

ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS DAS FEZES DE BEZERROS SAUDÁVEIS

Thalita Martins Domingues¹

Karen Nascimento da Silva¹, Viviani Gomes¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo (FMVZ/USP)

thadomingues@usp.br

Objetivos

A alta ocorrência de desequilíbrios gastrointestinais em bezerros tem feito com que novas tendências preventivas ganhem espaço. Nesse sentido, os nutracêuticos, como probióticos, emergem com potencial alternativo ao uso metafilático e profilático de antimicrobianos, por atuarem incrementando a microbiota através da produção de metabólitos que potencializam a resposta imune local.

Naturalmente, o trato gastrointestinal (TGI) é colonizado por uma diversidade de microrganismos bacterianos. Essa colonização ocorre desde o momento do parto, passando por alterações de acordo com o desenvolvimento do TGI, estabelecendo-se no momento pós-desaleitamento, sob principal influência da idade e dieta do animal.

Dentre os microrganismos locais, destaca-se os tipos *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsoni* e *Bifidobacterium longum*, como potencialmente probióticos, devido à sua maior abundância em animais saudáveis.

Partindo desse ponto, o presente estudo teve como principal objetivo o isolamento de bactérias probióticas a partir de fezes de bezerros saudáveis, em concomitância com a caracterização de equipe possíveis micro-organismos patobióticos.

Para a coleta das fezes, realizou-se a avaliação da saúde dos animais das fazendas parceiras por meio da observação de sinais clínicos respiratórios e escore de fezes. Em seguida, procedeu-se a higiene e desinfecção do períneo dos animais com clorexidina degermante e álcool, seguida da coleta, a qual foi realizada obtendo-se as fezes diretamente da ampola retal e acondicionando-as em copo coletor universal. Além disso, também se utilizou swab com meio *Stuart* e swab seco para coleta. As amostras foram acondicionadas em caixas de isopor e transportadas até a faculdade.

Os swabs foram semeados em ágar MacConkey, Chromagar Orientation e ágar Columbia, para crescimento em aerobiose, e ágar Brucella com 5% de sangue de sangue e complementos, para crescimento em anaerobiose, sendo todas as placas incubadas a 37°C por 24 a 48 horas. Após a incubação, as colônias isoladas foram semeadas em caldo BHI e separadas em alíquotas para armazenamento a -80°C, conservadas em glicerol, para extração de DNA e identificação de cepas por espectrofotometria de massa (MALDI-TOF).

Em adição, as amostras fecais também foram submetidas a técnica de biologia molecular (PCR) para identificação de Rotavírus e Coronavírus, bem como protocolo de pesquisa de coccídeo (*Cryptosporidium*).

Métodos e Procedimentos

Resultados

As análises laboratoriais relacionadas à biologia molecular retornaram sobre a presença ou não de Coronavírus e/ou Rotavírus nas amostras obtidas, bem como a condição das amostras em relação a *Cryptosporidium*, importantes agentes relacionados à ocorrência de diarreia em bezerros (Tabela 1).

Além disso, com o uso do equipamento de MALDI-TOF foi possível identificar a presença de *Lactobacillus reuteri* e *L. johnsoni* nas fezes coletadas dos bezerros, tipos bacterianos reportados em estudos anteriores como probióticas, sendo estas isoladas e armazenadas no freezer -80°C da faculdade para posterior utilização como estímulo às células cultivadas.

Tabela 1. Relação de resultados obtidos em reação de biologia molecular (PCR) e pesquisa laboratorial por *Cryptosporidium* nas amostras de fezes

Fazenda	ID	Coleta	Data nascimento	<i>Cryptosporidium</i>	Coronavírus	Rotavírus
Fazenda 1	6812	29/11/2022	Sem informação	Negativo	Negativo	Positivo
	6810			Negativo	Negativo	Negativo
	6815			Negativo	Negativo	Negativo
	6814			Negativo	Negativo	Negativo
	6802			++++	Negativo	Negativo
	6762			Negativo	Negativo	Negativo
	6766			Negativo	Negativo	Negativo
Fazenda 2	225	30/11/2022	13/11/2022	Negativo	Negativo	Negativo
	227		17/11/2022	Negativo	Negativo	Negativo
	229		15/11/2022	Negativo	Negativo	Positivo
	231		25/11/2022	Negativo	Negativo	Negativo
	230		26/11/2022	Negativo	Negativo	Negativo
	222		03/11/2022	Negativo	Negativo	Positivo
	220		03/11/2022	Negativo	Negativo	Negativo
	214		07/10/2022	Negativo	Negativo	Positivo

Conclusões

A partir das análises realizadas, bem como uso da técnica de MALDI-TOF para identificação de estirpes bacterianas nas fezes,

o principal retorno foi a identificação da presença de *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsoni* e *Bifidum longum* citados em literatura anterior como atuantes de forma probiótica na microbiota intestinal dos bezerros (Fan et al. 2021; Fernández et al. 2018, Kelly et al. 2018), tendo sido estas obtidas a partir do próprio hospedeiro.

As amostras com essas cepas foram substrato para isolamento bacteriano, as quais foram armazenadas e serão utilizadas em avaliações imunes futuras, podendo gerar importantes frutos em relação à modulação do sistema imune e promoção de saúde gastrointestinal de bezerros.

Agradecimentos

Às equipes dos Laboratórios de Sanidade Suína, da Profa. Dra. Andrea Micke Moreno, Qualileite do Prof. Dr. Marcos Veiga, Laboratório de Virologia do Prof. Dr. Paulo Brandão, fazendas parceiras e equipe GeCria.

Referências

FAN, P.; KIM, M.; LIU, G.; ZHAI, Y.; LIU, T.; DRIVER, JD.; JEONG, KC. **The gut microbiota of newborn calves and influence of potential probiotics on reducing diarrheic disease by inhibition of pathogen colonization.** Front. Microbiol., 2021. 12:772863. doi: 10.3389/fmicb.2021.772863.

FERNÁNDEZ, S.; FRAGA, M.; SILVEYRA, E.; TROMBERT, AN.; RABAZA, A.; PLA, M.; ZUNINO, P. **Probiotic properties of native *Lactobacillus* spp. strains for dairy calves.** Benef Microbes. 2018 Jun 15;9(4):613-624. doi: 10.3920/BM2017.0131. Epub 2018 Apr 10.

VÍRGÍNIO, G.F.; BITTAR, C. M. M.; **Microbial colonization of the gastrointestinal tract of dairy calves – a review of its importance and relationship to health and performance.** Animal Health Research Reviews. DOI:10.1017/S1466252321000062.

ISOLATION OF PROBIOTIC BACTERIA FROM HEALTHY CALVES FECES

Thalita Martins Domingues¹

Karen Nascimento da Silva¹, Viviani Gomes¹

¹Veterinary Medicine School - University of São Paulo

thadomingues@usp.br

Objectives

The high occurrence of gastrointestinal imbalances in calves made new tendencies rise. In this way, the nutraceuticals, like probiotics, raised as a potential alternative of metafilatic and prophylactic use of antimicrobials with the capacity to increase the microbiota with metabolites production that increased the local immune response.

Naturally, the gastrointestinal tract is colonized by a huge diversity of bacteria microorganisms. This colonization occurs after childbirth, suffering alterations with the gastrointestinal tract development, establishing at the postweaning by influence of age and nutrition.

Within the microbiota microorganisms, types like *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii* and *Bifidobacterium longum* receive special attention for the probiotic potential because of their higher abundance in healthy animals.

In this way, the present study objective was to isolate the probiotics bacterias from feces of health calves and characterize the possibilities of probiotics microorganisms.

Materials and methods

For the feces sample collection, the clinical evaluation of farm animals by the observation of respiratory clinical signs and feces score were performed. Then, were performed the hygiene and animal perineum disinfection with degerming chlorhexidine and alcohol for the sampling that was performed by obtaining the feces by the retal ampola and packing them in a universal collection cup. In addition, the swab with *Stuart* swab with Stuart

medium and a dry swab were also used to collect. The samples were put in a polystyrene pack for transportation for the university.

The swabs were seeded in MacConkey, Chromagar Orientation and Columbia agar for aerobic growth and Brucella agar with 5% os blood and complements for anaerobic. All the plates were incubated at 37°C for 24 to 48 hours. After incubation, the isolated colonies were seeded in BHI soup and separated in aliquotas for storage in specific temperature and maintained in glicerol for DNA extraction and strains identification by mass spectrophotometry (MALDI-TOF).

In addition, the feces samples were submitted for a molecular biology technique for identification of *Coronavirus* and *Rotavirus*, besides search protocol of coccidium (*Cryptosporidium*).

Results

The laboratory analyses related by molecular biology gave results about presence or not of *Coronavirus* and/or *Rotavirus* in the samples, important agents related with the diarrhea occurrence in calves (Table 1).

Then, with the use of MALDI-TOF equipment was possible to identify the presence of *Lactobacillus reuteri* and *L. johnsoni* at the feces sampled, bacterial types characterized in previous studies by probiotics. These bacteria were isolated and stored in a -80°C freezer at the university for posterior use like stimulation to cultivated cells.

Table 1. Results obtained in a molecular biology (PCR) and laboratorial search for *Cryptosporidium* in the fecal samples

Farm	ID	Sample date	Birth date	Cryptosporidium	Coronavirus	Rotavirus
Farm 1	6812	11/29/2022	Without information	Negative	Negative	Positive
	6810			Negative	Negative	Negative
	6815			Negative	Negative	Negative
	6814			Negative	Negative	Negative
	6802			++++	Negative	Negative
	6762			Negative	Negative	Negative
	6766			Negative	Negative	Negative
Farm 2	225	30/11/2022	13/11/2022	Negative	Negative	Negative
	227		17/11/2022	Negative	Negative	Negative
	229		15/11/2022	Negative	Negative	Positive
	231		25/11/2022	Negative	Negative	Negative
	230		26/11/2022	Negative	Negative	Negative
	222		03/11/2022	Negative	Negative	Positive
	220		03/11/2022	Negative	Negative	Negative
	214		07/10/2022	Negative	Negative	Positive

Conclusions

From the analyses and MALDI-TOF technique use for bacterial strains identification in feces, the main result was the identification of *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii* and *Bifidobacterium longum* mentioned in previous studies with probiotic action in the gastrointestinal calves microbiota (Fan et al. 2021; Fernández et al. 2018, Kelly et al. 2018), and obtained by the self host.

The samples that contained the strains were substrate for bacterial isolation and that will be used in future immune evaluation, with potential to generate important knowledge about immune system modulation and gastrointestinal calves health promotion.

Acknowledgements

To the teams at the Swine Health Laboratories, Prof. Dr. Andrea Micke Moreno, Qualileite of Prof. Dr. Marcos Veiga, Prof. Virology Laboratory. Dr. Paulo Brandão, partner farms and GeCria team.

References

FAN, P.; KIM, M.; LIU, G.; ZHAI, Y.; LIU, T.; DRIVER, JD.; JEONG, KC. **The gut microbiota of newborn calves and influence of potential probiotics on reducing diarrheic disease by inhibition of pathogen colonization.** Front. Microbiol, 2021. 12:772863. doi: 10.3389/fmicb.2021.772863.

FERNÁNDEZ, S.; FRAGA, M.; SILVEYRA, E.; TROMBERT, AN.; RABAZA, A.; PLA, M.; ZUNINO, P. **Probiotic properties of native *Lactobacillus* spp. strains for dairy calves.** Benef Microbes. 2018 Jun 15;9(4):613-624. doi: 10.3920/BM2017.0131. Epub 2018 Apr 10.

VÍRGÍNIO, G.F.; BITTAR, C. M. M.; **Microbial colonization of the gastrointestinal tract of dairy calves – a review of its importance and relationship to health and performance.** Animal Health Research Reviews. DOI:10.1017/S1466252321000062.