R	S	S	S	I	S	R	2/4/1	+
CV-0586	<i>B. fragilis</i>	R	R	R	I	I	S	R	4/1/2	+
CV-0587	<i>B. fragilis</i>	R	R	R	S	S	S	R	4/3/0	+
CV-0606	<i>B. fragilis</i>	R	R	R	S	S	S	R	4/3/0	+
CV-0607	<i>B. acidifaciens</i>	R	S	S	I	S	S	R	2/4/1	+

4.2. Segunda serie de antibióticos

Sobre las 20 cepas que pasaron el criterio de corte del perfil de sensibilidad y fueron positivas al gen *PSA*, se hicieron antibiogramas complementarios.

En este caso, los antibióticos probados fueron: ácido nalidíxico (NAL), cloranfenicol (Strandberg *et al.*), lincomicina (LIN), eritromicina (ERI), penicilina (PEN), bacitracina (BAC), nitrofurantoina (NIT), enrofloxacina (Henriksson *et al.*), sulfonamida (SUL), fosfomicina (Fotiadis *et al.*), clindamicina (CLI) y teicoplanina (TEC).

Como en los antibiogramas anteriores el resultado se puede ver en la Tabla 27.

Tabla 27: N° de cepa, la especie de *Bacteroides* a que corresponde, el antibiótico probado y su resultado en categorías sensible (S), intermedio (I) y resistente (R) según el CLSI. (NAL=ácido nalidíxico, CHL=cloranfenicol, LIN=lincomicina, ERI=eritromicina, PEN=penicilina, BAC=bacitracina, NIT=nitrofurantoina, ENR=enrofloxacin, SUL=sulfonamida, FOS=fosfomicina, CLI=clindamicina, TEC=teicoplanina).

Cepa	Especie	NAL	CHL	LIN	ERI	PEN	BAC	NIT	ENR	SUL	FOS	CLI	TEC
CV-0130	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	S	R	R	R	R	S	I	S	R	R	R
CV-0183	<i>B. dorei</i>	R	S	R	R	I	S	S	I	S	R	S	S
CV-0232	<i>B. fragilis</i>	R	S	S	R	R	R	S	I	S	R	S	I
CV-0268	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	S	S	R	R	I	S	I	S	R	R	R
CV-0293	<i>B. fragilis</i>	R	S	S	R	R	R	S	I	S	R	R	R
CV-0294	<i>B. fragilis</i>	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R
CV-0295	<i>B. fragilis</i>	R	S	S	R	R	I	S	R	R	R	R	I
CV-0309	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	S	R	R	R	I	S	I	S	R	R	R
CV-0315	<i>B. fragilis</i>	R	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	I
CV-0323	<i>B. fragilis</i>	R	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	I
CV-0325	<i>B. fragilis</i>	R	S	S	I	R	R	S	S	S	R	S	I
CV-0350	<i>B. acidifaciens</i>	R	S	I	R	I	I	S	I	S	R	R	R
CV-0357	<i>B. acidifaciens</i>	R	S	R	R	I	S	S	I	I	R	R	I
CV-0375	<i>B. acidifaciens</i>	R	S	S	R	I	S	S	R	S	R	R	R
CV-0376	<i>B. acidifaciens</i>	R	S	R	R	I	S	S	I	S	R	R	I
CV-0378	<i>B. fragilis</i>	R	S	S	R	R	R	S	I	S	R	S	R
CV-0393	<i>B. fragilis</i>	R	S	S	I	R	R	S	S	S	R	S	R
CV-0464	<i>B. acidifaciens</i>	R	S	R	R	R	S	S	I	S	R	R	S
CV-0466	<i>B. fluxus</i>	R	S	R	S	S	S	S	I	S	R	S	I
CV-0607	<i>B. acidifaciens</i>	R	S	R	I	I	I	S	I	S	R	R	R

En la Tabla 27 puede verse que todas las cepas analizadas fueron resistentes al ácido nalidíxico y a la fosfomicina. Además, se aprecia que la mayoría de cepas fueron resistentes a penicilina, a eritromicina, a bacitracina, a clindamicina y a teicoplanina. Quitando la resistencia a fosfomicina, que es característica del género *Bacteroides* y sirve para diferenciarla de otras bacterias de la familia Bacteroidaceae (García *et al.*, 1997), la resistencia a nalidíxico, si consideramos que las quinolonas no son activas frente a anaerobios (Hecht, 2004), y la resistencia a penicilina, que es sobrepasada utilizando inhibidores de β -lactamasas (Hecht, 2004); las otras resistencias son claramente limitantes a la hora de seleccionar posibles cepas probióticas.

5. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD A COCCIDIOSTÁTICOS

Así como en el caso de los antibacterianos, la situación ideal para ser candidato a probiótico es que sea sensible a todos los antimicrobianos testados, en el caso de los

coccidiostáticos, por el sistema de producción actual, en el que se incluyen coccidiostáticos en el pienso de los animales de forma sistemática, son deseables cepas que sean resistentes.

Los coccidiostáticos analizados fueron: nicarbazina, diclazuril (DIC), monensina (MON), narasin (NAR) y salinomicina (SAL). Como se ve en la Tabla 28 todos los *Bacteroides* spp. analizados fueron resistentes a los coccidiostáticos probados.

Tabla 28: N° de cepa, la especie de *Bacteroides* a que corresponde, el coccidiostático probado y su resultado en categorías sensible (S), intermedio (I) y resistente (R) según el CLSI. (NIC=nicarbazina, DIC=diclazuril, MON=monensina, NAR=narasina, SAL=salinomicina).

Cepa	Especie	NIC	DIC	MON	NAR	SAL
CV-0130	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	R	R	R	R
CV-0183	<i>B. dorei</i>	R	R	R	R	R
CV-0232	<i>B. fragilis</i>	R	R	R	R	R
CV-0268	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	R	R	R	R
CV-0293	<i>B. fragilis</i>	R	R	R	R	R
CV-0294	<i>B. fragilis</i>	R	R	R	R	R
CV-0295	<i>B. fragilis</i>	R	R	R	R	R
CV-0309	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	R	R	R	R
CV-0315	<i>B. fragilis</i>	R	R	R	R	R
CV-0323	<i>B. fragilis</i>	R	R	R	R	R
CV-0325	<i>B. fragilis</i>	R	R	R	R	R
CV-0350	<i>B. acidifaciens</i>	R	R	R	R	R
CV-0357	<i>B. acidifaciens</i>	R	R	R	R	R
CV-0375	<i>B. acidifaciens</i>	R	R	R	R	R
CV-0376	<i>B. acidifaciens</i>	R	R	R	R	R
CV-0378	<i>B. fragilis</i>	R	R	R	R	R
CV-0393	<i>B. fragilis</i>	R	R	R	R	R
CV-0464	<i>B. acidifaciens</i>	R	R	R	R	R
CV-0466	<i>B. fluxus</i>	R	R	R	R	R
CV-0607	<i>B. acidifaciens</i>	R	R	R	R	R

Inicialmente, los resultados del grado de sensibilidad a coccidiostáticos permitirían la incorporación de las cepas de la Tabla anterior a la mayoría de piensos utilizados actualmente en los animales de producción.

6. PRODUCCIÓN DE MUCINASA

6.1. Estudio de la presencia o ausencia del gen de mucinasa

En la Tabla siguiente se puede ver que algunas cepas de *Bacteroides* no presentaron amplificación con ninguna combinación de cebadores para los genes de producción de mucinasas, mientras sólo una, la cepa CV-0309 de *B. thetaiotaomicron*, amplificó con las tres combinaciones probadas.

Tabla 29: N° de cepa, la especie de *Bacteroides* a que corresponde y resultado de la amplificación por PCR (+=positivo, -=negativo) con los cebadores diseñados a partir de la secuencia del gen de la mucinasa de *B. thetaiotaomicron* (1=MucBT-F, 2=MucBT-R, 3=MucBTCom-F, 4=MucBTCom01-R, 5=MucBTCom02-R, pb=pares de bases del amplicón).

Cepa	Especie	Combinación de cebadores		
		1+2 (600 pb)	3+4 (330 pb)	3+5 (360 pb)
CV-0130	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-	+	+
CV-0183	<i>B. dorei</i>	-	+	-
CV-0232	<i>B. fragilis</i>	-	-	+
CV-0268	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-	+	+
CV-0293	<i>B. fragilis</i>	-	+	+
CV-0294	<i>B. fragilis</i>	-	-	-
CV-0295	<i>B. fragilis</i>	-	-	-
CV-0309	<i>B. thetaiotaomicron</i>	+	+	+
CV-0315	<i>B. fragilis</i>	-	-	-
CV-0323	<i>B. fragilis</i>	-	-	-
CV-0325	<i>B. fragilis</i>	-	-	-
CV-0350	<i>B. acidifaciens</i>	-	-	+
CV-0357	<i>B. acidifaciens</i>	-	+	+
CV-0375	<i>B. acidifaciens</i>	-	-	-
CV-0376	<i>B. acidifaciens</i>	-	-	-
CV-0378	<i>B. fragilis</i>	-	+	-
CV-0393	<i>B. fragilis</i>	-	-	-
CV-0464	<i>B. acidifaciens</i>	-	-	-
CV-0466	<i>B. fluxus</i>	-	-	-
CV-0607	<i>B. acidifaciens</i>	-	-	-

6.2. Estudio del grado de expresión del gen de la mucinasa

Se ha probado, al igual que con el *PSA*, el grado de expresión del gen de la mucinasa con las tres combinaciones de cebadores. Este análisis se realizó únicamente con las cepas que habían dado positivo en el estudio de presencia/ausencia del apartado anterior.

La primera cepa de la tabla (CV-0294) se introdujo como control negativo, ya que había resultado negativa en la PCR convencional para los tres juegos de cebadores de mucinasa.

En el caso contrario, la cepa CV-309, que dio positivo para la PCR de los tres juegos de cebadores de mucinasa, resultó positiva a los tres juegos de cebadores para mucinasa.

Ambas cepas validan el sistema utilizado, aunque también indican significativas diferencias en relación al HKG empleado, con resultados claramente inferiores en el caso del *gyrA*. Es decir, que los tres HKG utilizados no resultaron igualmente eficaces para la valoración de la expresión génica basal de las cepas de *Bacteroides* spp.

Tabla 30: Resultados comparativos de los valores de C_T obtenidos por PCR cuantitativa con los tres juegos de cebadores de mucinasa (1+2, 3+4 y 3+5) y utilizando el algoritmo $2^{-\Delta C_T}$ en relación a los C_T de los tres juegos de cebadores de los posibles HKG (*GAPDH*, *β 70* y *gyr A*).

<i>GAPDH</i>			<i>β 70</i>			<i>gyr A</i>		
Cepa	Cebador	$2^{-\Delta C_T}$	Cepa	Cebador	$2^{-\Delta C_T}$	Cepa	Cebador	$2^{-\Delta C_T}$
CV-0294	1+2	0	CV-0294	1+2	0	CV-0294	1+2	0
CV-0294	3+4	2,467E-07	CV-0294	3+4	0	CV-0294	3+4	0
CV-0294	3+5	0	CV-0294	3+5	0	CV-0294	3+5	0
CV-0309	1+2	1,25E+04	CV-0309	1+2	3,14E-03	CV-0309	1+2	1,16E+00
CV-0309	3+4	7,99E+06	CV-0309	3+4	1,15E-01	CV-0309	3+4	1,67E+00
CV-0309	3+5	1,32E+03	CV-0309	3+5	6,83E-05	CV-0309	3+5	5,14E-03
CV-0130	3+4	ND	CV-0130	3+4	5,16E-05	CV-0130	3+4	1,73E-01
CV-0130	3+5	0	CV-0130	3+5	1,82E-08	CV-0130	3+5	4,29E-08
CV-0268	3+4	6,82E+06	CV-0268	3+4	2,70E-03	CV-0268	3+4	4,46E-01
CV-0268	3+5	7,45E+01	CV-0268	3+5	0	CV-0268	3+5	6,76E-05
CV-0293	3+4	1,58E-05	CV-0293	3+4	0	CV-0293	3+4	4,82E-07
CV-0293	3+5	0	CV-0293	3+5	0	CV-0293	3+5	0
CV-0357	3+4	3,08E-03	CV-0357	3+4	1,70E-06	CV-0357	3+4	5,81E-07
CV-0357	3+5	0	CV-0357	3+5	0	CV-0357	3+5	0
CV-0183	3+4	7,43E-02	CV-0183	3+4	1,40E-02	CV-0183	3+4	4,87E-02
CV-0378	3+4	1,14E-08	CV-0378	3+4	5,58E-09	CV-0378	3+4	6,27E-08
CV-0232	3+5	0	CV-0232	3+5	0	CV-0232	3+5	0
CV-0350	3+5	0	CV-0350	3+5	0	CV-0350	3+5	0

Con el resto de cepas se hizo la PCR cuantitativa para los juegos de cebadores de mucinasa que habían dado positivo en la PCR convencional. Como puede verse en el análisis comparativo de las Tablas 29 y 30, no en todos los caso hay paralelismo entre los resultados obtenidos por PCR convencional y por PCR cuantitativa. Sólo para el juego de cebadores 3+4 el resultado fue coincidente entre ambos tipos de PCR.

7. DETECCIÓN DE GENES PRODUCTORES DE ENTEROTOXINA

El resultado del análisis por PCR con diferentes cebadores descritos en la literatura de la enterotoxina de *B. fragilis* se muestra en la Tabla 31. Como puede verse en la Tabla, todas las reacciones de PCR fueron negativas, lo que descarta claramente la producción de enterotoxina por parte de las cepas de *B. fragilis*, la única descrita para las especies del género *Bacteroides* (Wexler, 2007). El resto de resultados negativos puede obedecer a la falta de reconocimiento de los cebadores utilizados que, como se

ha apuntado en materiales y métodos, están basados en lo publicado por diferentes autores para la enterotoxina de *B. fragilis*.

Tabla 31: Resultado de la amplificación por PCR del gen que codifica la enterotoxina de *B. fragilis* utilizando cuatro cebadores (3+4, 404+407, 01+03 y 03+04) descritos por diferentes autores.

Cepa	Especie	BF/RS 3+4	BF/ENTEROTOX 404+407	BF/ENTEROTOX 01+02	BF/ENTEROTOX 03+04
CV-0130	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-	-	-	-
CV-0183	<i>B. dorei</i>	-	-	-	-
CV-0232	<i>B. fragilis</i>	-	-	-	-
CV-0268	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-	-	-	-
CV-0293	<i>B. fragilis</i>	-	-	-	-
CV-0294	<i>B. fragilis</i>	-	-	-	-
CV-0295	<i>B. fragilis</i>	-	-	-	-
CV-0309	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-	-	-	-
CV-0315	<i>B. fragilis</i>	-	-	-	-
CV-0323	<i>B. fragilis</i>	-	-	-	-
CV-0325	<i>B. fragilis</i>	-	-	-	-
CV-0350	<i>B. acidifaciens</i>	-	-	-	-
CV-0357	<i>B. acidifaciens</i>	-	-	-	-
CV-0375	<i>B. acidifaciens</i>	-	-	-	-
CV-0376	<i>B. acidifaciens</i>	-	-	-	-
CV-0378	<i>B. fragilis</i>	-	-	-	-
CV-0393	<i>B. fragilis</i>	-	-	-	-
CV-0464	<i>B. acidifaciens</i>	-	-	-	-
CV-0466	<i>B. fluxus</i>	-	-	-	-
CV-0607	<i>B. acidifaciens</i>	-	-	-	-

No obstante, realizamos el análisis de las cepas de las otras especies de *Bacteroides* con los cebadores de la enterotoxina de *B. fragilis*, al existir referencias de que el gen de la enterotoxina está inmerso en una isla de patogenicidad, junto a un transposón conjugativo, que puede movilizarse y transferirse a otras cepas no enterotoxigénicas (Franco, 2004). Los resultados negativos obtenidos descartan esta posible transferencia en las cepas de las otras especies de *Bacteroides* examinadas.

8. DETECCIÓN DE GENES RESISTENCIA

Inicialmente utilizamos los cebadores que ya habíamos utilizado en estudios previos de genes de resistencias para *Enterococcus* y *Escherichia coli*.

Los resultados como se indica en la Tabla 32 fueron negativos para *ermF* (resistencia a eritromicina) y *tetM* (resistencia a tetraciclina) de *Enterococcus* spp. y *tetA* y *tetM* de *E. coli*, ambos codificantes de resistencia a tetraciclina.

Tabla 32: Resultados de diferentes cepas de *Bacteroides* spp. obtenidos por PCR utilizando cebadores específicos para la detección de genes de resistencia en *Enterococcus* spp. (*ermF*=resistencia a eritromicina, *tetM*=resistencia a tetraciclina) y *E. coli* (*tetA*=resistencia a tetraciclina, *tetM*=resistencia a tetraciclina).

Cepa	Especie	<i>ermF</i>	<i>tetM</i> /entero	<i>tetA</i>	<i>tetM</i> /coli
CV-0130	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-	-	-	-
CV-0183	<i>B. dorei</i>	-	-	-	-
CV-0232	<i>B. fragilis</i>	-	-	-	-
CV-0268	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-	-	-	-
CV-0293	<i>B. fragilis</i>	-	-	-	-
CV-0294	<i>B. fragilis</i>	-	-	-	-
CV-0295	<i>B. fragilis</i>	-	-	-	-
CV-0309	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-	-	-	-
CV-0315	<i>B. fragilis</i>	-	-	-	-
CV-0323	<i>B. fragilis</i>	-	-	-	-
CV-0325	<i>B. fragilis</i>	-	-	-	-
CV-0350	<i>B. acidifaciens</i>	-	-	-	-
CV-0357	<i>B. acidifaciens</i>	-	-	-	-
CV-0375	<i>B. acidifaciens</i>	-	-	-	-
CV-0376	<i>B. acidifaciens</i>	-	-	-	-
CV-0378	<i>B. fragilis</i>	-	-	-	-
CV-0393	<i>B. fragilis</i>	-	-	-	-
CV-0464	<i>B. acidifaciens</i>	-	-	-	-
CV-0466	<i>B. fluxus</i>	-	-	-	-
CV-0607	<i>B. acidifaciens</i>	-	-	-	-

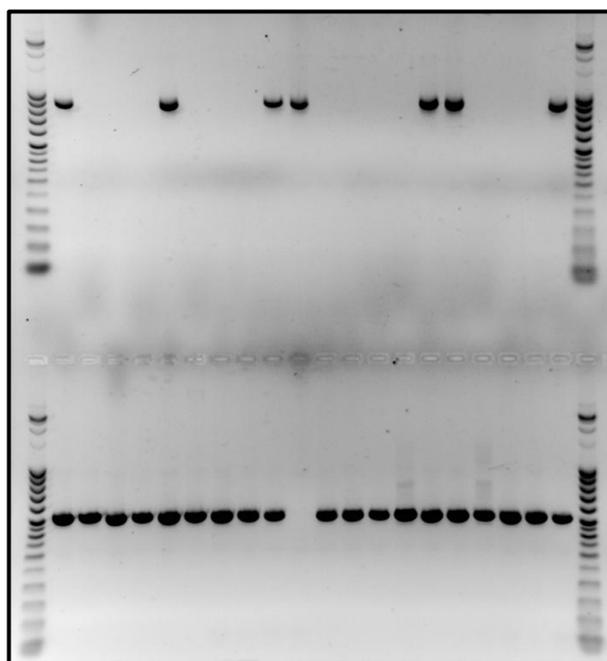


Figura 13: Gel B-1419. En la parte superior del gel tenemos las bandas correspondientes al gen *cepA* de 911 pb de resistencia a cefalosporinas. En la parte inferior todas las cepas analizadas excepto una (CV-0325) tienen la banda de 516 pb correspondiente al gen de resistencia a tetraciclina *tetQ*. En los cuatro extremos el control de Pm Step Ladder 50 (Sigma).

Sin embargo, utilizando cebadores específicos para la detección de genes de resistencias de *Bacteroides* se detectaron diferentes marcadores de resistencia (Figura 13 y Tabla 33).

En la Tabla 33 podemos ver que de las 20 cepas de *Bacteroides* spp.: 19 poseen el gen *tetQ* y ninguna el gen *cfxA*; el gen *cepA* lo encontramos en siete cepas y el gen *ermF* únicamente en una cepa.

Tabla 33: Resultados de diferentes cepas de *Bacteroides* spp. obtenidos por PCR utilizando cebadores específicos para la detección de genes de resistencia en *Bacteroides* spp. (*cfxA*=resistencia a cefalosporinas, *cepA*=resistencia a β -lactámicos, *tetQ*=resistencia a tetraciclinas, *ermF*=resistencia a clindamicina).

Cepa	Especie	<i>cfxA</i>	<i>cepA</i>	<i>tetQ</i>	<i>ermF</i>
CV-0130	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-	-	+	-
CV-0183	<i>B. dorei</i>	-	-	+	-
CV-0232	<i>B. fragilis</i>	-	+	+	-
CV-0268	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-	-	+	-
CV-0293	<i>B. fragilis</i>	-	-	+	-
CV-0294	<i>B. fragilis</i>	-	+	+	-
CV-0295	<i>B. fragilis</i>	-	-	+	-
CV-0309	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-	-	+	-
CV-0315	<i>B. fragilis</i>	-	+	+	-
CV-0323	<i>B. fragilis</i>	-	+	+	-
CV-0325	<i>B. fragilis</i>	-	+	-	-
CV-0350	<i>B. acidifaciens</i>	-	-	+	-
CV-0357	<i>B. acidifaciens</i>	-	-	+	-
CV-0375	<i>B. acidifaciens</i>	-	-	+	+
CV-0376	<i>B. acidifaciens</i>	-	-	+	-
CV-0378	<i>B. fragilis</i>	-	+	+	-
CV-0393	<i>B. fragilis</i>	-	+	+	-
CV-0464	<i>B. acidifaciens</i>	-	-	+	-
CV-0466	<i>B. fluxus</i>	-	-	+	-
CV-0607	<i>B. acidifaciens</i>	-	-	+	-

En el caso del gen *tetQ* se observa una clara discrepancia con los resultados de las CMI (Tabla 26), ya que la mayoría de cepas son portadoras del gen, mientras que la mayoría de cepas fueron sensibles a tetraciclina. Además, la única cepa negativa al gen *tetQ* (cepa CV-0325) fue una de las dos cepas resistentes a tetraciclina (Tabla 26). Como en nuestro caso, el gen *tetQ* es altamente prevalente en aislados de *Bacteroides* (Eitel *et al.*, 2013), aunque en las cepas analizadas no parece ser funcional. Un resultado similar, aunque no tan extremo como en nuestro caso, ha sido reportado por Nakano *et al.* (2011); en este trabajo observaron que el 79,8% de las cepas de *Bacteroides* spp. analizadas presentaban el gen *tetQ*, mientras que sólo el 53,5% de las cepas presentaron el fenotipo de resistencia a tetraciclinas (Nakano *et al.*, 2011).

En el caso de *ermF* sólo la cepa CV-0375 fue positiva, mientras que 14 de las 20 cepas analizadas presentaron el fenotipo de resistencia a clindamicina. En el mismo trabajo de Nakano *et al.* (2011) observaron que el gen *ermF* estaba presente en el 8,8% de las cepas de *Bacteroides* spp. analizadas mientras que el 34,2% de las cepas

presentaron el fenotipo de resistencia a clindamicina. Este fenotipo puede explicarse por la presencia de otros genes: *ermB*, *ermG* y *ermS* (Hecht, 2004; Nakano *et al.*, 2011).

Las 7 cepas en las que se demostró el gen *cepA* pertenecían a la especie *B. fragilis*, y representan el 77,8% de los *B. fragilis* analizados, porcentaje similar al obtenido por Nakano *et al.* (2011). Como puede verse en las Tablas 26 y 27, aunque las cepas *cepA*⁺ fueron resistentes a penicilina, ninguna presentó el fenotipo de resistencia a amoxicilina o a ceftiofur. No obstante, en 5 cepas de las 7 cepas *cepA*⁺ el grado de sensibilidad a amoxicilina estuvo disminuido y sólo dos mostraron menor sensibilidad al ceftiofur (fenotipo I).

La presencia de los marcadores de resistencia detectados puede utilizarse, en el futuro, para hacer el seguimiento de los sistemas de eliminación de resistencias en los candidatos a probióticos (cura de plásmidos, crecimiento en condiciones energéticamente desfavorables para las cepas resistentes...) y para analizar el riesgo de transmisión de dichos marcadores a bacterias del género *Bacteroides* o a otras bacterias intestinales.

9. ESTUDIO DE SECUENCIAS DE INSERCIÓN

Como puede verse en la Tabla 34, en ninguna de las cepas estudiadas se pudieron detectar las secuencias de inserción examinadas.

Tabla 34: Resultados de las cepas analizadas de *Bacteroides* spp. obtenidos por PCR utilizando cebadores específicos para la detección de tres diferentes secuencias de inserción..

Cepa	Especie	IS4351	IS942	IS1186
CV-0130	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-	-	-
CV-0183	<i>B. dorei</i>	-	-	-
CV-0232	<i>B. fragilis</i>	-	-	-
CV-0268	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-	-	-
CV-0293	<i>B. fragilis</i>	-	-	-
CV-0294	<i>B. fragilis</i>	-	-	-
CV-0295	<i>B. fragilis</i>	-	-	-
CV-0309	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-	-	-
CV-0315	<i>B. fragilis</i>	-	-	-
CV-0323	<i>B. fragilis</i>	-	-	-
CV-0325	<i>B. fragilis</i>	-	-	-
CV-0350	<i>B. acidifaciens</i>	-	-	-
CV-0357	<i>B. acidifaciens</i>	-	-	-
CV-0375	<i>B. acidifaciens</i>	-	-	-
CV-0376	<i>B. acidifaciens</i>	-	-	-
CV-0378	<i>B. fragilis</i>	-	-	-
CV-0393	<i>B. fragilis</i>	-	-	-
CV-0464	<i>B. acidifaciens</i>	-	-	-
CV-0466	<i>B. fluxus</i>	-	-	-
CV-0607	<i>B. acidifaciens</i>	-	-	-

La ausencia de las secuencias de inserción analizadas, las más frecuentes en *Bacteroides* spp. (Podglajen *et al.*, 1995), implican mayor estabilidad de las cepas analizadas ya que las secuencias de inserción, junto con los transposones, son fuente de variabilidad, al inactivar genes por inserción o activarlos por la presencia de potentes promotores que favorecen la transcripción de genes adyacentes. Además, en los movimientos de transposición se pueden producir deleciones o inserciones de genes al movilizarse las secuencias de inserción.

Como las *IS942* y *IS1186* están asociadas a la expresión de los genes *cepA* y *cfiA* en *Bacteroides* spp (Hecht, 2004; Nakano *et al.*, 2011; Podglajen *et al.*, 1995), su ausencia puede explicar la baja proporción de resistencias a penicilinas y cefalosporinas.

10. ESTUDIOS *IN VIVO*

Tras las pruebas *in vitro* precedentes escogimos cuatro cepas para los estudios *in vivo*. Tres de ellas, las cepas CV-0183 (*B. dorei*), CV-0293 (*B. fragilis*) y CV-0607 (*B. acidifaciens*) fueron elegidas por la producción de sustancias antibacterianas y de PSA, el perfil de sensibilidad a antibióticos y la ausencia del gen de enterotoxina. La cuarta cepa, la CV-0315 (*B. fragilis*), aunque habría quedado fuera por los criterios de selección utilizados, se introdujo en los estudios *in vivo* por haber dado resultados positivos –reducción del 50% en las tasas de mortalidad– en pruebas previas contra la Enteropatía Epizootica del Conejo.

10.1. Análisis de los perfiles de microbiota intestinal por RFLP

En las Figuras 14 y 15 se puede observar, respectivamente, el dendrograma y la matriz de similitudes relativas, en escala de colores, construidos a partir de los densitogramas del perfil electroforético obtenido por RFLP, con cuatro enzimas de restricción diferentes (*AluI*, *RsaI*, *HpaII*, *CfoI*), de los fragmentos amplificados por PCR del 16S rDNA bacteriano a partir del DNA total extraído de los contenidos ileales y cecales de cada uno de los animales inoculados con las diferentes cepas de *Bacteroides* spp (CV-0183, CV-0293, CV-0315 o CV-0607) o inoculados con agua de peptona tamponada (C neg).

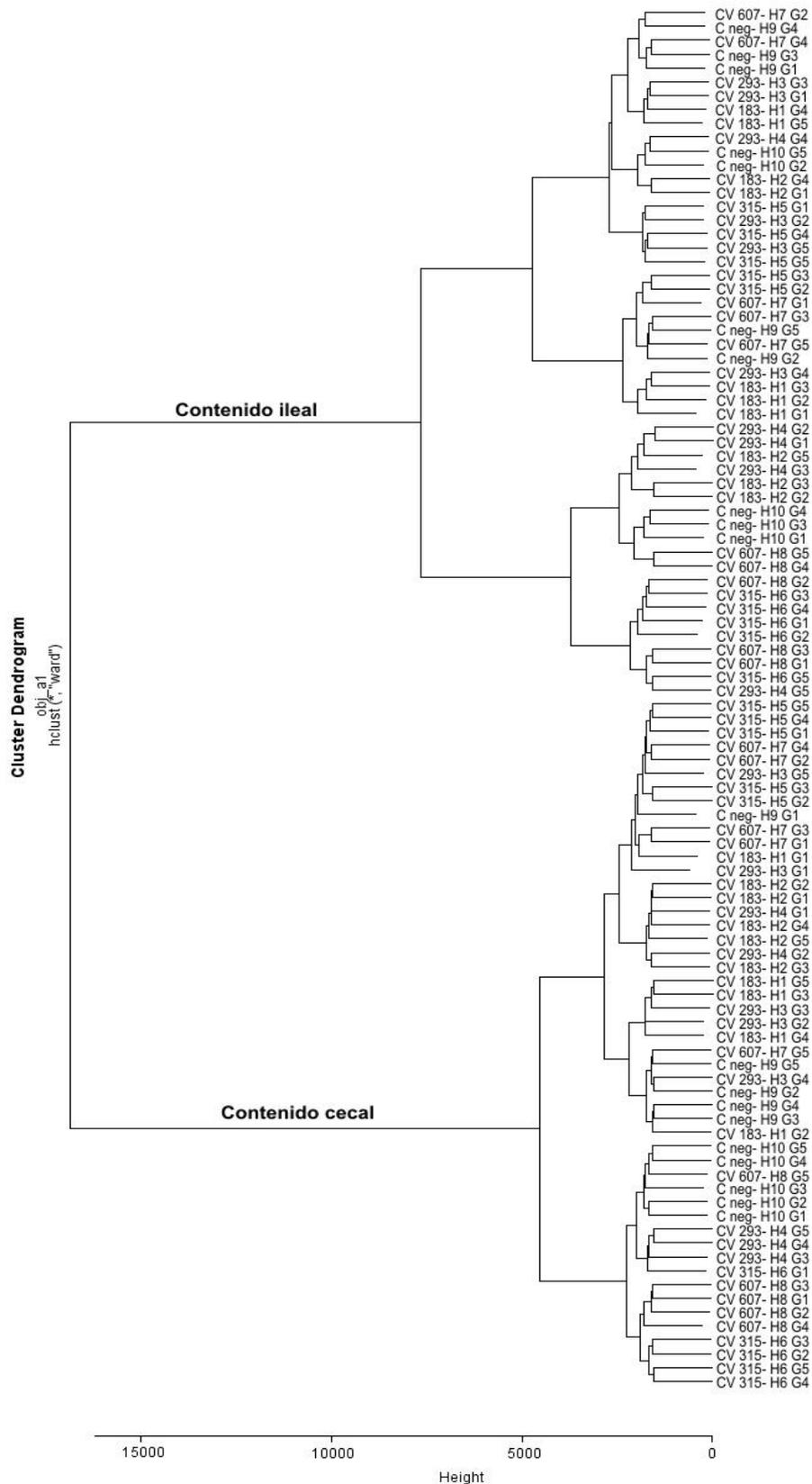


Figura 14: Dendrograma del grado de similitud (mayor cuanto menor cifra en la escala inferior del gráfico) construido a partir de los densitogramas electroforéticos obtenidos por RFLP de los contenidos ileales y cecales de los gazapos analizados (G1-G5) de cada una de las hembras (H1-H10) e inoculados con las diferentes cepas de *Bacteroides* spp (CV-0183, CV-0293, CV-0315 o CV-0607) o inoculados con agua de peptona tamponada (C neg).

De ambas figuras puede inferirse que los perfiles RFLP de las muestras ileales y cecales son claramente diferentes y que existe alta correlación entre los perfiles de los cinco animales de cada una de las hembras (bloques de 5x5 más cercanos a la diagonal de la matriz de la Figura 15).

De la Figura 15 se desprende también que hubo mayor similitud entre los perfiles RFLP de la microbiota del ciego (bloque de 50x50 de arriba a la izquierda) que entre los perfiles RFLP de la microbiota del íleon (bloque de 50x50 de abajo a la derecha de la Figura 15).

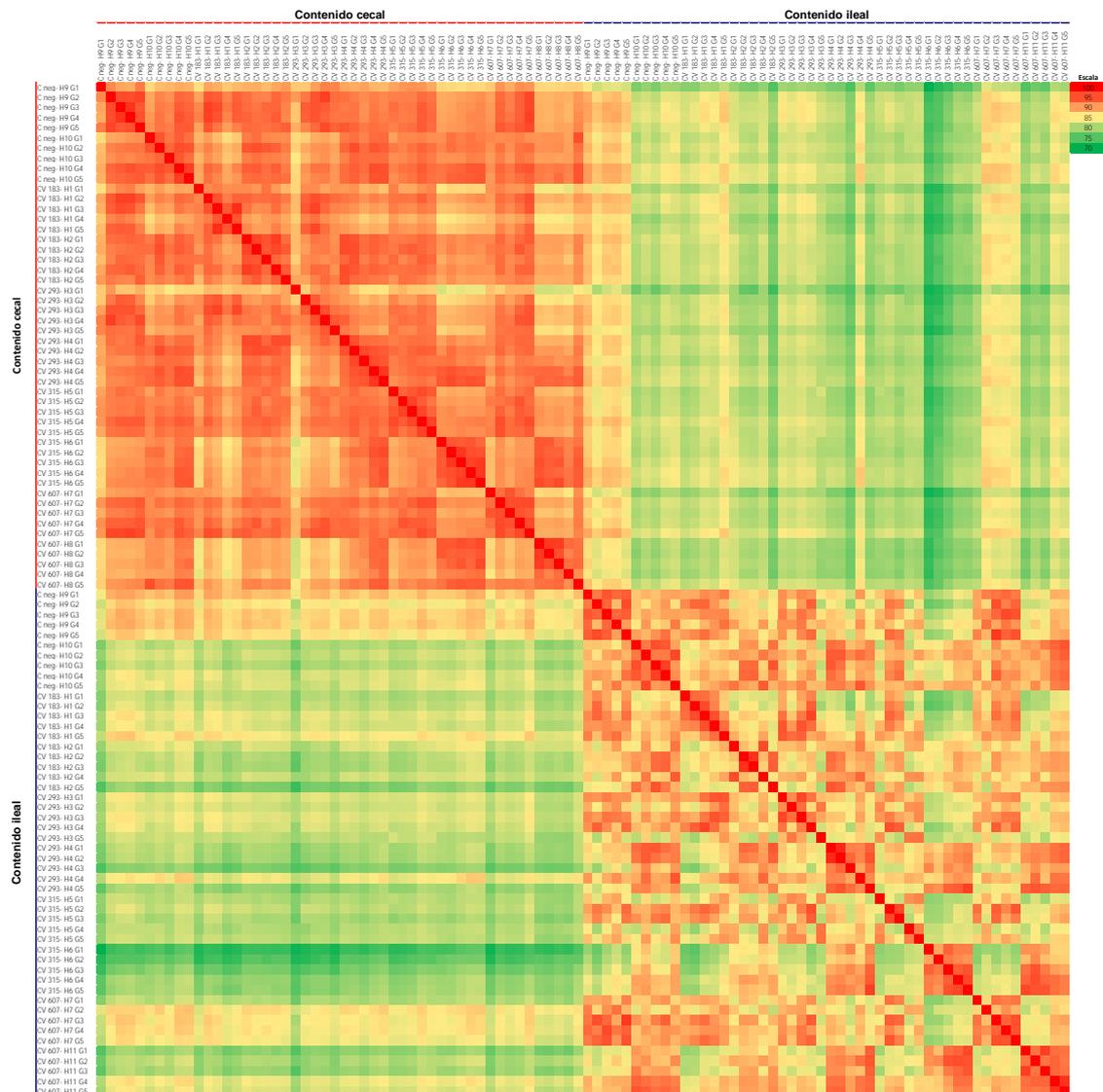


Figura 15: Matriz de similitud relativa, utilizando la escala de colores de la derecha, entre los densitogramas electroforéticos obtenidos por RFLP de los contenidos ileales y cecales de los gazapos analizados (G1-G5) de cada una de las hembras (H1-H10) e inoculados con las diferentes cepas de *Bacteroides* spp (CV-0183, CV-0293, CV-0315 o CV-0607) o inoculados con agua de peptona tamponada (C neg).

Además, si analizamos bloques contiguos de 10x10 más próximos a la diagonal de la matriz de la Figura 15, que estarían relacionados con el tipo de inóculo utilizado, podemos inferir que la influencia de la microbiota de la madre fue mayor que la influencia del inóculo utilizado, descartándose además posibles contaminaciones cruzadas entre la microbiota de los gazapos de una hembra y la de las hembras adyacentes. Podemos ver que los perfiles de las hembras pares fueron más similares entre sí que con los perfiles de las hembras impares; los cuales, a su vez, tuvieron similitudes mayores que con las hembras pares. Por desgracia desconocemos la relación de parentesco de las hembras pares e impares.

Esta alta dependencia de la madre en la microbiota intestinal de los conejos ya la habíamos observado en estudios previos realizados en experimentos de la ETSIA de Madrid (datos no publicados).

De este análisis podemos inferir que los *Bacteroides* utilizados no influyeron significativamente en los perfiles globales de la microbiota intestinal de los gazapos.

La alta dependencia entre la microbiota de los gazapos y la microbiota de la madre ha sido descrita también por Abecia *et al.* (2007).

En relación a la influencia de la administración de probióticos sobre el perfil global de la microbiota intestinal, (Kimsé *et al.*, 2012), pudieron observar que la administración de levaduras vivas a gazapos, no alteró significativamente el perfil global de la microbiota; aunque (Amber *et al.*, 2004), utilizando métodos de cultivo microbiológico más que cuestionables, describió ciertos cambios en algunas poblaciones bacterianas tras la administración de *Lactobacillus* spp., un género que no se encuentra entre los componentes mayoritarios de la microbiota intestinal de los conejos.

10.2. Recuento de *Bacteroides* spp. en contenidos intestinales

Los recuentos de *Bacteroides* spp realizados por PCR cuantitativa de las muestras de contenido ileal y cecal pueden verse en las Tabla 35 y en las Figuras 16- 17.

De los resultados obtenidos podemos inferir que, en el íleon, el recuento de *Bacteroides* spp. fue semejante en todos los grupos experimentales ($P=0.342$).

Sin embargo, en el ciego, el recuento de *Bacteroides* spp. fue inferior en los gazapos de los grupos inoculados, con alguna de las cepas de *Bacteroides*, que en el grupo de gazapos del control negativo. Esta reducción no llegó a ser significativa ($P=0,064$) en

el caso de la cepa CV-607, pero sí en el resto de cepas (CV-183 vs CN, $P < 0,0001$; CV-293 vs CN, $P = 0,005$; CV-315 vs CN, $P < 0,0001$).

El efecto global de los tratamientos sobre el recuento de *Bacteroides* spp. en ciego fue estadísticamente significativo tras el análisis por GLM ($P < 0,0001$).

Tabla 35: Recuento de *Bacteroides* spp, en unidades logarítmicas, realizados, por PCR cuantitativa, de los contenidos ileales y cecales de los gazapos inoculados con las diferentes cepas de *Bacteroides* spp (CV-0183, CV-0293, CV-0315 o CV-0607) o inoculados con agua de peptona tamponada (CN). (En la última columna estadístico P del efecto inóculo por análisis con GLM. Letras diferentes en el promedio indican diferencia significativa entre tipos de inóculo, ns= diferencia no significativa).

	Inóculo					GLM
	CV-183	CV-293	CV-315	CV-607	CN	
Contenido ileal	4,07	6,39	6,22	5,46	5,36	
	5,84	7,34	6,18	6,31	7,02	
	5,57	6,07	4,01	5,73	6,79	
	6,60	5,19	6,28	6,15	6,35	
	4,78	7,45	6,06	5,08	5,45	
	6,49	5,58	6,99	4,03	4,79	
	5,24	5,46	7,58	4,49	5,79	
	3,81	5,98	6,51	5,42	6,72	
	6,87	5,18	5,29	6,01	5,66	
	6,63	6,03	6,01	6,25	7,03	
	N	10	10	10	10	10
Promedio	5,59 ^{ns}	6,07 ^{ns}	6,11 ^{ns}	5,49 ^{ns}	6,10 ^{ns}	$P = 0,327$
d,e,	1,10	0,80	0,96	0,77	0,79	
Contenido cecal	6,61	8,94	8,03	9,27	9,10	
	7,97	8,18	8,61	8,49	9,07	
	7,63	8,11	8,67	8,91	8,63	
	8,16	8,98	7,93	8,60	9,49	
	7,99	8,68	8,35	8,37	9,01	
	6,75	8,33	8,70	8,04	9,26	
	7,94	7,70	8,54	8,34	8,72	
	7,19	9,28	8,08	8,50	9,57	
	7,54	7,75	8,28	9,34	9,60	
	8,83	8,71	8,22	9,48	8,69	
	N	10	10	10	10	10
Promedio	7,66 ^d	8,47 ^{bc}	8,34 ^c	8,73 ^{ab}	9,12 ^a	$P < 0,001$
d,e,	0,67	0,54	0,28	0,49	0,36	

En la Figura 17 se puede ver que el recuento de *Bacteroides* spp., en el ciego de los gazapos que recibieron la cepa CV-183, fue significativamente inferior al resto de animales.

Aunque, por lo que vimos en el apartado precedente, los inóculos de *Bacteroides* no producían efecto significativo en el perfil de la microbiota intestinal global, sí que influyen significativamente en el recuento de bacterias del mismo género. Este efecto puede deberse a la producción de sustancias inhibitoras del crecimiento, producción que se ha demostrado para la mayoría de cepas de *Bacteroides* utilizadas (ver Tabla 22), a la respuesta inmunitaria establecida (ver apartado siguiente) o a otros mecanismos no analizados: competición por receptores de colonización, competición por sustrato...

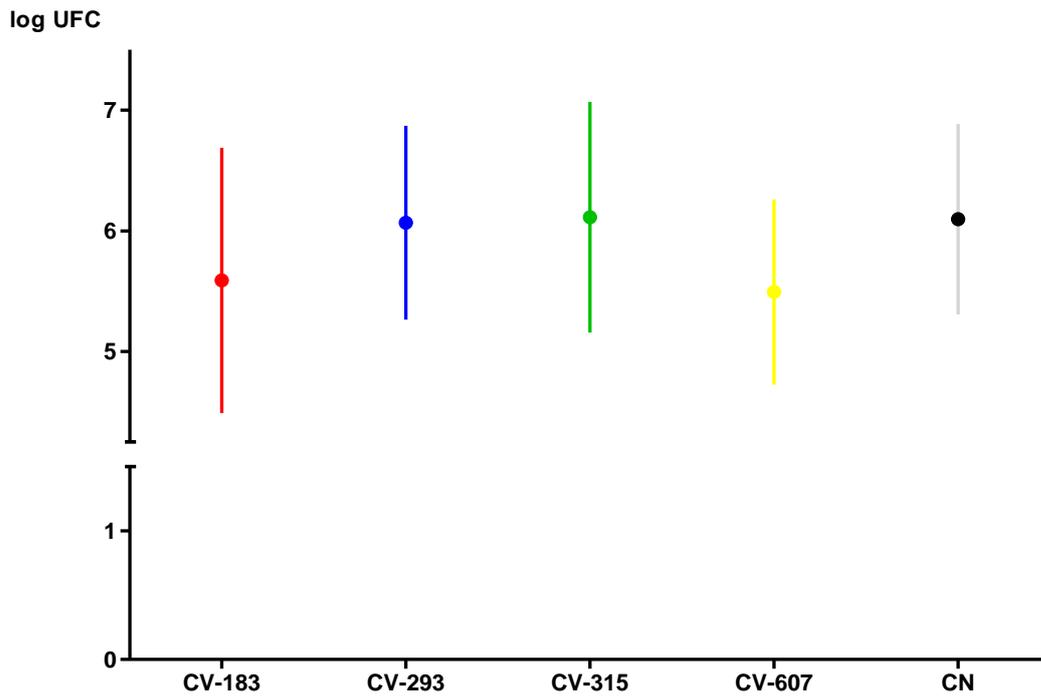


Figura 16: Promedio \pm d.e. de los recuentos de *Bacteroides* spp realizados, por PCR cuantitativa, de los contenidos ileales de los gazapos inoculados con las diferentes cepas de *Bacteroides* spp (CV-0183, CV-0293, CV-0315 o CV-0607) o inoculados con agua de peptona tamponada (CN).

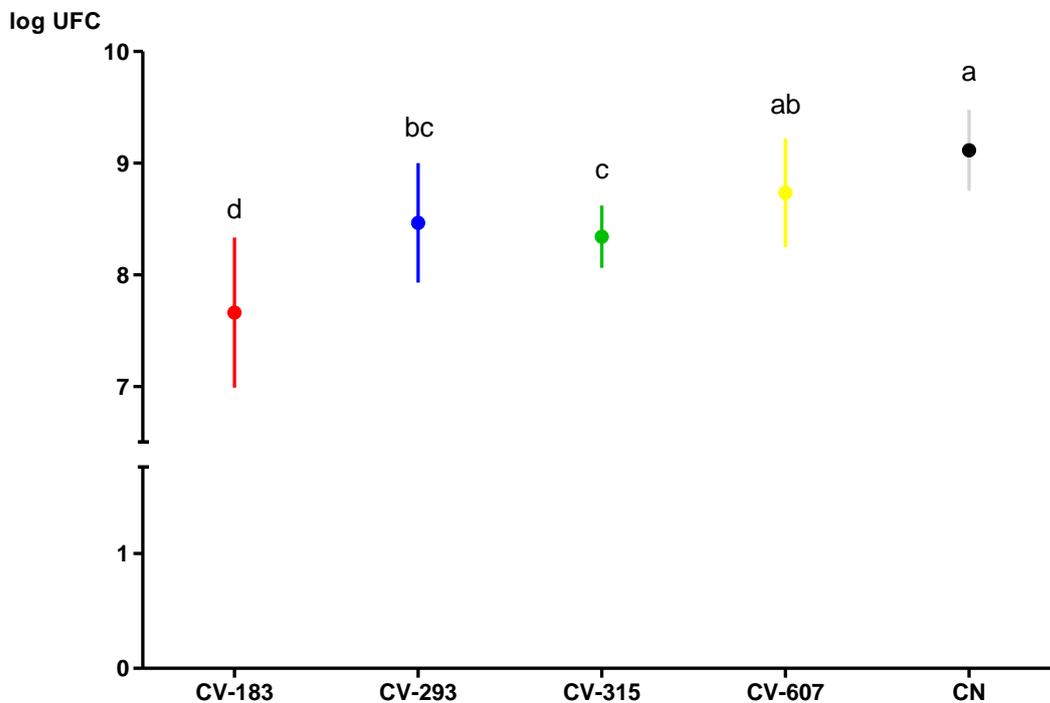


Figura 17: Promedio \pm d.e. de los recuentos de *Bacteroides* spp realizados, por PCR cuantitativa, de los contenidos cecales de los gazapos inoculados con las diferentes cepas de *Bacteroides* spp (CV-0183, CV-0293, CV-0315 o CV-0607) o inoculados con agua de peptona tamponada (CN). Letras diferentes sobre las barras de datos representan diferencias estadísticamente significativas entre tipos de inóculo por test de Tukey ($P < 0,05$).

La disminución observada en el recuento de *Bacteroides* spp. tras la inoculación experimental de las cepas de *Bacteroides* utilizadas, aunque esperada y deseable para controlar la disbiosis específica que se observa en la Enteropatía Epizoótica del conejo, es extraña si se compara con otros trabajos publicados.

Como hemos mencionado con anterioridad, en el trabajo publicado por Amber *et al.* (2004), la administración de *Lactobacillus* spp. produjo el aumento del recuento de *Lactobacillus* spp. en el contenido intestinal de los gazapos.

En cerdos, la adición de *Lactobacillus* spp produjo aumento en el recuento de *Lactobacillus* spp (Jonsson, 1986; Ratcliffe *et al.*, 1986), aunque en otros casos este aumento no se observó (Pollmann *et al.*, 1980). En rumiantes la suplementación con *Lactobacillus* spp. tampoco tuvo efecto significativo sobre el recuento de *Lactobacillus* spp. (Dawson *et al.*, 1990).

Sólo en un trabajo, publicado por Pascual *et al.* (1999), se observó la disminución del recuento de *Lactobacillus* spp. tras la inoculación de una cepa de *Lactobacillus salivarius* Rif^r en pollos. Es este trabajo se demostró el incremento significativo de la subpoblación de *Lactobacillus* resistentes a rifampicina junto a la disminución del recuento de la población global de *Lactobacillus* spp. (Pascual *et al.*, 1999).

En el caso de otros tipos de probióticos, como *Bacillus* spp o *Enterococcus* spp, no se mencionan alteraciones significativas en el recuento intestinal del género correspondiente, aunque sí disminuciones de otras poblaciones bacterianas digestivas (Bónai *et al.*, 2008; Gil-Turnes *et al.*, 1999; Ozawa *et al.*, 1983).

10.3. Efecto sobre marcadores inmunológicos de la mucosa intestinal

En la Tabla 36 y en la Figura 18 puede verse el resumen de los resultados obtenidos para diferentes marcadores inmunológicos de la mucosa intestinal (apéndice cecal) de los gazapos inoculados con las cepas de *Bacteroides* spp. o con agua de peptona tamponada (control negativo).

En relación a las citoquinas de tipo pro-inflamatorio (IFN- γ , IL-2 y TNF α), puede verse cierta tendencia a la disminución del nivel de transcripción en los animales inoculados con las cepas CV-0183, CV-0293 y CV-0315, en relación a los animales del control negativo. No obstante esa disminución sólo fue significativa para los animales inoculados con las cepas CV-0183 y CV-0293 en el caso del IFN- γ ($P_{K-W}=0,040$) y para los animales inoculados con las cepas CV-0293 y CV-0315 en el caso del TNF α (P_K .

$w=0,023$). Para la IL-2 la disminución observada no fue estadísticamente significativa ($P_{K-W}=0,721$). En el caso de los animales inoculados con la cepa CV-0607, el efecto sobre el grado de transcripción del DNA de las citoquinas pro-inflamatorias, en relación al resto de cepas de *Bacteroides* spp., fue marcadamente diferente, al observarse tendencia a la sobreexpresión de los diferentes genes; esta sobreexpresión fue claramente significativa en el caso del TNF α .

Para la otra citoquina analizada, la IL-10, aunque se observa cierta tendencia a la sobreexpresión en los animales inoculados con las diferentes cepas de *Bacteroides* spp., esta sobreexpresión no fue estadísticamente significativa ($P_{K-W}=0.832$).

Tabla 36: Media geométrica y desviación estándar (d.e.) de diferentes marcadores inmunológicos (IFN- γ , IL-2, IL-10, TNF α , TLR 2, MCH I y MCH II) de la mucosa intestinal determinados por PCR cuantitativa y el algoritmo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de los gazapos inoculados con las diferentes cepas de *Bacteroides* spp (CV-0183, CV-0293, CV-0315 o CV-0607) o inoculados con agua de peptona tamponada (CN). (En las dos últimas columnas estadístico P del efecto inóculo obtenido por análisis con los test de Kruskal-Wallis y GLM. Letras diferentes en el promedio indican diferencia significativa entre tipos de inóculo, ns= diferencia no significativa).

Marcador	Estadístico	Inóculo					Kruskal-Wallis	GLM
		CV-183	CV-293	CV-315	CV-607	CN		
	N	10	10	10	10	10		
IFN- γ	Media geométrica	0,443 ^d	0,376 ^d	0,768 ^a	0,662 ^{ab}	1,000 ^a	$P_{K-W}=0,040$	$P_{GLM}=0,044$
	d,e,	0,286	0,347	0,563	0,793	0,600		
IL-2	Media geométrica	0,830 ^{ns}	0,893 ^{ns}	0,814 ^{ns}	1,190 ^{ns}	1,000 ^{ns}	$P_{K-W}=0,721$	$P_{GLM}=0,640$
	d,e,	0,635	0,557	0,530	0,708	0,396		
IL-10	Media geométrica	1,232 ^{ns}	1,287 ^{ns}	1,084 ^{ns}	1,108 ^{ns}	1,000 ^{ns}	$P_{K-W}=0,832$	$P_{GLM}=0,640$
	d,e,	1,844	0,730	0,651	0,656	0,575		
TNF α	Media geométrica	0,545 ^{bc}	0,558 ^c	0,653 ^c	1,778 ^a	1,000 ^b	$P_{K-W}=0,023$	$P_{GLM}=0,001$
	d,e,	0,563	0,349	0,411	1,022	0,325		
TLR 2	Media geométrica	0,847 ^{ns}	1,114 ^{ns}	0,756 ^{ns}	1,412 ^{ns}	1,000 ^{ns}	$P_{K-W}=0,369$	$P_{GLM}=0,344$
	d,e,	0,501	0,524	0,472	0,557	1,026		
MCH I	Media geométrica	1,546 ^{ab}	1,277 ^{bc}	0,971 ^c	1,647 ^{ab}	1,000 ^c	$P_{K-W}=0,035$	$P_{GLM}=0,010$
	d,e,	0,616	0,578	0,390	0,568	0,314		
MCH II	Media geométrica	2,443 ^a	2,358 ^{ab}	1,971 ^{ab}	1,474 ^{bc}	1,000 ^c	$P_{K-W}=0,015$	$P_{GLM}=0,008$
	d,e,	0,935	1,623	1,063	0,639	0,561		

Examinando los resultados de los diferentes marcadores de superficie, podemos inferir que la inoculación de las diferentes cepas de *Bacteroides* spp no produjo diferencias significativas en el grado de expresión del gen *TLR-2* ($P_{K-W}=0.369$), pero sí en el grado de expresión de los genes *MCH I* ($P_{K-W}=0.035$) y *MCH II* ($P_{K-W}=0.015$).

En el caso del *MHC I*, los animales inoculados con las cepas CV-0183 y CV-0607 sobreexpresaron este gen, en relación a los animales del control negativo; mientras

que en el caso del *MHC II*, los animales inoculados con las cepas CV-0183, CV-0293 y CV-0315 fueron los que sobreexpresaron dicho gen, en relación a los animales del control negativo.

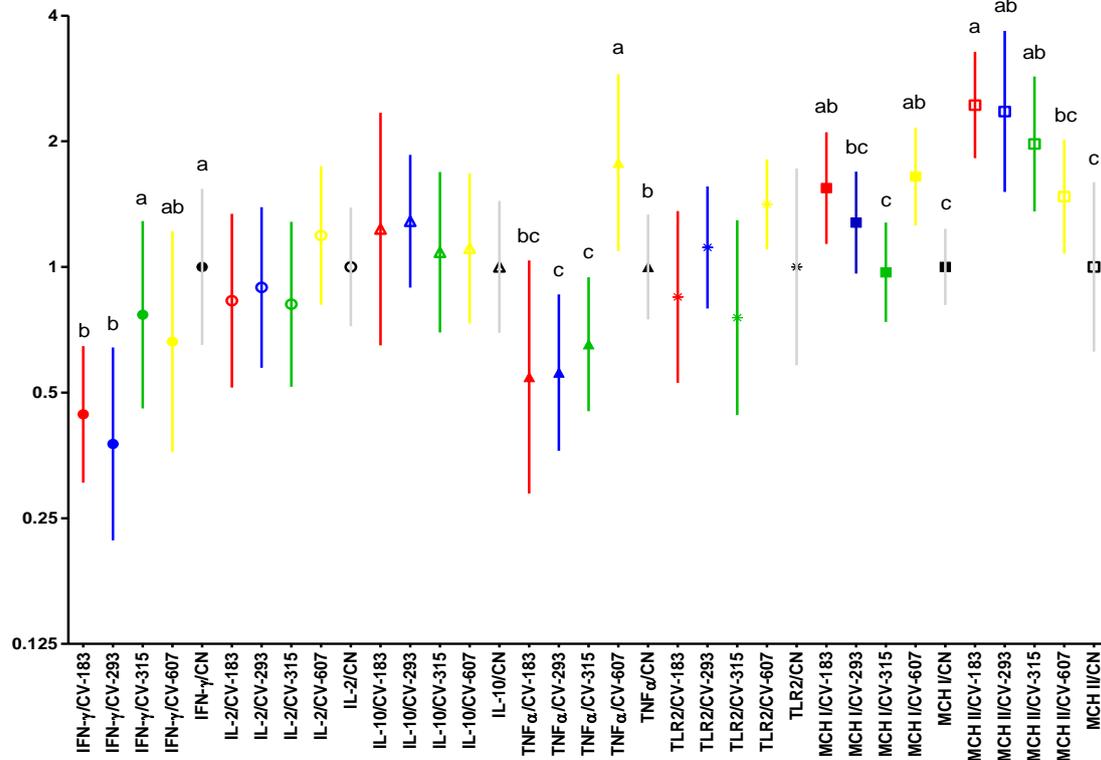


Figura 18: Media geométrica \pm 95% CI de diferentes marcadores inmunológicos (IFN- γ , IL-2, IL-10, TNF α , TLR 2, MCH I y MCH II) de la mucosa intestinal determinados por PCR cuantitativa y el algoritmo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de los gazapos inoculados con las diferentes cepas de *Bacteroides* spp (CV-0183, CV-0293, CV-0315 o CV-0607) o inoculados con agua de peptona tamponada (CN). Para un mismo marcador: letras diferentes indican diferencia significativa entre tipos de inóculo entre tipos de inóculo por test de Tukey ($P < 0,05$), no letra= diferencia no significativa.

Las células del epitelio intestinal pueden llegar a comportarse como células inmunocompetentes al interactuar con diferentes componentes bacterianos, en este caso pueden expresar moléculas MHC II, además de moléculas MHC I, y están capacitadas para presentar antígenos a linfocitos y producir citoquinas (Bland and Warren, 1986; Kaiserlian, 1991). Además, las otras células presentadoras de antígenos, los macrófagos y las células dendríticas, ambas caracterizadas por la expresión de moléculas MHC II en su superficie, también están implicadas en el procesamiento de antígenos en la mucosa intestinal.

El aumento del grado de expresión de MHC II y MHC I, observado en diferentes grupos de gazapos que recibieron determinadas cepas de *Bacteroides* spp., puede estar asociado a la transformación de los enterocitos en células inmunocompetentes o

a la estimulación, o al reclutamiento, de macrófagos y células dendríticas; dos mecanismos que podrían ser positivos para la defensa del sistema digestivo frente a posibles patógenos.

En estudios realizados con otros probióticos, como *Lactobacillus* spp., *Bacillus subtilis* o *Bacillus pumilus* se ha podido ver la estimulación de la producción de IFN- γ y TNF α (Herich and Levkut, 2002; Hong *et al.*, 2005) y en *Bacteroides fragilis*, la presencia de PSA también se ha asociado a la estimulación de la producción de IFN- γ (Mazmanian *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006). En nuestro estudio hemos observado el descenso en el nivel de transcripción de los genes IFN- γ y TNF α , resultado no esperado considerando la presencia de PSA en las cepas probadas, aunque es cierto que no fueron las que expresaron en mayor cantidad esta molécula de superficie. Probablemente habría sido interesante analizar el grado de expresión de estas citoquinas a los pocos días de la inoculación de las cepas de *Bacteroides* spp., ya que puede haberse producido un efecto similar al observado por Snider y Liang (EUR-Lex-52001DC0333-ES), trabajando con un modelo de injerto contra huésped. En este estudio observaron que la máxima producción de IFN- γ , por parte de las células de las placas de Peyer, se produjo a los 3 días del inicio del estudio y disminuía drásticamente durante los 6 días siguientes (Snider and Liang, 2001).

Los resultados obtenidos pueden obedecer también al hecho de haber trabajado en condiciones de granja de producción y ser reflejo del mayor control, en los animales que recibieron algunas de las cepas de *Bacteroides* spp., de las reacciones inflamatorias intestinales en respuesta a patógenos circulantes, de hecho en la misma nave existían casos de colibacilosis. No obstante, ninguno de los gazapos examinados presentó signos de esta infección durante el periodo experimental.

10.4. Efecto sobre la diversidad genética de las inmunoglobulinas

En la Tabla 37 y las Figuras 19 y 20, se muestra el resumen de los resultados obtenidos en el estudio del grado de variabilidad de los genes asociados a la síntesis de inmunoglobulinas, determinado como el porcentaje de secuencias diferentes en relación al total de secuencias obtenidas por secuenciación masiva de los amplicones obtenidos por PCR del DNA extraído de la mucosa del apéndice cecal de los gazapos inoculados con las diferentes cepas de *Bacteroides* spp (CV-0183, CV-0293, CV-0315 o CV-0607) o inoculados con agua de peptona tamponada (CN), utilizando cebadores de la región VDJ.

De los resultados obtenidos podemos inferir que los gazapos inoculados con las cepas CV-0183 y CV-0315 mostraron un grado de variabilidad ligeramente mayor en el repertorio de inmunoglobulinas que el resto de grupos experimentales. Aunque pequeña, esta diferencia fue estadísticamente significativa ($P_{GLM}=0.002$).

Tabla 37: Porcentaje de secuencias diferentes de nucleótidos y de aminoácidos, en relación al total de secuencias obtenidas por secuenciación masiva de los amplicones obtenidos por PCR, utilizando cebadores de la región VDJ de los genes de inmunoglobulinas, del DNA extraído de la mucosa del apéndice cecal de los gazapos inoculados con las diferentes cepas de *Bacteroides* spp. (CV-0183, CV-0293, CV-0315 o CV-0607) o inoculados con agua de peptona tamponada (CN). En la última columna estadístico P del efecto inóculo por análisis con GLM. Letras diferentes en el promedio indican diferencia significativa entre tipos de inóculo.

	Inóculo					GLM
	CV-183	CV-293	CV-315	CV-607	CN	
Secuencia nucleótidos	25,35%	22,99%	25,82%	22,95%	24,48%	
	25,63%	22,87%	25,37%	22,27%	24,39%	
	25,07%	22,52%	25,85%	22,67%	24,50%	
	25,94%	22,54%	26,33%	22,53%	24,37%	
	25,73%	23,10%	25,77%	22,53%	24,33%	
	24,66%	34,76%	26,07%	22,52%	22,77%	
	24,82%		25,93%	22,82%	22,69%	
	24,44%		26,19%	22,76%	23,02%	
	24,19%		26,04%	22,79%	23,09%	
	24,77%		25,78%	22,92%	23,22%	
N	10	6	10	10	10	
Promedio d,e,	25,06% ^a	24,80% ^a	25,91% ^a	22,68% ^b	23,69% ^b	$P_{GLM}=0,002$
Secuencia aminoácidos	20,48%	17,83%	20,14%	17,88%	18,98%	
	20,67%	17,93%	19,96%	17,15%	18,90%	
	20,24%	17,56%	20,55%	17,62%	19,09%	
	21,03%	17,44%	20,69%	17,52%	18,97%	
	20,72%	17,96%	20,04%	17,47%	18,78%	
	19,11%	28,13%	20,08%	17,32%	17,45%	
	19,40%		20,18%	17,50%	17,46%	
	18,89%		20,28%	17,38%	17,71%	
	18,86%		20,07%	17,51%	17,69%	
	19,27%		19,88%	17,61%	17,77%	
N	10	6	10	10	10	
Promedio d,e,	19,87% ^a	19,48% ^a	20,19% ^a	17,49% ^b	18,28% ^b	$P_{GLM}=0,002$

Teniendo en cuenta, según lo publicado por diferentes autores (Fortun-Lamothe and Boullier, 2007; Hanson and Lanning, 2008; Mage *et al.*, 2006), que la proliferación y diversificación inicial de los linfocitos en los gazapos se produce entre el nacimiento y el destete, con la participación de la microbiota intestinal (Lanning *et al.*, 2000a); el efecto observado en nuestro ensayo *in vivo* puede representar que las cepas CV-0183 de *B. dorei* y CV-0315 de *B. fragilis*, estimularían el incremento del repertorio inicial de linfocitos de los gazapos durante las primeras semanas de vida, reflejado en el aumento de la variabilidad del fragmento VDJ, y puede representar una propiedad deseable en posibles cepas probióticas.

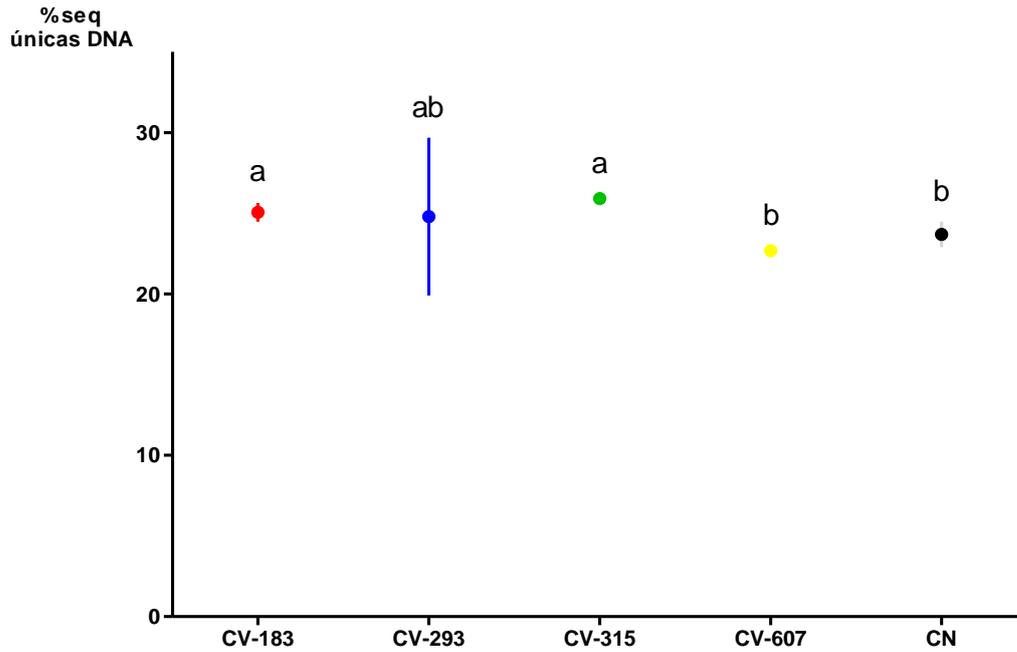


Figura 19: Promedio \pm d.e. de los porcentajes de secuencias diferentes de nucleótidos, en relación al total de secuencias obtenidas por secuenciación masiva de los amplicones obtenidos por PCR, utilizando cebadores de la región VDJ de los genes de inmunoglobulinas, del DNA extraído de la mucosa del apéndice cecal de los gazapos inoculados con las diferentes cepas de *Bacteroides* spp (CV-0183, CV-0293, CV-0315 o CV-0607) o inoculados con agua de peptona tamponada (CN). Letras diferentes indican diferencia significativa entre tipos de inóculo por test de Tukey ($P < 0,05$).

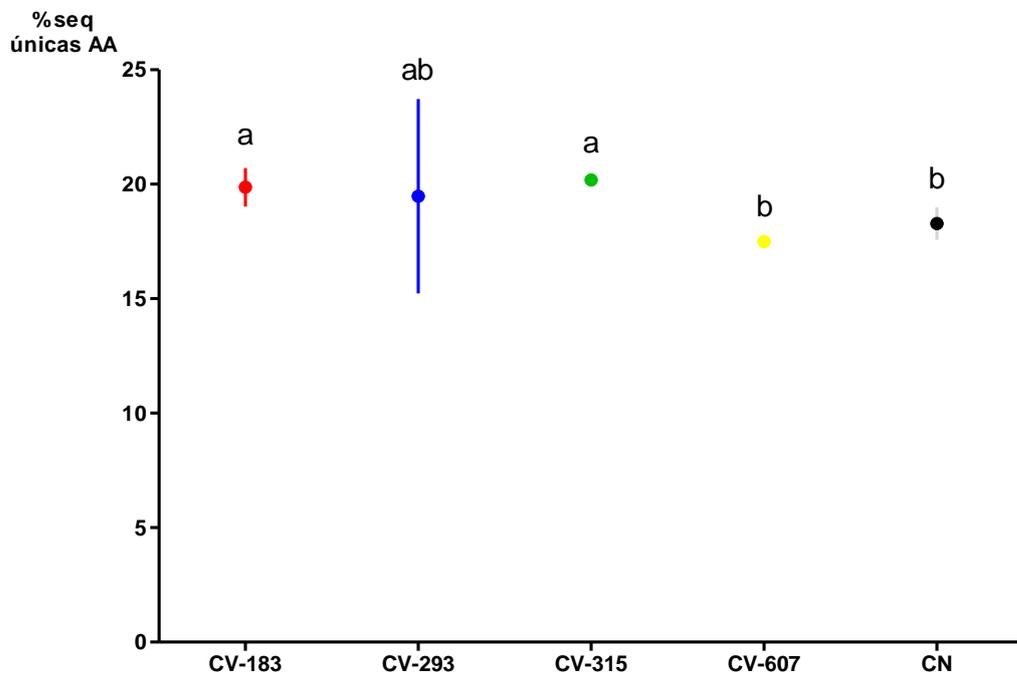


Figura 20: Promedio \pm d.e. de los porcentajes de secuencias diferentes de aminoácidos, en relación al total de secuencias obtenidas por secuenciación masiva de los amplicones obtenidos por PCR, utilizando cebadores de la región VDJ de los genes de inmunoglobulinas, del DNA extraído de la mucosa del apéndice cecal de los gazapos inoculados con las diferentes cepas de *Bacteroides* spp (CV-0183, CV-0293, CV-0315 o CV-0607) o inoculados con agua de peptona tamponada (CN). Letras diferentes indican diferencia significativa entre tipos de inóculo por test de Tukey ($P < 0,05$).

La diferencia observada entre el porcentaje de secuencias únicas de nucleótidos de las muestras del CN y las de los gazapos inoculados con las cepas CV-183 (1,37%) y CV-315 (2,22%) no están lejos del porcentaje de 2,4-3% (4,8-6 para fragmentos de 200 pb como las analizadas en el presente trabajo) de la tasa de mutación somática (hipermutación) descrita para el fragmento JH y probablemente de otros segmentos de la estructura VDJ de la inmunoglobulinas (DiPietro and Knight, 1990; Lanning and Knight, 1997). La diversidad inducida por la mutación somática, junto a la reordenación de fragmentos génicos de la región VDJ, estaría relacionada también con el hecho de que en los centros germinales de los folículos linfoides, los clones de linfocitos que no pueden unirse a antígenos mueren por apoptosis, mientras que los que reconocen antígenos son seleccionados y transformados en células de memoria (Flajnik, 2002).

Teniendo en cuenta que la traducción de la región amplificada ha de estar limitada por los motivos TLVTISS o TLVTVSS en la posición N-terminal y por el motivo TLVTVSS en la posición C-terminal, como secuencias finalizadoras de los fragmentos génicos JH1, JH2, JH3, JH4, JH5 y JH6 que pueden flanquear el amplicón obtenido (DiPietro and Knight, 1990; Lanning and Knight, 1997), se procedió a analizar el número de secuencias que se encontraban en el marco correcto de lectura (RF1) o en los marcos de lectura incorrectos (RF2 y RF3), asumiéndose la hipótesis de trabajo de que las secuencias RF1 son más maduras que las secuencias que se encuentran en los marcos de lectura RF2 o RF3, ya que para que tenga lugar la síntesis de aminoácidos en la secuencia normalmente encontrada se hace necesaria la delección o inserción de uno o dos nucleótidos. Además, se procedió a analizar la presencia de codones de finalización en las secuencias obtenidas, considerándose también que la presencia de codones de terminación es signo de inmadurez de los fragmentos génicos analizados.

Tabla 38: Promedio del porcentaje de secuencias en cada uno de los tres posibles marcos de lectura (RF1-RF3) respecto del total de las secuencias examinadas por secuenciación masiva de los amplicones obtenidos por PCR, utilizando cebadores de la región VDJ de los genes de inmunoglobulinas, del DNA extraído de la mucosa del apéndice cecal de los gazapos inoculados con las diferentes cepas de *Bacteroides* spp. (CV-0183, CV-0293, CV-0315 o CV-0607) o inoculados con agua de peptona tamponada (CN). En las dos últimas filas estadísticos P del factor tipo de inóculo por análisis con Kruskal-Wallis (P_{K-W}) y GLM (P_{GLM}). Letras diferentes en los promedios de la misma columna indican diferencia significativa entre el tipo de inóculo.

	RF1	RF2	RF3
CV-0183	41,39% ^a	27,08% ^a	31,53% ^d
CV-0293	40,90% ^a	25,93% ^c	33,17% ^{ab}
CV-0315	41,41% ^a	26,32% ^{bc}	32,27% ^c
CV-0607	40,23% ^b	27,13% ^a	32,64% ^{bc}
CN	39,85% ^b	26,65% ^{ab}	33,50% ^a
P_{K-W}	<0,0001	0,0172	0,0022
P_{GLM}	<0,0001	0,0074	0,0003

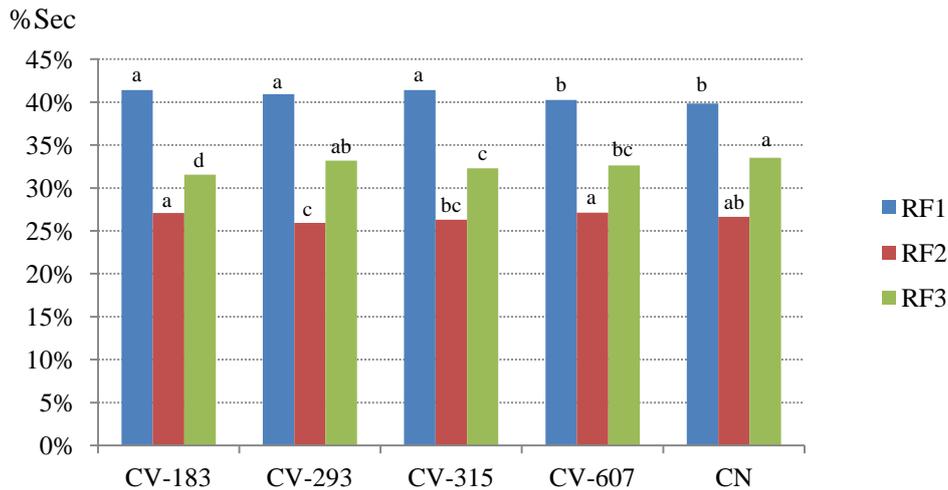


Figura 21: Promedio del porcentaje de secuencias en cada uno de los tres posibles marcos de lectura (RF1-RF3) respecto del total de las secuencias examinadas por secuenciación masiva de los amplicones obtenidos por PCR, utilizando cebadores de la región VDJ de los genes de inmunoglobulinas, del DNA extraído de la mucosa del apéndice cecal de los gazapos inoculados con las diferentes cepas de *Bacteroides* spp. (CV-0183, CV-0293, CV-0315 o CV-0607) o inoculados con agua de peptona tamponada (CN). Letras diferentes indican diferencia significativa entre tipos de inóculo por test de Tukey ($P < 0,05$).

Tabla 39: Promedio del porcentaje de secuencias en el marco de lectura RF1 o en los marcos de lectura RF2+RF3 respecto del total de las secuencias examinadas por secuenciación masiva de los amplicones obtenidos por PCR, utilizando cebadores de la región VDJ de los genes de inmunoglobulinas, del DNA extraído de la mucosa del apéndice cecal de los gazapos inoculados con las diferentes cepas de *Bacteroides* spp. (CV-0183, CV-0293, CV-0315 o CV-0607) o inoculados con agua de peptona tamponada (CN). En las dos últimas filas estadísticos P del factor tipo de inóculo por análisis con Kruskal-Wallis (P_{K-W}) y GLM (P_{GLM}). Letras diferentes en los promedios de la misma columna indican diferencia significativa entre el tipo de inóculo.

	RF1	RF2+RF3
CV-0183	41,39% ^a	58,61% ^b
CV-0293	40,90% ^a	59,10% ^b
CV-0315	41,41% ^a	58,59% ^b
CV-0607	40,23% ^b	59,77% ^a
CN	39,85% ^b	60,15% ^a
P_{K-W}	<0,0001	<0,0001
P_{GLM}	<0,0001	<0,0001

En las Tablas 38-39 y las Figuras 21-22, puede verse que la mayoría de secuencias se encuentran en el marco de lectura RF1, representando porcentajes del 39,85%, para el grupo inoculado con agua de peptona tamponada (CN), al 41,41%, para el grupo inoculado con la cepa CV-0315, respecto del total. Se pudo observar que el resultado estuvo influenciado por el tipo de inóculo, resultando significativamente mayor ($P_{K-W} < 0,0001$) en los grupos inoculados con las cepas CV-0183, CV-0293 o CV-0315 que en los grupos inoculados con la cepa CV-0607 o con el agua de peptona tamponada.

En las mismas Tablas y Figuras, puede verse que la frecuencia de secuencias en los marcos de lectura RF2 y RF3 fueron superiores en los grupos inoculados con agua de peptona tamponada (CN) o con la cepa CV-0607, con resultado claramente significativo ($P_{K-W} < 0,0001$) al sumarse los porcentajes (RF2+RF3).

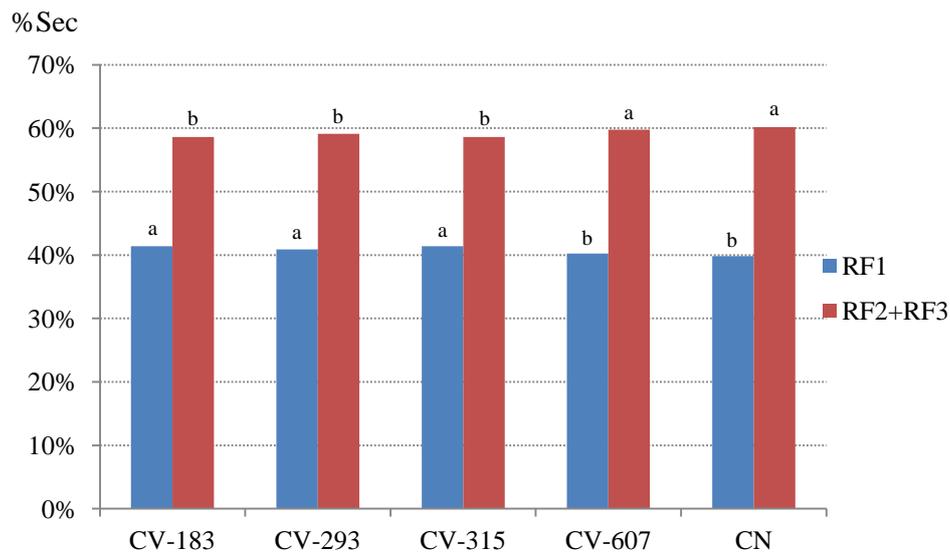


Figura 22: Promedio del porcentaje de secuencias en el marco de lectura RF1 o en los marcos de lectura RF2+RF3 respecto del total de las secuencias examinadas por secuenciación masiva de los amplicones obtenidos por PCR, utilizando cebadores de la región VDJ de los genes de inmunoglobulinas, del DNA extraído de la mucosa del apéndice cecal de los gazapos inoculados con las diferentes cepas de *Bacteroides* spp. (CV-0183, CV-0293, CV-0315 o CV-0607) o inoculados con agua de peptona tamponada (CN). Letras diferentes indican diferencia significativa entre tipos de inóculo por test de Tukey ($P < 0,05$).

Si la hipótesis de partida es correcta, estos resultados refuerzan el papel positivo de las cepas CV-0183, CV-0293 y CV-0315 en la maduración del sistema inmunitario asociado a la mucosa intestinal. Diferencias significativas en la frecuencia de los diferentes marcos de lectura han sido apuntadas también por diferentes autores (Raaphorst *et al.*, 1997; Schroeder, 2006; Schroeder *et al.*, 1998; Sun and Butler, 1996; Wu *et al.*, 2012).

Tabla 40: Promedio del porcentaje de secuencias sin codón de finalización en los marcos de lectura RF1, RF2 y RF3, respecto del total de secuencias en el mismo marco de lectura tras la secuenciación masiva de los amplicones obtenidos por PCR, utilizando cebadores de la región VDJ de los genes de inmunoglobulinas, del DNA extraído de la mucosa del apéndice cecal de los gazapos inoculados con las diferentes cepas de *Bacteroides* spp. (CV-0183, CV-0293, CV-0315 o CV-0607) o inoculados con agua de peptona tamponada (CN). En las dos últimas filas estadísticos P del factor tipo de inóculo por análisis con Kruskal-Wallis (P_{K-W}). Letras diferentes en los promedios de la misma columna indican diferencia significativa entre el tipo de inóculo.

	RF1	RF2	RF3
CV-183	42,73% ^c	14,79% ^{bc}	18,05% ^a
CV-293	45,47% ^a	15,91% ^a	16,81% ^a
CV-315	44,78% ^{ab}	15,47% ^{ab}	17,20% ^a
CV-607	44,10% ^b	16,15% ^a	17,25% ^a
CN	42,79% ^c	14,04% ^c	15,49% ^b
P_{K-W}	0,0006	0,0016	0,0133
P_{GLM}	<0,0001	0,0003	0,0118

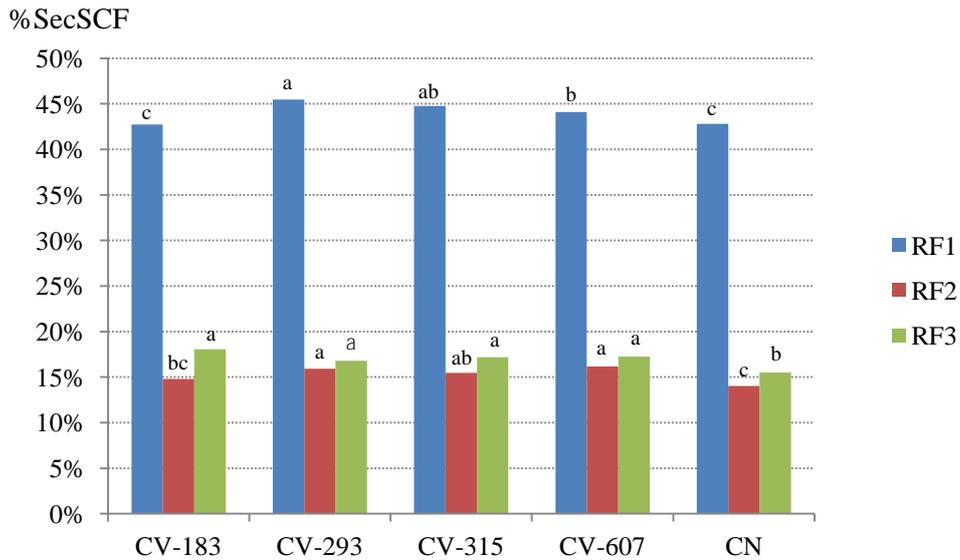


Figura 23: Promedio del porcentaje de secuencias sin codón de finalización en los marcos de lectura RF1, RF2 y RF3, respecto del total de secuencias en el mismo marco de lectura tras la secuenciación masiva de los amplicones obtenidos por PCR, utilizando cebadores de la región VDJ de los genes de inmunoglobulinas, del DNA extraído de la mucosa del apéndice cecal de los gazapos inoculados con las diferentes cepas de *Bacteroides* spp. (CV-0183, CV-0293, CV-0315 o CV-0607) o inoculados con agua de peptona tamponada (CN). Letras diferentes indican diferencia significativa entre tipos de inóculo por test de Tukey ($P < 0,05$).

En la Tabla 40 y en la Figura 23, puede verse que los amplicones que se encontraban en el marco de lectura 1 (RF1) tuvieron el porcentaje mayor de secuencias sin codón de finalización. Además, las secuencias obtenidas de los animales inoculados con las cepas CV-0293, CV-0315 o CV-0607 de *Bacteroides* spp. tuvieron significativamente ($P_{K-W}=0,0006$) menos codones de finalización que las secuencias obtenidas de los animales inoculados con la cepa CV-0183 de *Bacteroides dorei* o con agua de peptona tamponada (CN).

También puede observarse en la Tabla 40 y en la Figura 23, que la mayor parte de secuencias en fase de lectura 2 (RF2) o 3 (RF3) contenían codones de finalización y que los animales del grupo CN presentaron los porcentajes menores de secuencias sin codones de finalización (14,04% para RF2 y 15,49% para RF3, con diferencias significativas ($P_{K-W}=0,0016$ para RF2 y $P_{K-W}=0,0133$ para RF3) respecto a los resultados obtenidos de los animales inoculados con las diferentes cepas de *Bacteroides* spp., con la única excepción de las secuencias en RF2 de la cepa CV-0183.

Tras corregir el desfase de las secuencias en los marcos de lectura RF2 y RF3, por delección de uno o dos nucleótidos en la posición 160 desde el extremo 5' –el predominio de la delección en el reordenamiento de los fragmentos génicos de VDJ ha

sido descrito por Schroeder (2006) –, se calcularon los porcentajes de secuencias sin codones de finalización en la fase de lectura. Estos resultados pueden verse en la Tabla 41 y en la Figura 24.

Como puede verse, todas las cepas de *Bacteroides* spp analizadas estuvieron asociadas con mayores porcentajes de secuencias sin codones de finalización que el control negativo.

Tabla 41: Promedio \pm d.e. del porcentaje de secuencias, corregidas para ponerlas en la fase correcta de lectura, sin codón de finalización respecto del total de secuencias obtenidas por secuenciación masiva de los amplicones obtenidos por PCR, utilizando cebadores de la región VDJ de los genes de inmunoglobulinas, del DNA extraído de la mucosa del apéndice cecal de los gazapos inoculados con las diferentes cepas de *Bacteroides* spp. (CV-0183, CV-0293, CV-0315 o CV-0607) o inoculados con agua de peptona tamponada (CN). En las dos últimas filas estadísticos P del factor tipo de inóculo por análisis con Kruskal-Wallis (P_{K-W}) y GLM (P_{GLM}). Letras diferentes en los promedios de la misma columna indican diferencia significativa entre el tipo de inóculo.

Inóculo	%SCF
CV-183	27,43 \pm 0,80% ^a
CV-293	28,32 \pm 0,42% ^a
CV-315	28,15 \pm 1,19% ^a
CV-607	27,83 \pm 1,59% ^a
CN	26,03 \pm 0,69% ^b
P_{K-W}	0.0015
P_{GLM}	0.0006

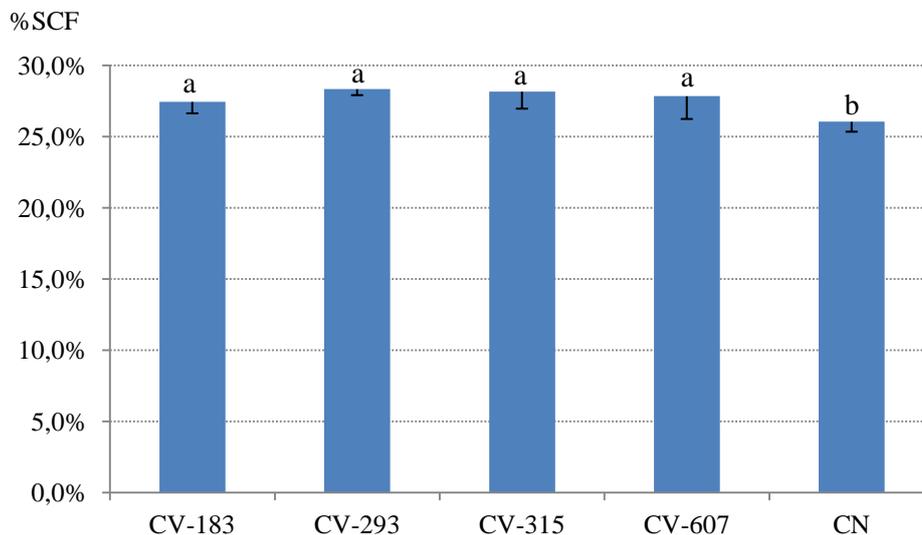


Figura 24: Promedio - d.e. del porcentaje de secuencias, corregidas para ponerlas en la fase correcta de lectura, sin codón de finalización respecto del total de secuencias obtenidas por secuenciación masiva de los amplicones obtenidos por PCR, utilizando cebadores de la región VDJ de los genes de inmunoglobulinas, del DNA extraído de la mucosa del apéndice cecal de los gazapos inoculados con las diferentes cepas de *Bacteroides* spp. (CV-0183, CV-0293, CV-0315 o CV-0607) o inoculados con agua de peptona tamponada (CN). Letras diferentes indican diferencia significativa entre tipos de inóculo por test de Tukey ($P < 0,05$).

Si consideramos que la ausencia de codones de finalización es signo de maduración de los fragmentos génicos de las inmunoglobulinas, la inoculación de las cepas CV-0183, CV-0293, CV-0315 y CV-0607 de *Bacteroides* spp. parecen estimular la reorganización adecuada de los fragmentos génicos que formarán parte de la estructura funcional de las inmunoglobulinas.

La importancia de la presencia de codones de finalización en los fragmentos génicos de las inmunoglobulinas ha sido apuntada por diversos autores (Raaphorst *et al.*, 1997; Schroeder, 2006; Winstead *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2012) y se ha visto que está asociada con la eliminación de diferentes fragmentos génicos, en la combinatoria de la estructura final de las inmunoglobulinas.

De forma global, los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten inferir que las cepas CV-183 (*Bacteroides dorei*), CV-293 (*Bacteroides fragilis*) y CV-315 (*Bacteroides fragilis*) tienen características probióticas para los gazapos en fase de lactación. Estas cepas reducen significativamente el recuento de *Bacteroides* spp en el ciego, aspecto que puede resultar positivo en casos de Enteropatía Epizootica del Conejo, enfermedad caracterizada por disbiosis intestinal en la que el recuento de *Bacteroides* spp. se incrementa significativamente. Además, estas cepas han presentado características positivas en diversos aspectos relacionados con el sistema inmunitario asociado a la mucosa intestinal, especialmente en funciones relacionadas con la presentación de antígenos vía MCH II y reduciendo la expresión de algunos genes de citoquinas proinflamatorias.

La cepa CV-0607 (*Bacteroides acidifaciens*) no presentó el mismo comportamiento de las otras cepas de *Bacteroides* spp. analizadas, siendo indistinguibles los resultados obtenidos con los observados en los animales del control negativo.

Algunas características de las posibles cepas probióticas son complementarias a las obtenidas por las otras, por lo que la combinación de dos o de las tres cepas pudiera tener resultados más positivos que la inoculación individual de las mismas, posibilidad que sería importante analizar en el futuro.

CONCLUSIONES

- La resistencia a antimicrobianos ha sido la característica *in vitro* que ha condicionado en mayor medida la preselección de cepas de *Bacteroides* spp. con potencial probiótico. Este hecho plantea la necesidad de contar con granjas donde no se utilicen antimicrobianos, para crear ceparios de bacterias intestinales sin marcadores de resistencia.
- Las cepas utilizadas para los estudios *in vivo* no produjeron cambios en el perfil global de la microbiota, resultando el efecto materno mayor que el efecto cepa en el perfil de la microbiota intestinal analizado por RFLP. No obstante, las cepas CV-0183 (*Bacteroides dorei*), CV-0293 (*Bacteroides fragilis*) y CV-0315 (*Bacteroides fragilis*) redujeron significativamente el recuento de *Bacteroides* spp en el ciego.
- Las cepas CV-0183, CV-0293 y CV-0315 activaron funciones relacionadas con la presentación de antígenos vía MCH II y redujeron la expresión de algunos genes de citoquinas proinflamatorias.
- Las cepas CV-0183, CV-0293 y CV-0315 estuvieron asociadas con la mayor diversidad de la región VDJ de las inmunoglobulinas y el alineamiento correcto de los nucleótidos para que puedan sintetizarse moléculas completas de inmunoglobulinas.
- La cepa CV-607 (*Bacteroides acidifaciens*) presentó un comportamiento *in vivo* diferente a las cepas CV-0183, CV-0293 o CV-0315 y, por lo general, similar al control negativo.
- Las cepas CV-0183, CV-0293 y CV-0315 resultan candidatas para el desarrollo de probióticos para conejos.

BIBLIOGRAFIA

- Aarestrup, F. M., Y. Agero, P. Gerner-Smidt, M. Madsen, and L. B. Jensen. 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis* 37: 127-137.
- Aarestrup, F. M. et al. 2001. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal *Enterococci* from food animals in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 2054-2059.
- Agnoletti, F. 2012. Update on rabbit enteric diseases: Despite improved diagnostic capacity, where does disease control and prevention stand? . In: Proceedings 10 th World Rabbit Congress, Sharm El-Sheikh-Egypt. p 1113-1127.
- Amber, K. H., H. M. Yakout, and S. Hamed Rawya. 2004. Effect of feeding diets containing yucca extract or probiotic on growth, digestibility, nitrogen balance and caecal microbial activity of growing New Zealand white rabbits. In: 8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico
- Avelar, K. E. et al. 1999. Production of bacteriocin by *Bacteroides fragilis* and partial characterization. *Lett Appl Microbiol* 29: 264-268.
- Avila-Campos, M. J., C. Liu, Y. Song, M. C. Rowlinson, and S. M. Finegold. 2007. Determination of bft gene subtypes in *Bacteroides fragilis* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 45: 1336-1338.
- Badiola, I. 2001. El sistema digestivo de las aves. Factores anatómicos y fisiológicos. Población microbiana intestinal. In: IV Jornada Internacional de Avicultura de carne, Madrid.
- Badiola, I. 2003. Els problemes sanitaris en el subsector cunícola. L'enteropatia mucoide dels conills. *Conills*.
- Barber, R. D., D. W. Harmer, R. A. Coleman, and B. J. Clark. 2005. Gapdh as a housekeeping gene: Analysis of gapdh mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics* 21: 389-395.
- Barefoot, S. F., and T. R. Klaenhammer. 1984. Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin b. *Antimicrob Agents Chemother* 26: 328-334.
- Bellier, R., T. Gidenne, M. Vernay, and M. Colin. 1995. In vivo study of circadian variations of the cecal fermentation pattern in postweaned and adult rabbits. *J Anim Sci* 73: 128-135.
- Blanco, J. E. et al. 1996. O serogroups, biotypes, and eae genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits. *J Clin Microbiol* 34: 3101-3107.
- Bland, P. W., and L. G. Warren. 1986. Antigen presentation by epithelial cells of the rat small intestine. I. Kinetics, antigen specificity and blocking by anti-ia antisera. *Immunology* 58: 1-7.
- Bohnhoff, M., B. Drake, and C. Muller. 1954. Effect of streptomycin on susceptibility of intestinal tract to experimental *Salmonella* infection. *Exp Biol Med* (Maywood): 86: 132.

- Bónai, A. et al. 2008. Effect of *Bacillus cereus* var. Toyoi on caecal microflora and fermentation in rabbits. *In: 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy.*
- Booth, S. J., J. L. Johnson, and T. D. Wilkins. 1977. Bacteriocin production by strains of *Bacteroides* isolated from human feces and the role of these strains in the bacterial ecology of the colon. *Antimicrob Agents Chemother* 11: 718-724.
- Borrelli, L. et al. 2011. *Salmonella typhimurium* dt104 in farmed rabbits. *J Vet Med Sci* 73: 385-387.
- Brandtzaeg, P. 1989. Overview of the mucosal immune system. *Curr Top Microbiol Immunol* 146: 13-25.
- Brubaker, J. O., Q. Li, A. O. Tzianabos, D. L. Kasper, and R. W. Finberg. 1999. Mitogenic activity of purified capsular polysaccharide a from *Bacteroides fragilis*: Differential stimulatory effect on mouse and rat lymphocytes in vitro. *J Immunol* 162: 2235-2242.
- Bry, L., P. G. Falk, T. Midtvedt, and J. I. Gordon. 1996. A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem. *Science* 273: 1380-1383.
- Camguilhem, R., and A. Milon. 1989. Biotypes and o serogroups of *Escherichia coli* involved in intestinal infections of weaned rabbits: Clues to diagnosis of pathogenic strains. *J.Clin. Microbiol.* 27 (4): 743-747.
- Carabaño, R., M. J. Fraga, G. Santoma, and J. C. de Blas. 1988. Effect of diet on composition of cecal contents and on excretion and composition of soft and hard feces of rabbits. *J Anim Sci* 66: 901-910.
- Carabaño, R., and J. Piquer (Editors). 1998. The nutrition of the rabbit. C. de Blas and J. Wiseman, 116 pp.
- Combes, S., L. Fortun-Lamothe, L. Cauquil, and T. Gidenne. 2012. Controlling the rabbit digestive ecosystem to improve digestive health and efficacy. *In: World Rabbit Congress, Sharm El-Sheikh, Egypt.* p 475-494.
- Corr, S. C., C. C. Gahan, and C. Hill. 2008. M-cells: Origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52: 2-12.
- Cotter, P. D., R. P. Ross, and C. Hill. 2013. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol* 11: 95-105.
- Coudert, P. et al. (Editors). 2000. Enfermedades del aparato digestivo: Causas parasitarias y otras., 2. Mundi-Prensa libros, S.A., 219-263 pp.
- Crane, M. A., M. Kingzette, and K. L. Knight. 1996. Evidence for limited b-lymphopoiesis in adult rabbits. *J Exp Med* 183: 2119-2121.
- Croswell, A., E. Amir, P. Tegatz, M. Barman, and N. H. Salzman. 2009. Prolonged impact of antibiotics on intestinal microbial ecology and susceptibility to Enteric *Salmonella* infection. *Infect Immun* 77: 2741-2753.
- Chamorro, S. et al. 2007. Effect on digestion and performance of dietary protein content and of increased substitution of lucerne hay with soya-bean protein concentrate in starter diets for young rabbits. *Animal* 1: 651-659.

- Chung, H. et al. 2012. Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell* 149: 1578-1593.
- Dawson, K. A., K. E. Newman, and J. A. Boling. 1990. Effects of microbial supplements containing yeast and *Lactobacilli* on roughage-fed ruminal microbial activities. *J Anim Sci* 68: 3392-3398.
- Dewrée, R. et al. 2007. Experimentally induced epizootic rabbit enteropathy: Clinical, histopatological, ultrastructural, bacteriological and haematological findings. *World Rabbit Science* 15: 91-102.
- DiPietro, L. A., and K. L. Knight. 1990. Restricted utilization of germ-line vh genes and diversity of d regions in rabbit splenic ig mrna. *J Immunol* 144: 1969-1973.
- Dkhil, M. A., M. A. Abdel-Maksoud, S. Al-Quraishy, A. A. Abdel-Baki, and F. Wunderlich. 2012. Gene expression in rabbit appendices infected with *Eimeria coecicola*. *Vet Parasitol* 186: 222-228.
- Dkhil, M. A., S. Al-Quraishy, A. A. Abdel-Baki, D. Delic, and F. Wunderlich. 2013. *Eimeria coecicola*: Spleen response of oryctolagus cuniculus. *Exp Parasitol* 133: 137-143.
- Dunkley, M., R. Pabst, and A. Cripps. 1995. An important role for intestinally derived t cells in respiratory defence. *Immunol Today* 16: 231-236.
- Eckburg, P. B. et al. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308: 1635-1638.
- EFSA. 2004. Qualified presumption of safety of micro-organisms in food and feed. In: SCIENTIFIC COLLOQUIUM SUMMARY REPORT QPS. Brussels, Belgium
- Eitel, Z., J. Soki, E. Urban, and E. Nagy. 2013. The prevalence of antibiotic resistance genes in *Bacteroides fragilis* group strains isolated in different european countries. *Anaerobe*.
- EUR-Lex-52001DC0333-ES. 2001. Comunicación de la comisión relativa a una estrategia comunitaria contra la resistencia a los antimicrobianos COM/0333 final Volumen I *.
- FAO/Errecalde, J. O. 2004 Roma. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. In: F. P. y. S. Animal (ed.).
- FAO/WHO. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. In: W. G. meeting (ed.), London, Ontario.
- Fasano, A., and T. Shea-Donohue. 2005. Mechanisms of disease: The role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2: 416-422.
- Flajnik, M. F. 2002. Comparative analyses of immunoglobulin genes: Surprises and portents. *Nat Rev Immunol* 2: 688-698.
- Flint, H. J. 1999. Bacteroides and prevotella. *Academic Press*.

- Fortun-Lamothe, L., and S. Boullier. 2007. A review on the interactions between gut microflora and digestive mucosal immunity. Possible ways to improve the health of rabbits. *Livestock Sci.* 107(EUR-Lex-52001DC0333-ES): 1-18.
- Fotiadis, C. I., C. N. Stoidis, B. G. Spyropoulos, and E. D. Zografos. 2008. Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 14: 6453-6457.
- Franco, A. A. 2004. The *Bacteroides fragilis* pathogenicity island is contained in a putative novel conjugative transposon. *J Bacteriol* 186: 6077-6092.
- Frank, D. N. et al. 2007. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *In: Proc Natl Acad Sci USA* 104: 13780-13785.
- Friedman, M. L., C. Tunyaplin, S. K. Zhai, and K. L. Knight. 1994. Neonatal vh, d, and jh gene usage in rabbit b lineage cells. *J Immunol* 152: 632-641.
- Gallarda, J. L., K. S. Gleason, and K. L. Knight. 1985. Organization of rabbit immunoglobulin genes. I. Structure and multiplicity of germ-line vh genes. *J Immunol* 135: 4222-4228.
- García, D. 2004. Medicina del conejo de compañía. Parte ii (patología) II Congreso JG. Hospital Veterinario JG de Mutxamel www.vetjg.com/shared/php/page.php?page=artic, Mutxamel (Alicante-Spain)
- García, J. et al. 2005. Proyecto INIA sobre enteropatía mucoide: Resultados sobre las investigaciones en nutrición. *In: XXX Symposium de Cunicultura, ASESCU, Valladolid, España*
- García, J. A., J. Prieto, M. C. Sáenz, and J. E. Sánchez. 1997. Sensitivity of Bacteroidaceae to fosfomicin. *Chemotherapy*: 23 Suppl 21:45-50.
- Gibson, G. R., and M. B. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125: 1401-1412.
- Gidenne, T., S. Combes, and L. Fortun-Lamothe. 2012. Feed intake limitation strategies for the growing rabbit: Effect on feeding behaviour, welfare, performance, digestive physiology and health: A review. *Animal* 6: 1407-1419.
- Gil-Turnes, C., A. Freitas dos Santos, F. Weykamp da Cruz, and A. Vieira Monteiro. 1999. Properties of the *Bacillus cereus* strain used in probiotic cenbiot. *Revista de Microbiología* 30: 11-14.
- Gillor, O., A. Etzion, and M. A. Riley. 2008. The dual role of bacteriocins as anti-and probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol.* 81(4): 591-606.
- Godornes, C., B. T. Leader, B. J. Molini, A. Centurion-Lara, and S. A. Lukehart. 2007. Quantitation of rabbit cytokine mRNA by real-time rt-pcr. *Cytokine* 38: 1-7.
- Gomez-Conde, M. S. et al. 2007. Neutral detergent-soluble fiber improves gut barrier function in twenty-five-day-old weaned rabbits. *J Anim Sci* 85: 3313-3321.
- Gorbach, S. L. 2002. Probiotics in the third millennium. *Dig Liver Dis* 34 Suppl 2: S2-7.

- Griebel, P. J., and W. R. Hein. 1996. Expanding the role of Peyer's patches in b-cell ontogeny. *Immunol Today* 17: 30-39.
- Guarner, F., and J. R. Malagelada. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet* 361: 512-519.
- Gutacker, M., C. Valsangiacomo, and J. C. Piffaretti. 2000. Identification of two genetic groups in *Bacteroides fragilis* by multilocus enzyme electrophoresis: Distribution of antibiotic resistance (cfia, cepa) and enterotoxin (bft) encoding genes. *Microbiology* 146 (Pt 5): 1241-1254.
- Gutiérrez, J. F. 2003. Tratamientos y profilaxis de la coccidiosis en el conejo. *Cunicultura* Abril: 97-106.
- Hanson, N. B., and D. K. Lanning. 2008. Microbial induction of b and t cell areas in rabbit appendix. *Dev Comp Immunol* 32: 980-991.
- Harcourt-Brown, F. 2005. Acute gastrointestinal disease in rabbits. *In: 50º Congresso Nazionale Multisala SCIVAC, Rimini, Italia.*
- Harcourt-Brown, F. 2011. Digestive problems in rabbits- what is really an emergency. II Encontro de formação OMV, Lisboa.
- Hart, A. L. et al. 2002. The role of the gut flora in health and disease, and its modification as therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 16: 1383-1393.
- Hecht, D. W. 2004. Prevalence of antibiotic resistance in anaerobic bacteria: Worrisome developments. *Clin Infect Dis* 39: 92-97.
- Hedin, C., K. Whelan, and J. O. Lindsay. 2007. Evidence for the use of probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: A review of clinical trials. *Proc Nutr Soc* 66: 307-315.
- Henriksson, A., T. Borody, and R. Clancy. 2005. Probiotics under the regulatory microscope. *Expert Opin Drug Saf* 4: 1135-1143.
- Hepatica, C. 1994. Coccidios detectados en el conejo, características y poder patógeno. *Boletín de cunicultura* 73: 37-40.
- Herich, R., and M. Levkut. 2002. Lactic acid bacteria, probiotics and immune system. *Vet. Med - Czech* 47 (6): 169-180.
- Hong, H. A., H. Duc le, and S. M. Cutting. 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol Rev* 29: 813-835.
- Hooper, L. V., and J. I. Gordon. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 292: 1115-1118.
- Hooper, L. V. et al. 2001. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 291: 881-884.
- Ishikawa, E. et al. 2013. Ethnic diversity of gut microbiota: Species characterization of *Bacteroides fragilis* group and genus bifidobacterium in healthy belgian adults, and comparison with data from japanese subjects. *J Biosci Bioeng* 116: 265-270.

- Isolauri, E., S. Salminen, and A. C. Ouwehand. 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. Probiotics. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18: 299-313.
- Janeway, C., P. Travers, M. Walport, and M. Shlomchik. 2005. Immunobiology: The immune system in health and disease. 6^a ed, New York and London.
- Jeffery, I. B., and P. W. O'Toole. 2013. Diet-microbiota interactions and their implications for healthy living. *Nutrients* 5: 234-252.
- Jensen, L. B., N. Frimodt-Moller, and F. M. Aarestrup. 1999. Presence of *erm* gene classes in gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. *FEMS Microbiology Letters* 170: 151-158.
- Jilge, B. 1982. Monophasic and diphasic patterns of the circadian caecotrophy rhythm of rabbits. *Lab Anim* 16: 1-6.
- Johnson-Delaney, C. A. 2006. Anatomy and physiology of the rabbit and rodent gastrointestinal system. *In: AEMV*
- Jonsson, E. 1986. Persistence of *Lactobacillus* strain in the gut of sucking piglets and its influence on performance and health. *Swedish J. Agric. Res.* : 16:43-47.
- Jousimies-Somer, H., and P. Summanen. 2002. Recent taxonomic changes and terminology update of clinically significant anaerobic gram-negative bacteria (excluding spirochetes). *Clin Infect Dis* 35: S17-21.
- Justesen, U. S. et al. 2013. High rates of reduced susceptibility in the *Bacteroides fragilis* group isolated from blood cultures - the first national survey in Denmark. *Int J Antimicrob Agents*.
- Kaiserlian, D. 1991. Murine gut epithelial cells express ia molecules antigenically distinct from those of conventional antigen-presenting cells. *Immunol Res.*: 10(13-14):360-364.
- Kajikawa, O. et al. 2005. Gene expression of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, and md2 is differentially regulated in rabbits with escherichia coli pneumonia. *Gene* 344: 193-202.
- Kant, V. et al. 2013. Anticoccidial drugs used in the poultry: An overview. *Science International* 1 (7): 261-265.
- Karlsson, F. H., D. W. Ussery, J. Nielsen, and I. Nookaew. 2011. A closer look at *Bacteroides*: Phylogenetic relationship and genomic implications of a life in the human gut. *Microb Ecol* 61: 473-485.
- Kaufman, L., and P. J. Rousseeuw. 1990. Finding groups in data. Wiley-Interscience Publication. , Bruselas.
- Kaur, I. P., A. Kuhad, A. Garg, and K. Chopra. 2009. Probiotics: Delineation of prophylactic and therapeutic benefits. *J Med Food* 12: 219-235.
- Kimsé, M. et al. 2012. Impact of a dietary fiber deficiency on the caecal ecosystem of the young rabbit. Modulation by yeast probiotics *In: 10 th World Rabbit Congress, Sharm El- Sheikh –Egypt.* p 519 - 523.

- Kovacs, M. et al. 2006. Effect of nursing methods and faeces consumption on the development of the *Bacteroides*, *Lactobacillus* and coliform flora in the caecum of the newborn rabbits. *Reprod Nutr Dev* 46: 205-210.
- Lambert, H. P., and F. W. O'Grady. 1992. Antibiotic and chemotherapy. 6 ed. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Lane, D. J. 1991. 16s/23s rna sequencing. Wiley-Interscience Publication, Chichester.
- Lanning, D., P. Sethupathi, K. J. Rhee, S. K. Zhai, and K. L. Knight. 2000a. Intestinal microflora and diversification of the rabbit antibody repertoire. *J Immunol* 165: 2012-2019.
- Lanning, D., X. Zhu, S. K. Zhai, and K. L. Knight. 2000b. Development of the antibody repertoire in rabbit: Gut-associated lymphoid tissue, microbes, and selection. *Immunol Rev* 175: 214-228.
- Lanning, D. K., and K. L. Knight. 1997. Somatic hypermutation: Mutations 3' of rabbit v_{dj} h-chain genes. *J Immunol* 159: 4403-4407.
- Lapeña, S. 1999. Resistencias a antibióticos en nuestro medio. Visión global del problema. *BOL PEDIATR* 39: 5.
- Lebas, F. (Editor), 2000. Biología del conejo, I. Ediciones Mundi-Prensa, 69-80 pp.
- Lebas, F. 2013. La biologie du lapin. 4-appareil digestif et digestion <http://www.Cuniculture.Info/docs/biologie/biologie-04.Htm>.
- Lelkes, L. 1987. A review of rabbit enteric diseases: A new perspective. *J. Appl. Rabbit Res.* 10: 55-61.
- Licois, D. 2004. Domestic rabbits enteropathies. *In: In Proc.: 8 th World Rabbit Congress, Puebla (México).* p 385-403.
- Licois, D., M. Wyers, and P. Coudert. 2005. Epizootic rabbit enteropathy: Experimental transmission and clinical characterization. *Vet. Res.* 36: 601-613.
- Lilly, D. M., and R. H. Stillwell. 1965. Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147: 747-748.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2^{-(delta delta c(t))} method. *Methods* 25: 402-408.
- Lofmark, S., C. Jernberg, J. K. Jansson, and C. Edlund. 2006. Clindamycin-induced enrichment and long-term persistence of resistant *Bacteroides* spp. And resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 58: 1160-1167.
- Louis, P., K. P. Scott, S. H. Duncan, and H. J. Flint. 2007. Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. *J. Appl. Microbiol.* 1197-1208.
- Luczak, M. et al. 2001. Search for enterotoxin gene in *Bacteroides fragilis* strains isolated from clinical specimens in Poland, Great Britain, the Netherlands and France. *Med Sci Monit* 7: 222-225.

- MacDonald, T. T., and G. Monteleone. 2001. Il-12 and th1 immune responses in human Peyer's patches. *Trends Immunol* 22: 244-247.
- Mackie, R. I., A. Sghir, and H. R. Gaskins. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 69: 1035S-1045S.
- Macpherson, A. J. et al. 2000. A primitive t cell-independent mechanism of intestinal mucosal igA responses to commensal bacteria. *Science* 288: 2222-2226.
- Madsen, K. L., J. S. Doyle, L. D. Jewell, M. M. Tavernini, and R. N. Fedorak. 1999. *Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* 116: 1107-1114.
- Mage, R. G., D. Lanning, and K. L. Knight. 2006. B cell and antibody repertoire development in rabbits: The requirement of gut-associated lymphoid tissues. *Dev Comp Immunol*: 30(31-32): 137-153.
- Maldonado, C. M., A. de Moreno de LeBlanc, G. Vinderola, M. E. Bonet, and G. Perdigon. 2007. Proposed model: Mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clin Vaccine Immunol* 14: 485-492.
- Markovic, R., D. Sefer, M. Krstic, and B. Petrujkic. 2009. Effect of different growth promoters on broiler performance and gut morphology. *Arch Med Vet* 41: 163-169.
- Martel, J. L. et al. 2000. The french antibiotic resistance monitoring programs. *Int J Antimicrob Agents* 14: 275-283.
- Mazmanian, S. K., C. H. Liu, A. O. Tzianabos, and D. L. Kasper. 2005. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 122: 107-118.
- McDermott, M. R., and J. Bienenstock. 1979. Evidence for a common mucosal immunologic system. I. Migration of b immunoblasts into intestinal, respiratory, and genital tissues. *J Immunol* 122: 1892-1898.
- Menéndez, L. C. 1994. Patología digestiva: Factores favorecedores y desencadenantes de los trastornos digestivos en explotaciones cunícolas industriales. In: Proceedings XIX Simposio de cunicultura, Silleda, Spain. p 41-59.
- Meredith, A. L. 2009. Gastrointestinal disorders of the rabbit. In: Abstracts European Veterinary Conference, Voorjaarsdagen
- Milon, A., J. Esslinger, and R. Camguilhem. 1990. Adhesion of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic weaned rabbits to intestinal villi and hela cells. *Infect Immun* 58: 2690-2695.
- Miller, J., R. Kolter, S. Ostroff, and G. Cassell. 2012. ASM comments on legislation restricting use of antibiotics in animal feed. *Microbe* 7 (12): 542-543.
- Miranda, K. R. et al. 2013. Application of DNA sequence analysis based on five different conserved genes (16s rdna, rpob, gdh, est and pgm) for intra-species discrimination of *Bacteroides fragilis*. *Anaerobe* 19: 58-61.

- Mitsuyama, K., and M. Sata. 2008. Gut microflora: A new target for therapeutic approaches in inflammatory bowel disease. *Expert Opin Ther Targets* 12: 301-312.
- Monteils, V., L. Cauquil, S. Combes, J. J. Godon, and T. Gidenne. 2008. Potential core species and satellite species in the bacterial community within the rabbit caecum. *FEMS Microbiol Ecol* 66: 620-629.
- Mossie, K. G., D. T. Jones, F. T. Robb, and D. R. Woods. 1979. Characterization and mode of action of a bacteriocin produced by a *Bacteroides fragilis* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 16: 724-730.
- Mossie, K. G., F. T. Robb, D. T. Jones, and D. R. Woods. 1981. Inhibition of ribonucleic acid polymerase by a bacteriocin from *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 20: 437-442.
- Mundy, L. M., and C. L. Sears. 1996. Detection of toxin production by *Bacteroides fragilis*: Assay, development and screening of extraintestinal clinical isolates. *Clin Infect Dis* 23: 269-276.
- Nakamura, T., S. Fujimura, N. Obata, and N. Yamazaki. 1981. Bacteriocin-like substance (melaninocin) from oral bacteroides melaninogenicus. *Infect Immun* 31: 28-32.
- Nakano, V., T. A. Gomes, M. A. Vieira, C. Ferreira Rde, and M. J. Avila-Campos. 2007. Bft gene subtyping in enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* isolated from children with acute diarrhea. *Anaerobe* 13: 1-5.
- Nakano, V., A. Nascimento e Silva, V. R. Merino, H. M. Wexler, and M. J. Avila-Campos. 2011. Antimicrobial resistance and prevalence of resistance genes in intestinal bacteroidales strains. *Clinics (Sao Paulo)* 66: 543-547.
- Nauerby, B., K. Pedersen, and M. Madsen. 2003. Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among clostridium perfringens isolates from chickens. *Vet Microbiol* 94: 257-266.
- Neutra, M. R., N. J. Mantis, A. Frey, and P. J. Giannasca. 1999. The composition and function of m cell apical membranes: Implications for microbial pathogenesis. *Semin Immunol* 11: 171-181.
- Ng, L. K., I. Martin, M. Alfa, and M. Mulvey. 2001. Multiplex pcr for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol Cell Probes* 15: 209-215.
- Nomoto, K. 2005. Prevention of infections by probiotics. *J Biosci Bioeng* 100: 583-592.
- O'Hara, A. M., and F. Shanahan. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 7: 688-693.
- O'Hara, A. M., and F. Shanahan. 2007. Mechanisms of action of probiotics in intestinal diseases. *ScientificWorld Journal* 7: 31-46.
- O'Malley, B. 2008. Dental problems in rabbits - what to do before, during and after dentistry. . *In: Proceedings of the 33rd World Small Animal Veterinary Congress, Dublin, Ireland*

- Oh, H., N. El Amin, T. Davies, P. C. Appelbaum, and C. Edlund. 2001. Gyra mutations associated with quinolone resistance in *Bacteroides fragilis* group strains. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 1977-1981.
- Ozawa, K. et al. 1983. Effect of streptococcus faecalis bio-4r on intestinal flora of weanling piglets and calves. *Appl Environ Microbiol* 45: 1513-1518.
- Pacha, J. 2000. Development of intestinal transport function in mammals. *Physiol Rev* 80: 1633-1667.
- Paget, M. S., and J. D. Helmann. 2003. The sigma70 family of sigma factors. *Genome Biol* 4: 203.
- Pakandl, M. 2009. Coccidia of rabbit: A review. *Folia Parasitologica* 56(3): 153-166.
- Pantosti, A., M. Malpeli, M. Wilks, M. G. Menozzi, and F. D'Ambrosio. 1997. Detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* by pcr. *J Clin Microbiol* 35: 2482-2486.
- Pascual, M., M. Hugas, J. I. Badiola, J. M. Monfort, and M. Garriga. 1999. Lactobacillus salivarius ctc2197 prevents salmonella enteritidis colonization in chickens. *Appl Environ Microbiol* 65: 4981-4986.
- Peeters, J., D. Licois, M. Saco, J. I. Badiola, and J. M. Rosell (Editors). 2000. Enfermedades del aparato digestivo: Causas infecciosas, 2. Mundi-Prensa libros, S.A., 165-213 pp.
- Pérez de Rozas, A. et al. 2013. ¿Qué hemos aprendido y cambiado en los últimos 15 años con la enteropatía? In: ASESCU (ed.) XXXVIII Symposium de Cunicultura de ASESCU. Editorial Agrícola Española, Zamora.
- Pérez de Rozas, A. et al. 2005. Etiopatogenia de la enteropatía epizoótica del conejo. In: XXX Symposium ASESCU, Valladolid (Spain). p 167-174.
- Piriz, S. et al. 2004. Relationship between penicillin-binding protein patterns and beta-lactamases in clinical isolates of *Bacteroides fragilis* with different susceptibility to beta-lactam antibiotics. *J Med Microbiol* 53: 213-221.
- Podglajen, I., J. Breuil, I. Casin, and E. Collatz. 1995. Genotypic identification of two groups within the species *Bacteroides fragilis* by ribotyping and by analysis of pcr-generated fragment patterns and insertion sequence content. *J Bacteriol* 177: 5270-5275.
- Pollmann, D. S., D. M. Danielson, W. B. Wren, E. R. Peo, Jr., and K. M. Shahani. 1980. Influence of *Lactobacillus acidophilus* inoculum on gnotobiotic and conventional pigs. *J Anim Sci* 51: 629-637.
- Pospisil, R., G. O. Young-Cooper, and R. G. Mage. 1995. Preferential expansion and survival of b lymphocytes based on vh framework 1 and framework 3 expression: "Positive" Selection in appendix of normal and vh-mutant rabbits. In: Proc Natl Acad Sci U S A 92: 6961-6965.
- Quigley, E. M. 2008. Probiotics in functional gastrointestinal disorders: What are the facts? *Curr Opin Pharmacol* 8: 704-708.
- Quigley, E. M. 2010. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacol Res* 61: 213-218.

- Raaphorst, F. M., C. S. Raman, B. T. Nall, and J. M. Teale. 1997. Molecular mechanisms governing reading frame choice of immunoglobulin diversity genes. *Immunol Today* 18: 37-43.
- Rakoff-Nahoum, S., J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg, and R. Medzhitov. 2004. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118: 229-241.
- Ratcliffe, B., C. B. Cole, R. Fuller, and M. J. Newport. 1986. The effect of yoghurt and milk fermented with a porcine intestinal strain of *Lactobacillus reuteri* on the performance and gastrointestinal flora of pigs weaned at two days of age. *Food Microbiol.* : 3:203-211.
- Rees Davis, R., and J. Rees Davis. 2003. Rabbit gastrointestinal physiology. *Vet Clin Exot Anim* 6: 139-153.
- Reusch, B. 2005. Rabbit gastroenterology. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 8: 351-375.
- Rhee, K. J., P. Sethupathi, A. Driks, D. K. Lanning, and K. L. Knight. 2004. Role of commensal bacteria in development of gut-associated lymphoid tissues and preimmune antibody repertoire. *J Immunol* 172: 1118-1124.
- Riley, T. V., and B. J. Mee. 1981. Simple method for detecting bacteroides spp. Bacteriocin production. *J Clin Microbiol* 13: 594-595.
- Riley, T. V., and B. J. Mee. 1982. A bacteriocin typing scheme for *Bacteroides*. *J Med Microbiol* 15: 387-391.
- Rodriguez-Romero, N., L. Abecia, and M. Fondevila. 2012. Bacterial profile from caecal contents and soft faeces in growing rabbits given diets differing in soluble and insoluble fibre levels. *Anaerobe* 18: 602-607.
- Rook, G. A., and L. R. Brunet. 2005. Microbes, immunoregulation, and the gut. *Gut* 54: 317-320.
- Rosebury, T. 1962. Microorganisms indigenous to man. Blakiston Division, McGraw-Hill, New York.
- Rosell, J. 1999. Enteropatía mucoide del conejo en España. *In: Jornadas de Cunicultura REOSA, Sitges (Spain)*.
- Rosell, J. (Editor), 2000a. Enfermedades del conejo, 1. Mundi-Prensa Libros, S.A.
- Roy, M. J., and M. Varvayanis. 1987. Development of dome epithelium in gut-associated lymphoid tissues: Association of iga with m cells. *Cell Tissue Res* 248: 645-651.
- Saarela, M., G. Mogensen, R. Fonden, J. Matto, and T. Mattila-Sandholm. 2000. Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *J Biotechnol* 84: 197-215.
- Salyers, A. A. 1984. *Bacteroides* of the human lower intestinal tract. *Annu Rev Microbiol* 38: 293-313.

- Schnupf, P., and P. J. Sansonetti. 2012. Quantitative rt-pcr profiling of the rabbit immune response: Assessment of acute shigella flexneri infection. *PLoS One* 7: e36446.
- Schrezenmeir, J., and M. Vrese. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 73(suppl): 361S-364S.
- Schroeder, H. W., Jr. 2006. Similarity and divergence in the development and expression of the mouse and human antibody repertoires. *Dev Comp Immunol* 30: 119-135.
- Schroeder, H. W., Jr., G. C. Ippolito, and S. Shiokawa. 1998. Regulation of the antibody repertoire through control of hcdr3 diversity. *Vaccine* 16: 1383-1390.
- Sekirov, I., S. L. Russell, L. C. Antunes, and B. B. Finlay. 2010. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 90: 859-904.
- Shanahan, F. 2002. The host-microbe interface within the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 16: 915-931.
- Shenderov, B. A. 2011. Probiotic (symbiotic) bacterial languages. *Anaerobe* 17: 490-495.
- Shetab, R. et al. 1998. Detection of *Bacteroides fragilis* enterotoxin gene by pcr. *J Clin Microbiol* 36: 1729-1732.
- Shirkey, T. W. et al. 2006. Effects of commensal bacteria on intestinal morphology and expression of proinflammatory cytokines in the gnotobiotic pig. *Exp Biol Med* (Maywood) 231: 1333-1345.
- Silva, M., N. V. Jacobus, C. Deneke, and S. L. Gorbach. 1987. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 1231-1233.
- Snider, D., and H. Liang. 2001. Early intestinal th1 inflammation and mucosal t cell recruitment during acute graft-versus-host reaction. *J Immunol* 166: 5991-5999.
- Sommese, L. et al. 2012. Evidence of *Bacteroides fragilis* protection from *Bartonella henselae*-induced damage. *PLoS One* 7: e49653.
- Sorum, M., G. Holstad, A. Lillehaug, and H. Kruse. 2004. Prevalence of vancomycin resistant *Enterococci* on poultry farms established after the ban of avoparcin. *Avian Dis* 48: 823-828.
- Southern, J. A., W. Katz, and D. R. Woods. 1984. Purification and properties of a cell-bound bacteriocin from a *Bacteroides fragilis* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 25: 253-257.
- Stappenbeck, T. S., L. V. Hooper, and J. I. Gordon. 2002. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via paneth cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 15451-15455.
- Strandberg, K. L. et al. 2010. Staphylococcal superantigens cause lethal pulmonary disease in rabbits. *J Infect Dis* 202: 1690-1697.

- Sun, J., and J. E. Butler. 1996. Molecular characterization of v_{dj} transcripts from a newborn piglet. *Immunology* 88: 331-339.
- Swidsinski, A., V. Loening-Baucke, H. Lochs, and L. P. Hale. 2005. Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: A fluorescence in situ hybridization study in mice. *World J Gastroenterol* 11: 1131-1140.
- Tablado, Z., E. Revilla, and F. Palomares. 2012. Dying like rabbits: General determinants of spatio-temporal variability in survival. *J Anim Ecol* 81: 150-161.
- Torres, C., and M. Zarazaga. 2002. Antibiotics as growth promoters in animals. Are we going down the right road? *Gac Sanit* v.16 n.2.
- Tuohy, K. M., H. M. Probert, C. W. Smejkal, and G. R. Gibson. 2003. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discov Today* 8: 692-700.
- Ulsemer, P., K. Toutounian, J. Schmidt, U. Karsten, and S. Goletz. 2012. Preliminary safety evaluation of a new *Bacteroides xylanisolvens* isolate. *Appl Environ Microbiol* 78: 528-535.
- Uzal, F. A., and B. A. McClane. 2012. Animal models to study the pathogenesis of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* infections. *Microbes Infect* 14: 1009-1016.
- van de Guchte, M., T. Chaze, G. Jan, and M. Y. Mistou. 2012. Properties of probiotic bacteria explored by proteomic approaches. *Curr Opin Microbiol* 15: 381-389.
- Vandesompele, J. et al. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative rt-pcr data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034.
- Vesterlund, S., J. Paltta, M. Karp, and A. C. Ouwehand. 2005. Adhesion of bacteria to resected human colonic tissue: Quantitative analysis of bacterial adhesion and viability. *Res Microbiol* 156: 238-244.
- Vincent, J. G., R. C. Veomett, and R. F. Riley. 1959. Antibacterial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*. *J Bacteriol* 78: 477-484.
- Wall, R. et al. 2009. Metabolic activity of the enteric microbiota influences the fatty acid composition of murine and porcine liver and adipose tissues. *Am J Clin Nutr* 89: 1393-1401.
- Wang, Q. et al. 2006. A bacterial carbohydrate links innate and adaptive responses through toll-like receptor 2. *J Exp Med* 203: 2853-2863.
- Wegmann, U., N. Horn, and S. R. Carding. 2013. Defining the *Bacteroides* ribosomal binding site. *Appl Environ Microbiol* 79: 1980-1989.
- Wexler, H. M. 2007. *Bacteroides*: The good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev* 20: 593-621.
- Wideman, R. F., Jr. et al. 2012. A wire-flooring model for inducing lameness in broilers: Evaluation of probiotics as a prophylactic treatment. *Poult Sci* 91: 870-883.

-
- Winstead, C. R., S. K. Zhai, P. Sethupathi, and K. L. Knight. 1999. Antigen-induced somatic diversification of rabbit igh genes: Gene conversion and point mutation. *J Immunol* 162: 6602-6612.
- Wu, L. et al. 2012. Fundamental characteristics of the immunoglobulin vh repertoire of chickens in comparison with those of humans, mice, and camelids. *J Immunol* 188: 322-333.
- Wu, N. et al. 2013. Dysbiosis signature of fecal microbiota in colorectal cancer patients. *Microb Ecol.*
- Yim, S. et al. 2013. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* causes lethal colitis in mongolian gerbils. *Anaerobe* 21: 64-66.
- Yoshida, H., M. Bogaki, Nakamura, and S. M; Nakamura. 1990. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyra* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1271-1272.
- Zhao, Y. et al. 2013. Gut microbiota composition modifies fecal metabolic profiles in mice. *J Proteome Res* 12: 2987-2999.
- Zhu, X., A. Boonthum, S. K. Zhai, and K. L. Knight. 1999. B lymphocyte selection and age-related changes in vh gene usage in mutant alicia rabbits. *J Immunol* 163: 3313-3320.