



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**SEGUIMIENTO DEL PROBIÓTICO *Saccharomyces
cerevisiae* (BIOSAF SC 47) EN LECHONES
USANDO LA TÉCNICA DE PCR EN LAS REGIONES
INTERDELTA DEL RETROTRANSPOSÓN Ty1/Ty2.**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

JOEL FLORES BONILLA

TUTOR: ROBERTO ARNULFO CERVANTES OLIVARES
COMITE TUTORAL: REBECA GEORGINA MANNING CELA
CARLOS PIJOAN AGUADE



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EL PRESENTE ESTUDIO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE
MICOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E
INMUNOLOGÍA, EN EL CENTRO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN
Y EXTENSIÓN EN PRODUCCIÓN PORCINA AMBOS
PERTENECIENTES A LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA DE LA UNAM Y EN EL LABORATORIO DE LA DRA.
REBECA G. MANNING CELA DEL DEPARTAMENTO DE
BIOMEDICINA MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y
DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL.

EL SUSTENTANTE RECIBIÓ BECA DE CONACYT (169851)

DEDICATORIA

Con todo mi amor para mi hijo Olaf Flores Herón
y mi esposa Martha Esther Herón Ramírez.

AGRADECIMIENTOS

A mi esposa Martha, por toda la alegría y tristeza que hemos compartido. Por tu fuerza que nos impulsa para consolidar nuestro matrimonio y por hacer posible el mayor milagro de la vida.

A mi padre Joel Flores Carro, a mi madre Esmeralda Bonilla Quintero, a mis hermanas Livia, Ludivina, Esmeralda y Aída, así como a mi sobrina Samantha. Por que siempre me han apoyado y acompañado en todo momento.

A mi amigo Jorge Tovar Díaz, a quien considero mi pilades en esta odisea que es nuestra historia.

Al Dr. Roberto A. Cervantes Olivares, por compartir su conocimiento conmigo y darme una vez más la oportunidad de superarme académicamente.

A la Dra. Rebeca G. Manning Cela, por tener la fortuna de adquirir sus valiosas enseñanzas que han sido inigualables, sinceramente usted es el modelo de lo que debe ser un asesor.

Al Dr. Carlos Pijoan Aguade, por todas sus observaciones y análisis del presente trabajo.

A la M.C. Carolina Segundo Zaragoza, a quien le tengo un profundo respeto, cariño e infinitos agradecimientos. Mi manera de demostrarlo es cumpliendo con este propósito.

Al Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma, por sus apreciables observaciones en la revisión de mi tesis.

Al Dr. Humberto Ramírez Mendoza, por mejorar el contenido escrito del presente estudio.

A la Q.F.B. Claudia Márquez Dueñas, asistente de la Dra. Rebeca Manning en el Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV del IPN, por su invaluable ayuda técnica.

Al Dr. Rafael Olea Pérez, Director del CEIEPP de la FMVZ-UNAM, por haberme permitido realizar el trabajo de campo en estas instalaciones.

A la MVZ María Eugenia Aguilar Nájera de los laboratorios Becton Dickinson®, por todas las facilidades otorgadas para realizar los experimentos previos con el medio CHROMagar Candida®.

Al Dr. Rogelio Alonso del Departamento de Genética y Estadística de la FMVZ-UNAM, por la donación de la Amplificasa®.

A la empresa Saf Mex® y en especial a los doctores Francisco García, Luis Pérez y José Antonio García.

Al Dr. Javier Flores Covarrubias por toda su ayuda desinteresada como miembro de la división de estudios de posgrado de la FMVZ-UNAM.

A todos mis colegas y amigos que me acompañaron durante mis estudios: Horacio, Gilberto, Alberto, Pedro, David, Luis, Jesús, Janet, Luis Enrique, Norma, Julio, Angélica, Marisa, José Antonio, Hugo, Silvia, Josefina, Cnidia, Raúl, Andira, Sarai, Cecilia, Jesús y Antonio.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE CUADROS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vii
<hr/>	
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. La microbiota intestinal.....	1
1.1.1. El paso de la microbiota por el tracto intestinal.....	3
1.1.2. La multifuncionalidad de la microbiota intestinal.....	3
1.1.3. Colonización intestinal.....	5
<hr/>	
1.2. El significado de probiótico.....	6
1.2.1. Los probióticos en la actualidad.....	7
1.2.2. Probióticos en animales de granja.....	8
1.2.3. Levaduras como probióticos.....	11
1.2.4. Estudios de colonización del tracto intestinal por probióticos bacterianos.....	13
1.2.5. Estudios de colonización del tracto intestinal por probióticos micóticos.....	15
1.2.6. Futuro de los probióticos.....	16
<hr/>	
1.3. Herramientas moleculares y otros métodos de identificación en micología.....	18

1.3.1. La amplificación de secuencias δ por la técnica de PCR para identificar cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
--	----

1.4. Justificación.....	23
-------------------------	----

2. OBJETIVO GENERAL.....	24
OBJETIVOS PARTICULARES.....	25

3. HIPÓTESIS.....	26
-------------------	----

4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
4.1. Muestreo de excretas de los lechones.....	27
4.1.1. Características de los animales y alojamientos.....	27
4.1.2. Agrupación de los animales.....	28
4.1.3. Muestreo de las excretas de lechón.....	29
4.1.4. Preparación de las dosis de levaduras para los lechones.....	30

4.2. Determinación del número de UFC de <i>S. cerevisiae</i> por gramo de excretas en el medio de cultivo CA.....	30
4.2.1. Aislamiento y conteo del número de UFC.....	30
4.2.2. Estudios con el medio de cultivo CA.....	31
4.2.3. Determinación del morfotipo colonial de <i>S. cerevisiae</i> y otras especies micóticas en el medio de cultivo CA.....	32
4.2.4. Diferenciación de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> , de otras especies micóticas en el medio de cultivo CA.....	32
4.2.5. Determinación de la capacidad del medio de cultivo CA para recuperar el probiótico <i>S. cerevisiae</i> en excretas de lechón.....	33

4.3. Identificación de la cepa Sc 47 con la técnica de PCR.....	34
4.3.1. Extracción de ADN por el método de congelación-calentamiento súbito.....	34

4.3.2. Amplificación de las secuencias δ de <i>S. cerevisiae</i> cepa Sc 47 por la técnica de PCR.....	36
4.3.3. Detección directa de <i>S. cerevisiae</i> cepa Sc 47 en excretas de lechón por la técnica de PCR.....	38
<hr/>	
5. RESULTADOS.....	39
5.1. UFC/g de <i>S. cerevisiae</i> en el medio de cultivo CA.....	39
5.1.1. Conteo de las UFC de <i>S. cerevisiae</i>	39
5.1.2. Morfotipo colonial de <i>S. cerevisiae</i> y otras especies micóticas en el medio de cultivo CA.....	42
5.1.3. Capacidad del medio de cultivo CA para recuperar el probiótico <i>S. cerevisiae</i> en excretas de lechón.....	42
<hr/>	
5.2. Identificación de la cepa Sc 47 de <i>S. cerevisiae</i> con la prueba de PCR.....	43
5.2.1. Patrón de amplificación de <i>S. cerevisiae</i> cepa Sc 47.....	43
5.2.2. Identificación de cepas diferentes a la cepa Sc 47 e identificación de especies diferentes a <i>S. cerevisiae</i> con la técnica de PCR.....	43
5.2.3. Identificación por la técnica de PCR de los aislados de <i>S. cerevisiae</i> provenientes del tracto intestinal de lechones.....	44
<hr/>	
5.3. Identificación de la cepa Sc 47 de <i>S. cerevisiae</i> de las colonias provenientes del medio de cultivo CA.....	46
5.3.1. UFC de <i>S. cerevisiae</i> cepa Sc 47 identificadas por la técnica de PCR.....	46
<hr/>	
6. DISCUSIÓN.....	48
<hr/>	
7. REFERENCIAS.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS.

API 20 C	Índice de pruebas de asimilación (Assimilation Profile Index) 20 C
ARN	Ácido ribonucleico
bp	pares de bases (base pair)
CA	BBL™ CHROMagar™ Candida (Becton Dickinson)
CEIEPP	Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina
CR2	Criptidina 2 (Cryptdin 2)
CRS4C	Secuencia 4C relacionada a criptidina (Cryptdin-related sequence 4C)
DGGE	Electroforesis en gradientes de geles desnaturalizantes (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
dNTP	deoxinucleótidos trifosfatados (deoxinucleotides triphosphates)
kb	kilobases
LTR	Secuencia repetida terminal larga (Long Terminal Repeat)
mM	Milimolar
ORF	Marcos de lectura abierta (Open Reading Frames)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PRRS	Síndrome porcino respiratorio-reproductivo
RAPD	ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (Randomly Amplified Polymorphic DNA)
RFLP	Longitud del polimorfismo de los fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism)
rpm	Revoluciones por minuto (Revolution per minute)
rRNA	ARN ribosomal (ribosomal ribonucleic acid)
SAA1	Suero amiloide A 1 (Serum Amyloid A 1)
Sda	Agar dextrosa de sabouraud (Sabouraud dextrose agar)
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida-duodecil sulfato de sodio (Sulfate Duodecyl Sodium-Polyacrilamide Gel Electrophoresis)
ssf	solución salina fisiológica
TGGE	Electroforesis en gradientes de temperatura (Temperature Gradient Gel Electrophoresis)
tRNA	ÁRN de transferencia (transference Ribonucleic Acid)
Ty	Transposón de levadura (Transposon yeast)
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
YPD agar	agar dextrosa, peptona, extracto de levadura (Yeast extract, Peptone, Dextrose agar)
δ	Delta

LISTA DE CUADROS

Número	Descripción	Página
1	Microorganismos usados como probióticos en animales domésticos.	75
2	UFC/g de <i>S. cerevisiae</i> en heces en el medio CHROMagar Candida®.	76
3	Descripción del morfotipo colonial de especies micóticas en el medio CHROMagar Candida®.	77
4	Identificación presuntiva de especies micóticas en el medio de cultivo CHROMagar Candida® y confirmación por PCR en <i>S. cerevisiae</i> y en el resto de las levaduras por métodos convencionales.	78
5	Agrupación de los patrones obtenidos por la técnica de PCR en los <i>S. cerevisiae</i> , aislados de lechones cuyas madres recibieron el 0.3 % de BIOSAF® Sc 47.	79
6	Agrupación de los patrones obtenidos por la técnica de PCR en los <i>S. cerevisiae</i> , aislados de lechones cuyas madres sólo recibieron alimento comercial.	80
7	Agrupación de los patrones obtenidos por la técnica de PCR en los <i>S. cerevisiae</i> aislados de lechones que recibieron el 0.3 % de BIOSAF® Sc 47.	81
8	UFC/g de <i>S. cerevisiae</i> cepa Sc 47 en heces confirmadas por la técnica de PCR.	82
9	Ventajas y desventajas de los métodos de identificación utilizados.	83

LISTA DE FIGURAS

Número	Descripción	Página
1	Elementos Ty en el genoma de <i>S. cerevisiae</i> cepa S288C.	84
2	Principio de la técnica de PCR que amplifica las secuencias δ .	85
3	Cronograma de manejo zootécnico, alimentación y días de muestreo de las excretas de lechones.	86
4	Toma de muestras de los lechones utilizados en el experimento.	87
5	UFC de <i>S. cerevisiae</i> en el medio CHROMagar Candida®.	88
6	Gráfica de UFC/g de <i>S. cerevisiae</i> en heces en el medio CHROMagar Candida®.	89
7	Morfotipo colonial de <i>S. cerevisiae</i> en el medio CHROMagar Candida®.	90
8	A. Morfotipo colonial de especies micóticas en el medio CHROMagar Candida®.	91
9	B. Morfotipo colonial de especies micóticas en el medio CHROMagar Candida®.	92
10	Morfotipo colonial de <i>S. cerevisiae</i> mezclada con otras levaduras en el medio CHROMagar Candida®.	93
11	Recuperación de <i>S. cerevisiae</i> contenido en excretas de lechón en el medio CHROMagar Candida®.	94
12	Prueba de PCR en <i>S. cerevisiae</i> cepa Sc 47.	95
13	Prueba de PCR de cepas de <i>S. cerevisiae</i> y otras especies micóticas.	96
14	Prueba de PCR de 7 patrones de <i>S. cerevisiae</i>	97
15	Agrupación de <i>S. cerevisiae</i> provenientes de tres experimentos.	98
16	Agrupación de <i>S. cerevisiae</i> diferentes a la cepa Sc 47 provenientes de tres experimentos.	99

17	Agrupación de <i>S. cerevisiae</i> provenientes de lechones cuyas madres recibieron el 0.3 % de BIOSAF® Sc 47.	100
18	Agrupación de <i>S. cerevisiae</i> provenientes de lechones cuyas madres sólo recibieron alimento comercial.	101
19	Agrupación de <i>S. cerevisiae</i> provenientes de lechones que recibieron el 0.3 % de BIOSAF® Sc 47.	102
20	Gráfica de UFC/g de <i>S. cerevisiae</i> cepa Sc 47 en heces confirmadas por la técnica de PCR.	103

2. RESUMEN.

FLORES BONILLA JOEL. Seguimiento del probiótico *Saccharomyces cerevisiae* (BIOSAF® Sc 47) en lechones usando la técnica de PCR en las regiones interdelta del retrotransposón Ty1/Ty2. (Bajo la asesoría de Dr. Roberto Arnulfo Cervantes Olivares, Dra. Rebeca Georgina Manning Cela y Dr. Carlos Pijoan Aguade).

Los probióticos se definen como "suplemento alimenticio microbiano vivo, cuyo efecto benéfico en el hospedero animal es el de mejorar el balance microbiano intestinal". Los probióticos son utilizados en medicina veterinaria como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales y como estimulantes del crecimiento, este último con la finalidad de sustituir el uso de antibióticos. No se tienen suficientes pruebas científicas que indiquen la permanencia temporal o permanente del probiótico *Saccharomyces cerevisiae* en el tracto gastrointestinal del lechón. Por lo que en este trabajo experimental se estudió el tiempo de eliminación del probiótico *S. cerevisiae* cepa Sc 47 en 10 lechones que recibieron una dosis diaria de 1×10^8 levaduras de probiótico durante 7 días. Se colectaron excretas de estos lechones y otros 3 lechones control al 1°, 2°, 5°, 8°, 11°, 14°, 17°, 20°, 23° y 25° día del experimento, se hicieron diluciones decimales con las muestras y se plaquearon en el medio de cultivo BBL™ CHROMagar™ Candida. Obteniendo un crecimiento de *S. cerevisiae* a las 72 horas así como una identificación presuntiva por el color de la colonias, lo cual facilitó el conteo de las unidades formadoras de colonias de *S. cerevisiae* en excretas. Posteriormente por la técnica de PCR utilizando los iniciadores D₁ y D₂ que amplifican los elementos interdelta, se logró la identificación cepa-específica de Sc 47 por el patrón único en el polimorfismo obtenido

de los productos amplificados, el cual fue diferente a otros 7 patrones encontrados de cepas silvestres de *S. cerevisiae*, también aislados del tracto intestinal de los lechones. Los resultados muestran que el probiótico BIOSAF[®] Sc 47, es eliminado con las excretas de los lechones hasta 7 días después de suspender su administración. Estos hallazgos indican de forma indirecta la presencia temporal de la cepa Sc 47 de *S. cerevisiae* en el tracto intestinal y por lo tanto se sugiere su administración continua para obtener un efecto benéfico constante.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, probiótico, lechones, PCR.

ABSTRACT.

FLORES BONILLA JOEL. Tracking the *Saccharomyces cerevisiae* (BIOSAF® Sc 47) probiotic in piglets using the PCR technique in the interdelta regions of retrotransposon Ty1/Ty2.

The term probiotic, means "A live microbial feed supplement which beneficially affects the animal host by improving its intestinal microbial balance". Probiotics in veterinary medicine have been used as therapeutic agents for the treatment of gastrointestinal diseases, also as growth promoters instead of the use of antibiotics. There are not enough scientific studies on the temporary or permanent permanence of *Saccharomyces cerevisiae* probiotic in the piglet gastrointestinal tract. So in this experimental work, we studied the excretion time of the probiotic *S. cerevisiae* strain Sc 47 in 10 piglets, which were given one daily dose of 1×10^8 probiotic yeast for 7 days. These piglets along with 3 other control piglets had their faeces sampled at 1st, 2nd, 5th, 8th, 11th, 14th, 17th, 20th, 23rd and 25th experimental days, a decimal dilution was prepared with the samplings and plated on BBL™CHROMagar™ Candida culture medium. We obtained growth of *S. cerevisiae* at 72 hours and performed a presumptive identification by the colors of the colonies, which made the count of the colony forming units of *S. cerevisiae* in faeces easier. Subsequently, by the PCR technique using primers D₁ and D₂ that amplified the interdelta elements, we achieved the strain-specific identification of Sc 47 using the unique banding patterns in the polymorphism amplification products that were different from patterns of seven other *S. cerevisiae* strains also isolated from the piglets intestinal tract. The results show that the probiotic BIOSAF® Sc 47, is eliminated in the piglets faeces up to 7 days after discontinuing the probiotic administration. Findings indicate, indirectly, the

temporary permanence of the strain Sc 47 of *S. cerevisiae* in the intestinal tract, thus, continuous administration of the probiotic is recommended to obtain a constant beneficial effect.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, probiotic, piglets, PCR.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. La microbiota intestinal.

El ecosistema intestinal se considera como un ambiente extremadamente complejo, debido a la interacción permanente entre células hospederas, nutrientes y una población microbiana coexistiendo en equilibrio en una región definida espaciotemporal (Mitsuoka, 1992; Holzapfel *et al.*, 1998 y Bourlioux *et al.*, 2003). La población temprana de bacterias y hongos en el tracto gastrointestinal de los animales recién nacidos es muy importante ya que define las poblaciones microbiológicas que habitarán éste en forma normal (Tannock, 1999). Actualmente se sabe que estos microorganismos pioneros son capaces de modular la expresión de los genes CRS4C, SAA1 y CR2 en las células epiteliales, por lo que llevan ventaja sobre futuros competidores ya que crean nichos favorables y así mismo previenen el desarrollo de otros microorganismos (Ogawa *et al.*, 2000; Stappenbeck *et al.*, 2002 y Guarner y Malagelada, 2003).

De esta manera podrán distinguirse dos poblaciones que se diferenciarán una de otra por el nivel de persistencia en la mucosa intestinal (Reid y Friendship, 2002). Esto significa, que algunas poblaciones microbianas estarán siempre en niveles altos y usualmente se encontrarán durante la vida del animal, a estas poblaciones se les conoce como microbiota autóctona o residente; también se caracterizan por ser altamente compatibles con el ambiente intestinal del hospedero, poder multiplicar su población y ser toleradas por el sistema inmune del hospedero al grado de no ser eliminados del intestino. (Bourlioux *et al.*, 2003). Mientras que aquellas poblaciones microbiológicas de tamaño

variable que diariamente son ingeridas junto con el alimento y agua y que compiten directamente por los nutrientes y espacios dentro del intestino con la microbiota residente, se les denomina microbiota transitoria y tienen como característica principal a su densidad de población la cual va a estar determinada por cambios en el intestino producidos tanto por factores exógenos como endógenos (Tannock, 1999).

Dentro de la microbiota transitoria se encuentran organismos oportunistas, los cuales se clasifican en dos tipos de acuerdo al efecto que producen en el hospedero, unos que aprovechan cualquier oportunidad para causar daño y otros que son benéficos al hospedero, a estos se les denominan probióticos y pueden ser bacterias u hongos cuya característica es la de ser inocuos y hasta el momento no se ha encontrado que sean dañinos para la salud del consumidor (Salminen *et al.*, 1998 a y Tannock, 1999). A esta clase de microorganismos que se introducen a un lugar diferente al que fueron generados se denominan como cepas aloctonas (Tannock, 1999). Se demostró en mamíferos, que la reacción del organismo hacia las cepas aloctonas en el ambiente intestinal es diferente a las cepas autóctonas, ya que estas últimas son altamente compatibles con el hospedero, pero cuando las cepas aloctonas en este caso los probióticos intentan adherirse a la epitelio intestinal, el sistema inmune de la mucosa intestinal (principalmente macrófagos y las Inmunoglobulinas A secretoras) reacciona contra ellos de la misma manera que lo hace para eliminar a los microorganismos oportunistas (Tannock, 1999).

1.1.1. El paso de la microbiota por el tracto intestinal.

En los animales monogástricos la microbiota se encuentra distribuida a todo lo largo del tracto gastrointestinal, pero es el estómago el sitio anatómico donde las poblaciones microbianas son más bajas debido a la acidez que es inducida por la bomba de protones y que destruye a la mayoría de las bacterias y levaduras ingeridas, sin embargo los microorganismos que sobreviven pasan a través del píloro hacia el duodeno (Brassart y Schiffrin, 1997; Holzapfel *et al.*, 1998 y Bourlioux *et al.*, 2003). Al llegar al duodeno el pH se acerca a la neutralidad sin embargo estos microorganismos son atacados por las sales biliares y secreciones pancreáticas (Brassart y Schiffrin, 1997; Holzapfel *et al.*, 1998 y Bourlioux *et al.*, 2003) para después ser removidos por la motilidad y el recambio del epitelio intestinal. En humanos se conoce que las bacterias que sobreviven a estos ataques incrementan significativamente su número conforme transitan por yeyuno hasta llegar al colon, jugando este sitio un papel importante en la nutrición, fisiología y la regulación del sistema inmune del hospedero (Bourlioux *et al.*, 2003). Por lo que el éxito de supervivencia dentro del tracto gastrointestinal va a depender de la resistencia del microorganismo a obstáculos físicos y químicos.

1.1.2. La multifuncionalidad de la microbiota intestinal.

En los animales monogástricos como el cerdo, la microbiota que sobrevivió a las defensas del hospedero prefieren establecerse en el ciego, ya que es ahí donde tienen acceso a los nutrientes que no fueron absorbidos y digeridos por el huésped y que requieren para proliferar (Ewing y Cole, 1994). La diversidad genética de la comunidad microbiana

provee de varias enzimas y rutas bioquímicas, entre éstas la fermentación microbiana, tales rutas proveen de numerosos metabolitos de interés para el hospedero (Mitsuoka, 1992; Bourlioux *et al.*, 2003; Guarner y Malagelada, 2003). Estos metabolitos varían dependiendo el sustrato ya que si este es un carbohidrato se producirán ácidos grasos de cadena corta como el ácido acético, butírico y propiónico los cuales participan en la regulación hepática de lípidos, azúcares y también sirven de energía para las células de la mucosa intestinal. Otros efectos benéficos son la hidrólisis de lípidos, desdoblamiento de proteínas y producción de vitaminas (Mitsuoka, 1992; Holzapfel *et al.*, 1998 y Bourlioux *et al.*, 2003). Por otra parte, la microbiota intestinal es esencial para la estimulación inmune de la mucosa (activación) y amplificación de células inmunocompetentes (Holzapfel *et al.*, 1998) y junto con la mucosa intestinal y el sistema inmune local, cumplen la función de protección del hospedero en contra de agresiones del ambiente externo, por lo que de manera inespecífica la microbiota intestinal resiste la colonización de cualquier nueva cepa microbiológica, suprimiendo cualquier posible diseminación de bacterias u hongos, mediante alguno de los siguientes mecanismos:

- 1) Agotamiento o competencia por el mismo sustrato,
- 2) Competencia por sitios de adhesión en el moco intestinal o en las células,
- 3) Producción de un ambiente restrictivo fisiológico, como lo es el pH, potencial redox, producción de sulfuro de hidrógeno o producción de metabolitos tóxicos,
- 4) Producción *in vitro* de sustancias inhibitorias como bacteriocinas,
- 5) Producción de señales moleculares de supervivencia (Kennedy y Volz, 1985; Bourlioux *et al.*, 2003).

1.1.3. Colonización intestinal.

Como ya se describió la composición de la microbiota estará determinada por el hospedero y los factores microbianos y si bien es cierto que muchas bacterias y levaduras logran sobrevivir y crecer en el tracto intestinal, también hay muchas que no pueden (Fooks y Gibson, 2002).

El contacto de la microbiota con el hospedero se realiza a través de una película de moco que se encuentra recubriendo la mucosa intestinal y que es producida por las células Goblet de las vellosidades intestinales, este moco esta constituido por mucinas y sus componentes son glicoproteínas y carbohidratos entre los que se encuentran: N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, galactosa, fructosa y ácido siálico que al unirse forman diversas estructuras que llegan a estar en contacto directo con la microbiota. Actualmente se sabe que estas estructuras juegan un papel importante en el proceso de reconocimiento célula-microorganismo (Bourlioux *et al.*, 2003; Guarner y Malagelada, 2003), esto es por que dependiendo de las estructuras que formen los carbohidratos servirán como sitios potenciales de adhesión para diversas especies de bacterias y levaduras. El repertorio innato de sitios de adhesión está genéticamente controlado por el genoma del hospedero y debido a que cada individuo tiene un genoma personal, la colonización del tracto gastrointestinal y su microbiota varía en cada individuo, ya que bajo condiciones normales, la microbiota intestinal no necesitan forzosamente adherirse a las células y esto ha sido confirmado por estudios que muestran que la microbiota normal prefiere permanecer en la superficie del moco a la entrada de las vellosidades, pero nunca dentro de las criptas intestinales (Bourlioux *et al.*, 2003). Por otra parte Salminen *et al.* (1998.b) definió la

existencia de adhesión de bacterias ácido lácticas a células intestinales ya sea de manera inespecífica, a través de factores físico-químicos, o específica con la interacción entre las moléculas adhesinas de la superficie de las bacterias adherentes y las moléculas receptoras en las células epiteliales.

Otro proceso de regulación es la intercomunicación o "cross-talk", en la que se ha demostrado que la microbiota residente envía mensajes a los enterocitos del hospedero. Estos mensajes interfieren con la expresión o actividad de las glicosiltransferasas celulares, las cuales inducen cambios en el repertorio de carbohidratos y con ello en los sitios de adhesión (Bourlioux *et al.*, 2003; Guarner y Malagelada, 2003).

En individuos sanos las poblaciones de la microbiota intestinal permanecen en equilibrio, pero existen factores que influyen en la composición de la microbiota intestinal, entre los que se encuentran el ambiente, la microbiota materna, forma de nacimiento (parto normal o cesárea), estado fisiológico, edad, composición de la dieta, prebióticos, antibióticos y probióticos (Mitsuoka, 1992 y Bourlioux *et al.*, 2003).

1.2. El significado de probiótico.

La palabra probiótico deriva del significado griego "para la vida" y su definición ha ido cambiando con el tiempo, siendo en el año de 1989 cuando Roy Fuller establece la siguiente definición que hasta la fecha sigue siendo utilizada: "suplemento alimenticio microbiano vivo, cuyo efecto benéfico en el hospedero animal es el de mejorar el balance

microbiano intestinal" (Fuller, 1989). Subrayando en esta definición la necesidad de usar microorganismos viables (Cuadro 1).

Años después, otros investigadores definieron a los probióticos como "un monocultivo o mezcla de cultivos de microorganismos vivos los cuales al ser aplicados al hombre o animales afectan benéficamente al hospedero al mejorar las propiedades de la microflora indígena" (Shortt, 1999). Refiriéndose a la aplicación no solo en el tracto intestinal sino en otros sitios como por ejemplo el tracto respiratorio, el tracto urogenital y la piel. Sin embargo, esta definición no ha sido aceptada ya que se desconocen el o los efectos en estos nuevos sitios anatómicos de aplicación. En 1998 un grupo de científicos europeos sugirió que los probióticos que son usados en la nutrición humana se definan como "ingredientes o suplementos alimenticios microbianos vivos que son benéficos para la salud" (Shortt, 1999; Fooks y Gibson, 2002), siempre retomando la esencia de la definición de probiótico hecha por Fuller.

1.2.1. Los probióticos en la actualidad.

El uso de los probióticos ha despertado gran interés en los investigadores debido a que se están buscando alternativas al uso de antibióticos utilizados desde los años 50s como agentes terapéuticos y estimulantes del crecimiento en los animales de granja (Fuller, 1989). El uso de los antibióticos ha sido limitado por el comité Swann desde 1969, cuya recomendación fue la de restringir el uso de antibióticos como promotores del crecimiento a aquellos que no sean utilizados para el tratamiento de enfermedades (Fuller, 1989; 1999; Reid y Friendship, 2002). Actualmente, se ha restringido el uso de todos ya que se ha observado que las bacterias

patógenas del tracto gastrointestinal de los animales como *Staphylococcus* spp, *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Yersinia* spp y *Campylobacter* spp presentan un incremento en la resistencia múltiple a antibióticos dificultando así una terapia posterior con estos y otros antibióticos no sólo en animales sino también en humanos. Además existe un riesgo por los residuos que permanecen en la carne y debido al peligro que esto representa, los consumidores de carne prefieren comprar carne libre de antibióticos, así también de hormonas y otros químicos (Fuller, 1989; Tannock, 1999; Reid y Friendship, 2002). Por todos estos efectos negativos que han causado los antibióticos como estimulantes del crecimiento, se ha permitido que los probióticos tengan la oportunidad de ser utilizados como suplementos alimenticios por los productores para sustituir el papel que desempeñaban los antibióticos (Fuller, 1989; 1999, Tannock, 1999; Reid y Friendship, 2002).

1.2.2. Probióticos en animales de granja.

A partir de 1960 los probióticos empezaron a ser utilizados en animales de granja como una herramienta microbiológica en la que se ha propuesto que estos microorganismos vivos sean utilizados como suplemento alimenticio y mejoren así el balance microbiológico intestinal (Fuller, 1989; 1999).

Las cepas comerciales de bacterias, levaduras y hongos filamentosos que son utilizados en la industria de los probióticos son altamente seguros para el consumidor, ya que no tienen efectos dañinos o tóxicos, como lo demuestran los estudios realizados por Salminen *et al.*, (1998.a) con la degradación de moco intestinal, el cual forma la primer barrera física entre

el lumen intestinal y las células epiteliales. Sin embargo, se ha considerado la seguridad de los probióticos en reportes clínicos y revisiones ya que la levadura *S. cerevisiae* se ha encontrado como oportunista en pacientes inmunocomprometidos, pero no ocurre en todos los casos ya que esta misma levadura se ha administrado en pacientes humanos con enfermedad de Crohn y SIDA para el tratamiento de enteritis y estos pacientes no mostraron ninguna infección. En el caso de pacientes que sufrieron funguemia, se sospecha que la vía de entrada a la circulación sistémica fue a través del catéter que otros pacientes poseían. Es por eso que continuamente los organismos utilizados como probióticos, sobre todo las cepas nuevas, son evaluadas para conservar este margen de seguridad (Brassart y Schiffrin, 1997 y Salminen *et al.*, 1998. b).

El objetivo de los probióticos es mejorar la salud y promover el crecimiento de los animales, sumado a la capacidad de reparar los cambios en la composición y actividad de la microbiota intestinal cuando son sometidos a terapias de antibióticos, la excesiva higiene, el cambio brusco de alimentación y el estrés (Fuller 1989; 1999). Un ejemplo claro sucede en la producción porcina ya que día a día se busca que las granjas de cerdos sean más eficientes implementando sistemas de manejo como destete temprano segregado o destete temprano medicado. Esto tiene sus consecuencias como el acortamiento de la permanencia de los animales jóvenes con sus madres (destete a las dos semanas de edad), impidiendo la completa adquisición de la microbiota normal intestinal, además del estrés que el destete les ocasiona. Por otro lado, la excesiva higiene previene la adquisición de una microbiota protectora y el manejo zootécnico como el tratamiento oral con antibióticos, suprime la actividad de la microbiota adquirida favoreciendo el vaciamiento de estos

microorganismos ya que el tratamiento con antibióticos por sí sólo es común que produzca diarrea (Fuller, 1989; Reid y Friendship, 2002). Se han presentado las siguientes enfermedades emergentes en lechones postdestete: diarreas por *E. coli*, enfermedad del edema, enfermedad de Glasser, meningitis estreptococal, circovirus, parvovirus y PRRS las cuales están relacionadas directamente a la alteración o ausencia de microbiota protectora (Reid y Friendship, 2002). Estos sistemas intensivos, también han contribuido a la colonización por *Salmonella* spp en el intestino del cerdo, siendo la salmonelosis una de las zoonosis más importantes transmitidas por el consumo de carne infectada (Reid y Friendship, 2002). Por otra parte, el estrés producido por cambios drásticos en el ambiente físico o emocional afecta el establecimiento de una microbiota protectora disminuyendo algunos de los géneros predominantes como *Lactobacillus* spp, e incrementado a los coliformes (Fuller, 1989). Es sabido que los cambios hormonales reducen la producción de moco, el cual es importante para la fijación y supervivencia de poblaciones microbianas (Fuller, 1989). Por todas las situaciones mencionadas en donde la microbiota intestinal normal es adversamente afectada, los probióticos serían de gran utilidad por su capacidad de restaurar la microbiota intestinal del hospedero (Fuller, 1989).

El beneficio de los probióticos se ha utilizado a todas las edades en los animales y en las siguientes especies animales: bovinos, ovinos, cabras, cerdos, pollos y en menor proporción en caballos (Fuller, 1989; 1999). También se menciona su uso en mascotas, sin embargo en México no se tienen datos de su uso. La preparación de los probióticos puede consistir de una sola cepa o de una mezcla de hasta ocho cepas microbianas.

1.2.3. Levaduras como probióticos.

Saccharomyces cerevisiae ha sido la levadura con mayor utilidad biotecnológica, es utilizada desde hace milenios para obtener bebidas fermentadas y sus derivados, actualmente es utilizada en la industria química/alimenticia (por ejemplo: obtención de saborizantes salados, enzimas, pigmentos, acidulantes alimenticios, etc.), en tecnología ambiental (por ejemplo: utilización de desechos, protección de cultivos, etc.), en investigación biomédica (por ejemplo: cáncer, SIDA, metabolismo de drogas, desórdenes genéticos humanos, etc.), en investigación biológica fundamental (ejemplos: biología celular, genética, bioquímica, biología molecular, etc.) y en la industria para el cuidado de la salud (ejemplos: farmacéutica, vacunas, hormonas, probióticos, etc.) (Walker, 2000).

En medicina veterinaria ha despertado un gran interés el uso de la biomasa de *S. cerevisiae* como probiótico para promover el crecimiento de animales y también en la bioterapia de enfermedades intestinales (Walker, 2000). En el estudio realizado por Reid y Friendship en el 2002 en gallinas de engorda a las cuales se les administró *S. cerevisiae* en el alimento, se demostró un incremento en la ganancia de peso sin reportar efectos negativos, este mismo efecto fue reportado por en bovinos productores de carne. En los estudios realizados por Walker, (2000) menciona que, en rumiantes, el uso de cultivos vivos de *S. cerevisiae* estabiliza el ambiente ruminal y mejora la disponibilidad de nutrientes como nucleótidos, aminoácidos y vitaminas para incrementar el crecimiento animal y la producción láctea (Giger-Reverdin *et al.*, 1996; Guarner y Malagelada, 2003). También se reporta que las levaduras

pueden prevenir el estrés oxidativo en las bacterias ruminales al utilizar el oxígeno en rumen y proveer de ácido málico y otros ácidos dicarboxílicos que estimulen el crecimiento bacteriano ruminal, especialmente a la microbiota celulolítica (Walker, 2000). Por otra parte, Giger-Reverdin *et al.*, (1996) demostró *in vivo* e *in vitro* que la microbiota normal es afectada por la disminución del pH ocasionada por la fácil fermentación de grandes cantidades de carbohidratos, pero que al ser utilizados por la levadura evitan esta disminución ya que incrementan la cantidad total de ácidos grasos volátiles. Han sido obtenidos muy buenos resultados con la adición de la levadura a la dieta de rumiantes adultos (Fuller *et al.*, 1999), sin embargo hasta la fecha son pocos los estudios del efecto de la levadura en la dieta de los animales monogástricos como por ejemplo el cerdo. Esto debido a que los animales de estómago simple no son tan dependientes de la digestión fermentativa como lo son los rumiantes, por lo que el efecto promotor del crecimiento se centra más bien en explicar el control de patógenos o en la profilaxis de infecciones subclínicas (Ewing y Cole, 1994; Cuarón, 1999)

Otro de los posibles mecanismos de acción es el aparente antagonismo específico de la levadura con *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Clostridium difficile*, *Candida albicans* y *Entamoeba histolytica*, ya que al parecer estos grupos microbianos se adhieren a la membrana de *S. cerevisiae*, aparentemente por la afinidad de sus moléculas de superficie hacia uno de los principales carbohidratos (manosa) el cual es un componente de la pared celular de la levadura, formando complejos levadura-microorganismo que estimulan la peristalsis y otros mecanismos de eliminación física (Cuarón, 1999). Por otra parte en un estudio previo realizado con *S. cerevisiae*, el cual fue administrado al 0.3 %

en la alimentación de cerdas, se observó que sus lechones tienen una colonización a los 8 y 25 días de edad por levaduras saprofitas, a diferencia de lechones de la misma edad cuyas madres no recibieron *S. cerevisiae*. Es posible que este efecto se deba a un efecto atrayente que la levadura tiene sobre otras cepas micóticas que se encuentren en el ambiente, permitiendo una colonización transitoria del tracto intestinal con poblaciones de microorganismos saprofitos mejor adaptados y a su vez se transmitan a su descendencia (Flores, 2002).

1.2.4 Estudios de colonización del tracto intestinal por probióticos bacterianos.

Estudios realizados hasta el momento en la colonización del tracto intestinal por probióticos, no han encontrado evidencia alguna que demuestre que los probióticos utilizados se adhieran de manera permanente a la mucosa intestinal (Bezkorovainy, 2001). De hecho el porcentaje promedio de supervivencia de éstos en las heces es de 20 a 40 % (Bezkorovainy, 2001).

Para estudiar la habilidad de microorganismos probióticos, sobre todo bacterias del género *Lactobacillus*, de adherirse al epitelio intestinal se han realizado estudios *in vitro* con líneas epiteliales intestinales como Caco-2 o células HT-29, en los que se demuestra que el probiótico *Lactobacillus* GG logra adherirse a estas células intestinales, en forma variable y dependiente de condiciones como por ejemplo el pH, buffer, moco intestinal, tipo de células y fase de crecimiento bacteriano (Bezkorovainy, 2001). Se asume entonces la necesidad de estudios más acordes a condiciones naturales como lo es el análisis *in situ* (Blum *et al.*,

1999). Así también, en el estudio que realizaron Pedersen y Tannock, (1989) con diferentes cepas de *Lactobacillus* en lechones, encontraron que no existe correlación entre los resultados de adhesión *in vitro* y el comportamiento de las cepas de *Lactobacillus* en el tracto digestivo.

Los estudios realizados *in vivo* en humanos con *Bifidobacterium* spp y *Lactobacillus rhamnosus* DR20, los cuales también son utilizados como probióticos, mostraron de manera contundente no colonizar el tracto gastrointestinal (Bezkorovainy, 2001 y Salminen *et al.*, 1996). Mismos resultados obtuvieron Jadamus *et al.* en el 2001 con *Bacillus cereus* var. *toyoi* como probiótico probado en pollos de engorda y lechones.

Cabe mencionar que se ha reportado la posibilidad de que cepas de *Lactobacillus* lleven a cabo una colonización transitoria del tracto gastrointestinal en humanos ya que su recuperación en las heces después de suministrarse, fue factible durante la primera semana (Goldin *et al.*, 1992 y Fuller, 1997). En otros estudios con *Lactobacillus acidophilus* LF221 en ratones y lechones, se observó sólo en este último una naturalización de la cepa ya que se encontró en concentraciones superiores a la dosis original hasta los 10 días posteriores a la administración, mientras que en los ratones el tiempo de permanencia de la bacteria fue únicamente hasta el día en que se dejó de suministrar (Rogelj *et al.*, 2002).

1.2.5. Estudios de colonización del tracto intestinal por probióticos micóticos.

En el caso de las levaduras usadas como probióticos, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, se encontró que después de la administración oral en ratones y humanos, tiende a una exclusión rápida y no hay colonización de la pared gastrointestinal (Maejima *et al.*, 1980). En humanos la desaparición de *S. cerevisiae* por las heces fue a los 5 días después de suspender la administración, sugiriendo que no ocurre una implantación permanente o multiplicación de la levadura (Pecquet *et al.*, 1991). Por otro lado en ratones gnotobióticos, la levadura permaneció en el tracto intestinal durante el tiempo que fue administrada, pero cuando se adicionaron microorganismos enteropatógenos el número de levaduras disminuyó (Pecquet *et al.*, 1991).

Tampoco se conocen hasta el momento factores de adherencia ni se ha demostrado la capacidad de adhesión de *S. cerevisiae* a células epiteliales de la mucosa intestinal. En un estudio realizado por Murphy y Kavanagh, (2000) para determinar los factores relacionados a la adhesión de *S. cerevisiae* a células epiteliales, los investigadores sugirieron cultivarlas en presencia de fuentes de carbono (galactosa o sacarosa) para favorecer la adhesión. Estudios realizados por Vázquez-Juárez *et al.*, (1997) con cepas virulentas de *S. cerevisiae* aisladas de vaginitis sugieren que la adherencia puede ser mediada por adhesinas semejantes a las que posee *Candida albicans* y por otro lado la posibilidad de que dicha adherencia sea mediada por la hidrofobicidad de la superficie celular a la que intente adherirse.

1.2.6. Futuro de los probióticos.

Para estudiar la posibilidad de que microorganismos benéficos, tales como los probióticos tengan una interacción con enterocitos o con la microbiota presente que permita una presencia estable y un efecto continuo en el tracto gastrointestinal del hospedero será necesario realizar investigaciones microbiológicas, celulares y de biología molecular (Bourlioux, 2003).

Continuamente se están buscando nuevas cepas bacterianas y micóticas que sean adecuadas para cada especie animal (aves, porcinos y bovinos) ya que las investigaciones hasta ahora realizadas han mostrado que cada cepa de probiótico tiene una eficacia variable en cada especie animal (Fuller, 1997; 1999; Hillman, 1999; y Agarwal *et al.*, 2000). Se ha propuesto que la inconsistencia de estos resultados sean debido a factores tales como:

A) Las diferentes cepas microbianas utilizadas como probióticos ya que cada cepa es obtenida de distinta fuente (heces, agua, alimentos, etc.) y de diferentes especies animales, por lo que poseen características fisiológicas y necesidades ambientales distintas (Hillman, 1999);

B) El número de generaciones microbianas entre el aislamiento y su aplicación, ya que los microorganismos se acostumbran a la disponibilidad de nutrientes en el laboratorio donde carecen de competidores en estas condiciones, por lo que pierden características como la producción de compuestos inhibitorios (sustancias semejantes a antibióticos) que son

producidos como un mecanismo de defensa innata en un ambiente competitivo como lo es la microbiota intestinal (Hillman, 1999);

C) La preparación de probióticos de diferente composición, ya sea que contengan sólo una cepa de microorganismos o que contengan muchas cepas, esperando en esta última obtener una mayor espectro de actividad en diferentes especies animales (Fuller, 1989);

D) La viabilidad de las bacterias y levaduras durante la elaboración de los probióticos en pellet o gránulos, ya que el proceso de secado a temperaturas altas, difícilmente lo soportan estos microorganismos (Fuller, 1989);

E) Selección de aquellas cepas de probióticos que demuestren resistencia a la influencia química de la lisozima, enzimas pancreáticas, pH's bajos, ácidos orgánicos y ácidos biliares (Agarwal *et al.*, 2000);

F) La dosis efectiva media aún no determinada con precisión (Fuller, 1989);

G) Menos aún se sabe si los probióticos deben ser administrados en forma continua o periódica, ya que es poco probable que las colonias puedan establecerse por sí solas de manera permanente en el intestino después de una dosis única y producir su efecto durante toda la vida del animal (Fuller, 1989).

1.3. Herramientas moleculares y otros métodos de identificación en micología.

Para estudiar el papel de los probióticos en la modificación de la microbiota intestinal y la supervivencia de las cepas microbianas en el tracto gastrointestinal es necesario realizar monitoreos antes, durante y después de la adición del probiótico; sin embargo, esto se ha dificultado por la falta de técnicas apropiadas para muestrear e identificar la especie, subespecie e incluso hasta la cepa utilizada como probiótico, así como los cambios producidos en las poblaciones de la microbiota endógena.

Existen diversas técnicas de identificación de levaduras, entre las tradicionales se encuentran los perfiles de asimilación y fermentación analizados con el API 20 C[®] (bioMérieux), las cuales permiten la caracterización de especies y en ciertos casos de subespecies de levaduras. Otro método es la prueba de toxinas asesinas (killer toxin profiles), la cual permite la identificación de diversas cepas de *S. cerevisiae* (Ness *et al.*, 1993). También las levaduras pueden ser identificadas mediante el análisis de proteínas extracelulares e intracelulares por SDS-PAGE y pruebas de ácidos grasos volátiles (Ness *et al.*, 1993). Otra técnica es la inmunofluorescencia la cual permite la identificación de algunas cepas de *S. cerevisiae*, esta técnica requiere la producción de anticuerpos específicos para cada una de las cepas a identificar. Sin embargo, la desventaja de estas técnicas siempre ha sido la variabilidad de la identificación, ya que depende del estado fisiológico de la célula (Ness *et al.*, 1993).

Una nueva estrategia en la identificación microbiológica es la biología molecular, la cual tiene sus bases en el conocimiento previo de la estructura y conformación del ADN del microorganismo. Diversas técnicas moleculares tienen como características una alta sensibilidad y especificidad, ya que a diferencia de las técnicas previamente mencionadas, las secuencia del ADN no varía en los diversos estados fisiológicos.

Para el seguimiento de probióticos bacterianos se han utilizado con éxito las siguientes técnicas: DGGE o TGGE, hibridación de secuencias del ARN ribosomal con sondas radioactivas y cuantificadas por "dot-blot" (Holzapfel *et al.* 1998; O'Sullivan, 1999 y Shortt, 1999).

Otras técnicas moleculares que han revolucionado las técnicas tradicionales para la identificación y caracterización no sólo de hongos, sino también de otros microorganismos es el análisis con enzimas de restricción (DNA fingerprinting) la cual analiza las longitudes del RFLP; hibridación de secuencias de ADN (Southern blot) con una sonda de ADN marcada y la separación de los cromosomas de la levadura mediante electroforesis en campos pulsados o cariotipificación electroforética (chromosome fingerprinting) (Ness *et al.*, 1993; Lieckfeldt *et al.*, 1993; Masneuf *et al.*, 1996; Clemons *et al.*, 1997; O'Sullivan, 1999 y Lockhart *et al.*, 2001).

La investigación realizada por el premio Nóbel de 1993 Kary Mullis, la cual ha sido una de las más utilizadas en nuestro tiempo es la técnica de PCR, esta técnica es usada para crear millones de copias de una sola secuencia específica de ADN contenida en el genoma de una célula,

usando una ADN polimerasa termoestable (la más común es la Taq ADN polimerasa); dNTP y dos iniciadores cuya secuencia es cada una complementaria a alguno de los extremos de la secuencia blanco. Este proceso es logrado repitiendo numerosos ciclos, generalmente 30 – 40, en donde en cada ciclo de la técnica de PCR los ingredientes antes mencionados se encuentren en un tubo el cual es calentado a ~ 94 °C para separar la doble hebra de ADN, después la temperatura debe ser disminuida a ~ 55 °C para permitir la alineación de los iniciadores a las secuencias blanco en cada cadena de ADN y luego la temperatura es aumentada a 72 °C para permitir que la ADN polimerasa duplique la información genética que se encuentra entre ambos iniciadores, utilizando como templado el ADN de doble cadena. Como cada copia creada es utilizada como templado para el siguiente ciclo de la técnica de PCR, la amplificación es exponencial (O'Sullivan, 1999).

Es posible identificar y diferenciar cepas de cualquier especie micótica, incorporando la técnica de PCR en metodologías como: RAPD (Lin y Lehmann, 1995; Baleiras *et al.*, 1996; Zeng *et al.*, 1996; McGrath *et al.*, 1998; O'Sullivan, 1999 y Lockart *et al.*, 2001), sondas específicas para las secuencias repetidas hipervariables de las subunidades del ARN ribosomal (McCullough *et al.*, 1998), la amplificación de secuencias en el ADN genómico llamados minisatélites los cuales consisten en motivos repetidos en "tandem" de alrededor de 15 – 30 bp de longitud y de microsatélites los cuales son motivos arreglados en "tandem" de sólo 2 – 10 bp de longitud (Lieckfeldt *et al.*, 1993 y Hennequin *et al.*, 2001) y la amplificación por PCR usando secuencias complementarias en sitios "splice" de intrones localizados en regiones blanco mutables del genoma de *S. cerevisiae* (de Barros *et al.*, 1996).

Dichas técnicas moleculares presentan la ventaja de ser más sensibles y reproducibles, además de su capacidad para discriminar entre géneros, especies e incluso cepas que compartan propiedades fisiológicas similares (Walker, 2000).

1.3.1. La amplificación de secuencias δ por la técnica de PCR para identificar cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

En el genoma de *S. cerevisiae* fueron descubiertas por Cameron *et al.*, (1979) secuencias repetidas, que posteriormente corresponderían a retrotransposones, estos son elementos genéticos móviles que se transponen vía la transcripción reversa de un ARN intermediario (King-Jordan y McDonald, 1999; Lewin, 2001). Existen 5 familias de retrotransposones, denominadas Ty1 a Ty5. Cada una de estas familias tiene diferente número de copias distribuidas en los 16 cromosomas de *S. cerevisiae* (Figura 1). Una de las más estudiadas es la Ty1, la cual tiene distribuidas 35 copias y está constituida por una región central larga llamada epsilon de 5.6 a 6.3 kb (Cameron *et al.*, 1979; Boeke *et al.*, 1985; Ness *et al.*, 1993 y Lewin, 2001) en el que se encuentran dos ORF llamados TYA y TYB y flanqueando a éstos se encuentran en cada extremo secuencias repetidas directas de 250 a 334 bp llamadas elementos δ (Cameron *et al.*, 1979; Boeke *et al.*, 1985; King-Jordan y McDonald, 1999; Lewin, 2001; Legras y Karst, 2003).

Existen al menos 100 copias de los elementos δ en el genoma de *S. cerevisiae* ya sea como parte del retrotransposon Ty1/Ty2 o como elementos aislados (Cameron *et al.*, 1979; Ness *et al.*, 1993; Legras y Karst,

2003), siendo encontradas con frecuencia en las regiones genómicas contiguas a los genes del ARN de transferencia (Ness *et al.*, 1993). Estos elementos δ forman las secuencias LTR (King-Jordan y McDonald, 1999) y participan en la transposición ya que son sitios de reconocimiento para la inserción de un retrotransposón. Las regiones de estos elementos están separadas por distancias genómicas que pueden ser amplificadas utilizando la técnica de PCR, lo que ha permitido una clara diferenciación entre cepas comerciales de *S. cerevisiae* (Figura 2) (Ness *et al.*, 1993; Legras y Karst, 2003).

1.4. Justificación.

A la fecha poco se conoce del comportamiento que *S. cerevisiae* tiene cuando es usada como probiótico en lechones; por ejemplo, no se tienen datos del tiempo de eliminación de esta levadura, su lugar de acción a lo largo del tracto intestinal, si es capaz de adherirse temporal o permanentemente en el intestino de estos animales o su eficiencia como estabilizador de la microbiota intestinal. Como un primer paso para abordar estas preguntas, en este trabajo se determinó el tiempo de eliminación de *S. cerevisiae* cepa Sc 47 usando la técnica de PCR para amplificar las secuencias δ del transposón Ty1/Ty2, con la finalidad de establecer el adecuado intervalo de administración del probiótico para lechones.

2. OBJETIVO GENERAL.

Determinar el tiempo de eliminación en heces del probiótico *Saccharomyces cerevisiae* cepa Sc 47 en lechones, utilizando como método de identificación cepa específico, la técnica de PCR con iniciadores que amplifican las secuencias δ en el genoma de *S. cerevisiae*.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- I. Muestrear durante 29 días las excretas de lechones, los cuales recibieron inicialmente una dosis oral diaria por 7 días de 1×10^8 levaduras del probiótico.

- II. Determinar el número de UFC de *S. cerevisiae* por gramo de excretas en el medio de cultivo CA.

- III. Identificar con la técnica de PCR la cepa Sc 47 de los *S. cerevisiae* identificados presuntivamente en el medio de cultivo CA.

3. HIPÓTESIS.

El probiótico *Saccharomyces cerevisiae* (BIOSAF® Sc 47) no se encontrará en heces de lechones por más de siete días después de que se haya suspendido la administración oral del probiótico.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. Muestreo de excretas de los lechones.

El estudio de campo se realizó en las instalaciones del CEIEPP perteneciente a la FMVZ de la UNAM. El CEIEPP se encuentra ubicado en el kilómetro 2 de la carretera Jilotepec-Corrales en Jilotepec, Estado de México.

4.1.1. Características de los animales y alojamientos.

Se utilizó una camada recién destetada del CEIEPP compuesta de 13 lechones, 9 machos y 6 hembras de 18 días de edad, de raza Landrace y peso promedio de 8.5 kg. Los animales recibieron como manejo zootécnico rutinario de la granja lo siguiente: a los 3 días de edad todos los machos habían sido castrados por incisión del escroto en la región ventral de cada uno de los testículos; a la misma edad se les había inyectado 1 ml de hierro dextran (Ferrajet[®], Aranda[®]) I.M. en la tabla del cuello a cada lechón, 1 ml de oxitetraciclina (Tetrabac Líquido 10 %[®], Bayer[®]) I.M. en la pierna y los animales habían sido identificados con muescas en ambas orejas, de acuerdo a los registros del centro. Los animales permanecieron durante 17 días con su madre en una jaula de maternidad con piso de rejilla y recubierta de plástico, agua *ad libitum* y calentadores de luz (focos de 150 watts).

Los animales se destetaron a los 18 días de edad y se alojaron en el área de destetes del CEIEPP. El área de destetes del CEIEPP tiene una

medida de 8 x 5 m, la altura al techo es de 3 m y tiene declive. Cuenta con 10 corrales para alojar 5 lechones en cada uno, cuenta con dos criadoras de gas suspendidas en el techo, el cual es de lámina de asbesto con canales y recubierta en su interior con hule espuma como aislante, ventana lateral al fondo con cortinas de lona, puerta de metal que evita la entrada directa de corrientes de aire y piso de cemento alrededor de los corrales. Cada corral tiene una medida de 1.50 x 1.50 m, están delimitados por rejas de alambre grueso o pared de cemento de 1.15 m de altura, tienen piso de rejilla, un comedero tipo tolva, un bebedero de chupón y una tabla de madera (30 x 100 cm) atornillada al piso de rejilla sobre la que se coloca alimento al principio. El pasillo se encuentra alrededor de los corrales.

4.1.2. Agrupación de los animales.

Los animales se dividieron en dos grupos, el grupo uno o control negativo estuvo conformado por 3 lechones los cuales permanecieron alojados y aislados en uno de los corrales de la maternidad. El grupo dos o testigo estuvo conformado por 10 lechones que se alojaron en dos corrales con cinco lechones cada uno. Los animales recibieron la siguiente alimentación de acuerdo al grupo:

- Grupo uno. Alimento balanceado preiniciador *ad libitum* sin levaduras hasta los 29 días de edad y posteriormente alimento balanceado iniciador *ad libitum* sin levaduras hasta los 46 días de edad.

- Grupo dos. Alimento balanceado preiniciador *ad libitum* más una dosis diaria por lechón de 1×10^8 levaduras (*S. cerevisiae* cepa Sc 47) del probiótico (BIOSAF® Sc 47, Laboratorios Saf-Mex), las cuales se suspendieron en 3 ml de leche en polvo (Nan® etapa 1). La levadura se les dio a los lechones del grupo dos por 7 días es decir hasta los 24 días de edad, mientras que el preiniciador fue hasta los 29 días de edad y posteriormente alimento balanceado iniciador *ad libitum* sin levaduras hasta los 43 días de edad en ambos grupos (Figura 3).

4.1.3. Muestreo de las excretas de lechón.

A los lechones de ambos grupos se les tomó una muestra de excretas a los 18, 19 días de edad y posteriormente cada 3 días hasta los 43 días de edad (Figura 3).

A cada lechón se le estimulo el recto con un hisopo estéril para coleccionar individualmente en bolsas de plástico, 10 g de excretas por lechón (Figura 4) (Carter y Chengappa, 1994; Spencer y Spencer, 1996). Colectadas la muestras, se llevaron al laboratorio de bacteriología del CEIEPP para realizar las diluciones decimales en ssf, la siembra en los medios de cultivo y su incubación, estos procedimientos se realizaron en los primeros 7 días del experimento, las demás muestras se procesaron de la misma forma para su aislamiento, incubación y conteo de UFC en el Laboratorio de Micología de la FMVZ de la UNAM, Campus Ciudad Universitaria para lo cual las muestras se transportaron en refrigeración al laboratorio de la FMVZ (Flores, 2002).

4.1.4. Preparación de las dosis de levaduras para los lechones.

En cada uno de los 7 días en el que los lechones recibieron la dosis de levaduras, estas se prepararon en el laboratorio de microbiología del CEIEPP de la siguiente manera. A partir de un cultivo de *S. cerevisiae* cepa Sc 47 en fase logarítmica (24 h), se contó el número de levaduras y se depositaron 1×10^8 levaduras en 3 ml de leche en polvo Nan[®] etapa 1, previamente reconstituida en agua caliente e igualada a temperatura ambiente.

4.2. Determinación del número de UFC de *S. cerevisiae* por gramo de excretas en el medio de cultivo CA.

Se utilizó el medio de cultivo CA por tener las características de selectivo y diferencial entre especies micóticas por medio del morfotipo colonial: color, pigmento, superficie y borde de la colonia (Odds y Bernaerts, 1994; García-Martos, *et al.*, 1998) y por su utilidad para recuperar y enumerar levaduras de probióticos en animales, la cual fue descrita por Bovill, *et al.* (2001).

4.2.1. Aislamiento y conteo del número de UFC.

El procedimiento fue el siguiente: se depositaron 0.5 g de heces en 4.5 ml de ssf estéril para obtener una dilución 1×10^{-1} . A partir de esta se obtuvieron las diluciones 1×10^{-2} y 1×10^{-3} , ambas en un volumen final de 5 ml. De cada dilución se tomaron 100 μ l y se depositaron en toda la superficie de diferentes placas del medio de cultivo CA, después la suspensión se

extendió en todas las cajas, las cuales se incubaron a 30 ± 1 °C (NOM-111-SSA1-1994).

El crecimiento de las colonias se revisó a las 72 y 96 h de incubación, contándose aquellas placas que contenían entre 10 y 100 colonias con el siguiente morfotipo colonial descrito para *S. cerevisiae* (Odds y Bernaerts, 1994; García-Martos *et al.*, 1998 y Bovill *et al.*, 2001): colonias de 1 a 1.5 mm de diámetro de color púrpura, brillantes y lisas. Además se realizaron frotis fijos y se tiñeron con la tinción de Gram para observar su morfología microscópica (levaduras Gram positivas, ovaladas de 3 a 9 μm por 5 a 20 μm) (Barnet *et al.* 1983; Carter y Chengappa, 1994).

El número de UFC que se contaron por placa en 100 μl multiplicado por 50 equivale al número de UFC en 5,000 μl que es el volumen total de la dilución. El resultado se multiplicó por el factor de dilución (50 si fue en la primera, 500 en la segunda o 5,000 en la tercera) y finalmente se multiplicó por dos para obtener el resultado de UFC de *S. cerevisiae* por gramo de heces (UFC/g) en el medio de cultivo CA, durante 72 h de incubación (NOM-111-SSA1-1994 y Bovill *et al.*, 2001).

4.2.2. Estudios con el medio de cultivo CA.

Por otro lado se realizaron estudios previos para determinar la utilidad del medio de cultivo CA en la identificación presuntiva de *S. cerevisiae*, así como la capacidad para diferenciar esta especie de otras especies micóticas y la recuperación del probiótico *S. cerevisiae* cepa Sc 47 en excretas de lechón.

4.2.3. Determinación del morfotipo colonial de *S. cerevisiae* y otras especies micóticas en el medio de cultivo CA.

Se utilizaron las siguientes especies micóticas aisladas de un estudio previo (Flores, 2002): *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae*, *Candida parapsilosis*, *Candida rugosa*, *Candida tropicalis*, *Candida valida*, *Candida zeylanoides*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus uniguttulatus*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta*, *Hansenula anomala*, *Torulaspota globosa* y *Saccharomyces cerevisiae*. Las cuales se sembraron por estría continua en placas del medio de cultivo CA y se incubaron a 30 °C por 72 h. Los morfotipos coloniales se compararon con lo descrito (Odds y Bernaerts, 1994; García-Martos, et al., 1998 y Bovill, et al., 2001).

4.2.4. Diferenciación de las cepas de *S. cerevisiae*, de otras especies micóticas en el medio de cultivo CA.

Las cepas de *S. cerevisiae* que se utilizaron, provienen del cepario de levaduras y hongos filamentosos que posee el laboratorio de micología del departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Estas cepas son las siguientes: *S. cerevisiae* cepa 1999 (probiótico viejo), *S. cerevisiae* cepa 2000 (probiótico nuevo), *S. cerevisiae* Lev-Instant[®], *S. cerevisiae* Probios[®] de Torreón, (probiótico de la Dra. M.M. Amalia Martínez A.) y *S. cerevisiae* cepa Sc 47 (probiótico BIOSAF[®] Sc 47). Cada cepa se sembró por estría continua en una caja de CA y se incubó a 30 °C por 72 h.

También se suspendieron en ssf una asada de cada una de estas especies micóticas: *Cr. uniguttulatum*, *H. anomala*, *C. krusei* y *S. cerevisiae*. A partir de esta suspensión se realizaron cuatro diluciones decimales y de la dilución 1×10^{-4} se tomaron 100 μl para depositarlos en una placa de CA. Siguiendo la misma metodología se mezclaron y diluyeron *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *S. cerevisiae*, se repitió con *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* y *S. cerevisiae*. De cada mezcla se depositaron por separado 100 μl de las diluciones 1×10^{-4} en placas de CA. Las tres placas se incubaron a 30 °C durante 72 horas.

4.2.5. Determinación de la capacidad del medio de cultivo CA para recuperar el probiótico *S. cerevisiae* en excretas de lechón.

De un cultivo de *S. cerevisiae* cepa Sc 47 en fase logarítmica, se tomaron 1×10^3 levaduras y se agregaron a 0.1 g de excretas de lechón en un volumen aforado a 1,000 μl de agua destilada estéril. De esta suspensión se tomaron 100 μl (1×10^2 levaduras), las cuales se extendieron por estría continua sobre toda la superficie de una placa de CA. De la suspensión original se hizo una dilución decimal en un volumen final de 900 μl y se tomaron 100 μl (1×10^1 levaduras), repitiendo el mismo procedimiento en la placa de CA. De la dilución anterior se realizó otra dilución decimal en un volumen final de 800 μl y se tomaron 100 μl (una levadura), siguiendo el mismo procedimiento de plaqueo en el medio de cultivo CA. Todas las placas se incubaron a 30 °C por 72 h, para después contar las UFC con el morfotipo colonial de *S. cerevisiae* de cada placa. Finalmente estas UFC se sometieron a la prueba de PCR para identificar la cepa Sc 47 de la levadura.

Con los números de *S. cerevisiae* identificados en el medio de cultivo CA provenientes de los siguientes experimentos: determinación del número de UFC de *S. cerevisiae* por g de heces en lechones y determinación del morfotipo colonial de *S. cerevisiae* junto con otras especies micóticas. Se determinaron los índices de sensibilidad y especificidad, utilizando como método de identificación de la especie *S. cerevisiae*, la técnica de PCR en los aislados presuntamente identificados como *S. cerevisiae*. Se define la sensibilidad como la capacidad de identificar correctamente la especie de *S. cerevisiae* sobre el medio CA y es producto del número de verdaderos positivos/número de verdaderos positivos + número de falsos negativos. La especificidad se define como la capacidad de obtener un resultado negativo cuando esté es el esperado, es producto del número de verdaderos negativos/número de verdaderos negativos + número de falsos positivos (Odds y Bernaerts, 1994; Baumgartner *et al.*, 1996 y García-Martos *et al.*, 1998).

4.3. Identificación de la cepa Sc 47 con la técnica de PCR.

Todas las colonias que se contaron como *S. cerevisiae* en el medio de cultivo CA, se sometieron a la prueba de PCR.

4.3.1. Extracción de ADN por el método de congelación-calentamiento súbito.

Este método fue descrito por de Barros *et al.*, (1996) y consiste en cultivar las colonias en Sda e incubar a 30° C hasta obtener cultivos en fase logarítmica (24 h), después las placas se coiocan a temperatura de refrigeración (4 °C) durante 2 horas. Posteriormente el cultivo se resuspende

en 200 μ l de agua destilada estéril, conteniendo por lo menos 1×10^5 levaduras, las cuales son sumergidas en nitrógeno líquido por 5 min e inmediatamente sumergidas en agua en ebullición por 10 min. Este procedimiento fue ensayado en un experimento previo utilizando la cepa Sc 47 del probiótico *S. cerevisiae* y se confrontó con la técnica de lisis alcalina-perlas de vidrio, descrito por Mendoza (2002), la cual consiste en cultivar las levaduras en 30 ml de agar YPD, a 30 °C en agitación hasta obtener un crecimiento en fase logarítmica, el cual debe ser centrifugado por 10 min a 3,000 rpm, sustituyendo el sobrenadante por 1.0 ml de agua bidestilada estéril. Después, las células se adicionan a un tubo de vidrio con 2/5 partes de perlas de vidrio estériles y se colocó en hielo para posteriormente agitar en Vórtex hasta que por lo menos 90 % de la pared de las células sean rotas estas se observan sin forma en el microscopio de barrido, con la precaución de que frecuentemente el tubo debe ser colocado en hielo. Se colectan 400 μ l de este material y se le añade 600 μ l de Buffer de Lisis (Tris-HCL 50 mM [pH 7.2], EDTA 50 mM, SDS 3 % [peso/vol], β -mercaptoetanol 1 % [vol/vol]), agitando firmemente hasta obtener una mezcla homogénea. Se añade Proteinasa K (200 μ g/ml concentración final), después se incubó a 65 °C por una hora y se añadieron 500 μ l de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) con la precaución de agitar firmemente hasta obtener una muestra con aspecto lechoso. Se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min y se transfirió la fase acuosa, a esta se añadieron 10 μ l de acetato de sodio 3 M (pH 8) y dos volúmenes de etanol al 100 % mantenido a -20 °C. Después se invirtió varias veces el tubo y se centrifugó por 5 min a 14,000 rpm, decantando el líquido y lavando con 1.0 ml de etanol al 70 % también mantenido a -20 °C. Finalmente se centrifugó desechando el líquido y la pastilla se resuspendió en agua destilada estéril

o TE (Tris-CL 100 mM, EDTA 10 mM [pH 8]). Se añadieron 8 μ l de RNAasa (500 μ g/ml) e incubó a 37 °C por 1 h.

4.3.2. Amplificación de las secuencias δ de *S. cerevisiae* cepa Sc 47 por la técnica de PCR.

El ADN extraído fue utilizado para realizar por la técnica de PCR la amplificación de las regiones delta, de acuerdo al protocolo LD 3002 Versión 1 y lo descrito por Ness *et al.*, (1983). En un tubo para PCR se mezclaron 5 μ l de amortiguador 10 X (Amplificasa[®]), 2.5 μ l de MgCl₂ 20 X (Amplificasa[®]), 8 μ l de una mezcla de dATP, dCTP, dGTP, dTTP (1.25 mM de cada uno), 1 μ l del iniciador D1 (5'-CAAATTCACCTATTCTCA-3') 10 X, 1 μ l del iniciador D2 (5'-GTGGATTTTATTCCAACA-3') 10 X, 1.5 μ l del templado de ADN de la levadura (200 μ g), 0.5 μ l de ADN polimerasa (Amplificasa[®]) (la cual se agrega en los últimos segundos del primer ciclo a 95 °C) y 30.5 μ l de agua deionizada estéril. Con el siguiente programa de amplificación, dividido en dos partes. En la primera se utilizó el siguiente programa: 1 ciclo a 95 °C/2 min; 4 ciclos a 95 °C/30 seg, 45 °C/30 seg y 72 °C/2 min. En el segundo programa se utilizaron 30 ciclos a 95 °C/30 seg, 50 °C/30 seg, 72 °C/2 min y 1 ciclo a 72 °C/10 min. Finalmente la reacción permanece a 4 °C.

Los productos de amplificación por PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2 % en TBE 0.5 X (Tris-borato 450 mM, EDTA 10 mM [pH 8.3]), contenido en un cámara de electroforesis a 100 Volts por 40 min (Sambrock, *et al.*, 1989; Sambrock y Rusell, 2001; Piper, 1996 y Edel, 1998), después se tiñeron con bromuro de etidio (5 mg/ml) durante 6 min y posteriormente se eliminó el exceso en agua bidestilada por 20 min

(Mendoza, 2002), finalmente los geles se fotografiaron con un equipo fotográfico (modelo Kodak® DC290 Zoom digital camera) y se utilizó el software Kodak® DC290.

También se realizó un estudio previo con la finalidad de estandarizar la técnica de PCR, en el cual se utilizó la cepa Sc 47 de *S. cerevisiae*, además de *S. cerevisiae* cepa 1999, *S. cerevisiae* cepa 2000, *S. cerevisiae* cepa 2003, *S. cerevisiae* Probios® y *S. cerevisiae* cepa 1 (Fisiología); 15 especies micóticas diferentes a *S. cerevisiae* y 106 aislados micóticos identificados como *S. cerevisiae* por la metodología simplificada de pruebas bioquímicas, fisiológicas y morfológicas (Flores, 2002), provenientes de la mucosa intestinal de lechones de un trabajo previo bajo las siguientes condiciones.

Experimento a): aislados micóticos identificados como *S. cerevisiae* que se obtuvieron del muestreo de la mucosa intestinal (duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon) de lechones a los 8, 25 y 40 días de edad y cuya madre recibió en su alimentación 0.3 % del probiótico *S. cerevisiae* cepa Sc 47 (BIOSAF® Sc 47) en la época de otoño.

Experimento b): aislados micóticos identificados como *S. cerevisiae* que se obtuvieron del muestreo de la mucosa intestinal (duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon) de lechones a los 8, 25 y 40 días de edad, en el que su madre no recibió el probiótico BIOSAF® Sc 47 en su alimentación.

Experimento c): aislados micóticos identificados como *S. cerevisiae* que se obtuvieron del muestreo de la mucosa intestinal (duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon) de lechones a los 40 días de edad con 15 días previa

administración del probiótico BIOSAF® Sc 47 al 0.3 % en su alimentación (Flores, 2002).

4.3.3. Detección directa de *S. cerevisiae* cepa Sc 47 en excretas de lechón por la técnica de PCR.

Se realizó el siguiente procedimiento: un gramo de excretas de lechón se depositó en caldo YPD y se aforó con el mismo a 10 ml, realizándose por triplicado, estos se incubaron con agitación a 30 °C y 150 rpm por 24 h. A las concentraciones 6.6×10^6 , 1×10^7 y 6.6×10^7 de *S. cerevisiae* cepa Sc 47 se les agregó un ml de las suspensiones incubadas y se les aforo a dos ml con buffer TE. Después, se incubó a 37 °C por una hora y se centrifugaron a 8,500 rpm por 5 min, desechando los sobrenadantes. Cada pastilla se resuspendió en 100 µL de agua destilada estéril y se refrigeraron a 4 °C por 2 h, para realizar la extracción de los templados de ADN por el método de congelación-calentamiento súbito, según se describió anteriormente y finalmente realizar la técnica de PCR.

5. RESULTADOS.

5.1. UFC/g de *S. cerevisiae* en el medio de cultivo CA.

El número de UFC obtenidas corresponden a un gramo de heces de lechón y el tiempo de incubación fue de 30 °C durante 3 días (Figura 5).

5.1.1. Conteo de las UFC de *S. cerevisiae*.

En el primer muestreo que se realizó a los dos grupos de lechones previo a la administración con el probiótico, no se aislaron colonias con el morfotipo de *S. cerevisiae* en el medio de cultivo CA, únicamente se obtuvo crecimiento de colonias con el morfotipo de *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus* spp, *Cr. uniguttulatum* y *Rhodotorula* spp.

En el grupo uno o control, se determinaron en todo el experimento los siguientes números de colonias con el morfotipo de *S. cerevisiae*:

El 5° día de muestreo se determinaron 40,000 UFC/g de heces en un lechón, el 8° día de muestreo se determinaron 10,000, 50,000 y 150,000 UFC/g de heces en tres lechones y el 20° día de muestreo se determinaron en dos lechones 5,000 UFC/g de heces. Además, se obtuvo en los diferentes días de muestreo crecimiento de colonias con el morfotipo de *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis*, *Cr. uniguttulatum*, *R. glutinis* y *R. mucilaginosa*.

En el grupo dos o testigo, se determinaron los siguientes números de colonias con el morfotipo de *S. cerevisiae*:

El 2° día de muestreo o 24 horas postadministración del probiótico, se determinaron en dos lechones la cantidad de 5,000 UFC/g de heces y en dos lechones se determinaron 10,000 UFC/g de heces. Además se obtuvo crecimiento de colonias con el morfotipo de *R. glutinis* (Cuadro 2, Figura 6).

El 5° día de muestreo o de administración del probiótico, se determinaron en siete lechones las cantidades en cada uno de 5,000, 105,000, 150,000, 500,000 y 1,000,000 UFC/g de heces; en dos lechones se determinaron 50,000 UFC/g de heces. En tres lechones no se aislaron colonias de *S. cerevisiae*. Además se obtuvo crecimiento de colonias con el morfotipo de *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis*, *C. valida*, *Cr. uniguttulatum*, *Rhodotorula* spp (Cuadro 2, Figura 6).

El 8° día de muestreo o 1° día postadministración del probiótico, se determinaron en nueve lechones las cantidades en cada uno de 55,000, 105,000, 200,000, 350,000 y 1,000,000 UFC/g de heces; en dos lechones se determinaron 1,500,000 UFC/g de heces y también en dos lechones se determinaron 50,000 UFC/g de heces. Únicamente en un lechón no se aislaron colonias con el morfotipo de *S. cerevisiae*. Además se obtuvo crecimiento de colonias con el morfotipo de *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *Cr. uniguttulatum* y *Rhodotorula* spp (Cuadro 2, Figura 6).

El 11° día de muestreo o 4° día postadministración del probiótico, se determinaron en cinco lechones las cantidades en cada uno de 10,000, 50,000 y 70,000 UFC/g de heces; en dos lechones se determinaron

20,000 UFC/g de heces. En cinco lechones no se aislaron colonias con el morfotipo de *S. cerevisiae*. Además se obtuvo crecimiento de colonias con el morfotipo de *Cr. uniguttulatum* y *Rhodotorula* spp (Cuadro 2, Figura 6).

El 14° día de muestreo o 7° día postadministración del probiótico se determinaron en cuatro lechones las cantidades en cada uno de 50,000 UFC/g de heces y 55,000 UFC/g de heces; en dos lechones se determinaron 5,000 UFC/g de heces. En seis lechones no se aislaron colonias con el morfotipo de *S. cerevisiae*. Además se obtuvo crecimiento de colonias con el morfotipo de *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *Cr. uniguttulatum* y *R. glutinis* (Cuadro 2, Figura 6).

El 17° día de muestreo o 10° día postadministración del probiótico se determinó en un lechón 5,000 UFC/g de heces y en dos lechones se determinaron 50,000 UFC/g de heces. En siete lechones no se aislaron colonias con el morfotipo de *S. cerevisiae*. Además se obtuvo crecimiento de colonias con el morfotipo de *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *Rhodotorula* spp (Cuadro 2, Figura 6).

El 20° día de muestreo o 13° día postadministración del probiótico se determinó en un lechón 70,000 UFC/g de heces. En nueve lechones no se aislaron colonias con el morfotipo de *S. cerevisiae*. Además se obtuvo crecimiento de colonias con el morfotipo de *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* y *Rhodotorula* spp (Cuadro 2, Figura 6).

El 23° y 26° día de muestreo o 16° y 19° día postadministración del probiótico, no se aislaron colonias con el morfotipo de *S. cerevisiae*, únicamente se obtuvo crecimiento de colonias con el morfotipo de

C. glabrata, *C. lusitaniae*, *Rhodotorula* spp. y a los 23° día de muestreo y *Rhodotorula* spp a los 26° días de muestreo (Cuadro 2, Figura 6).

5.1.2. Morfotipo colonial de *S. cerevisiae* y otras especies micóticas en el medio de cultivo CA.

La morfología de las colonias y de las cepas de *S. cerevisiae* en el medio de cultivo CA son de color púrpura brillante, superficie lisa, borde entero y sin pigmento (Figura 7). Por otra parte en el Cuadro 3 se describe la morfología colonial de otras especies micóticas (Figura 8 y 9). En la Figura 10, se observa la morfología colonial de *S. cerevisiae* mezclada con otras especie micóticas.

Se determinó la sensibilidad y especificidad del medio de cultivo CA para identificar presuntivamente a *S. cerevisiae*, en comparación con la prueba de PCR que amplifica las secuencias δ y resultó de 51.75 % y 54.91 %, respectivamente (Cuadro 4).

5.1.3. Capacidad del medio de cultivo CA para recuperar el probiótico *S. cerevisiae* en excretas de lechón.

En el medio de cultivo CA se recuperó a partir de una levadura de *S. cerevisiae* contenida en excretas de lechón. En la Figura 11 se observa la colonia con todas las características morfológicas de *S. cerevisiae*.

5.2. Identificación de la cepa Sc 47 de *S. cerevisiae* con la técnica de PCR.**5.2.1. Patrón de amplificación de *S. cerevisiae* cepa Sc 47.**

Con los dos métodos de extracción de ADN se obtuvieron los mismos productos de amplificación al realizar la técnica de PCR con los iniciadores D1 y D2, este patrón de amplificación está comprendido por 14 bandas en un rango de 250 bp y 2000 bp (Figura 12).

Se encontró que si para la técnica de PCR se utiliza el ADN extraído por el método de congelación-calentamiento súbito se necesita de un mínimo de 1×10^5 levaduras, para obtener el patrón de amplificación característico, mientras que por la técnica de lisis alcalina-perlas de vidrio se requieren 200 μg de ADN.

5.2.2. Identificación de cepas diferentes a la cepa Sc 47 e identificación de especies diferentes a *S. cerevisiae* con la técnica de PCR.

De las 5 cepas no correspondientes a la cepa Sc 47 que se sometieron a la técnica de PCR, se encontró que las cepas 1, 2003 y 1999 poseen diferentes productos de amplificación con respecto al que posee la cepa Sc 47 (Figura 13). De las 15 especies micóticas diferentes a *S. cerevisiae*, solo tres presentaron patrones de amplificación distintos: *C. kefir*, *C. guilliermondii* y *C. albicans*, las demás especies no presentan patrones de amplificación (Figura 13).

5.2.3. Identificación por la técnica de PCR de los aislados de *S. cerevisiae* provenientes del tracto intestinal de lechones.

De los 106 aislados micóticos del estudio previo (Flores, 2002) e identificados como *S. cerevisiae*, se encontró que el 28 % corresponden a la cepa Sc 47; 12 % no posee ningún patrón de amplificación y el 60 % poseen un patrón de amplificación diferente al de la cepa Sc 47. En la Figura 14 se observan todos los patrones de amplificación que se obtuvieron de las levaduras *S. cerevisiae* con la técnica de PCR. En la Figura 15 se describe gráficamente el número de los aislados micóticos. Los patrones de amplificación diferentes a la cepa Sc 47 se pudieron agrupar en seis patrones de amplificación, de los cuales el 61 % corresponden al patrón uno, el 6 % al patrón dos, el 17 % al patrón tres, el 5 % al patrón cuatro, el 6 % al patrón cinco y el 5 % al patrón seis (Figura 16).

De los 106 *S. cerevisiae* aislados del estudio previo, 45 provienen del experimento a) de los cuales el 65 % corresponde al patrón uno, 2 % al patrón dos, 7 % al patrón cuatro, 4 % al patrón cinco, 4 % al patrón seis y el 18 % no tiene patrón de amplificación (Figura 17). A los 8 días de edad, el 79 % corresponde al patrón uno, el 5 % al patrón cuatro y el 16 % no tienen patrón de amplificación (Cuadro 5). A los 25 días de edad, el 66 % corresponde al patrón uno, el 17 % al patrón seis y el 17 % no tienen patrón de amplificación (Cuadro 5). A los 40 días de edad, el 50 % corresponde al patrón uno, el 5 % al patrón dos, el 10 % al patrón cuatro, el 10 % al patrón cinco, el 5 % al patrón seis y el 20 % no tienen patrón de amplificación (Cuadro 5).

Del experimento b) provienen 7 aislados, de los cuales el 58 % corresponden al patrón uno, el 14 % al patrón tres, el 14 % al patrón seis y el 14 % no tiene patrón de amplificación (Figura 18). A los 8 y 25 días de edad no se obtuvieron aislados de *S. cerevisiae*. A los 40 días de edad, el 58 % corresponde al patrón uno, el 14 % al patrón tres, el 14 % al patrón seis y el 14 % no tiene patrón de amplificación (Cuadro 6).

Del experimento c) provienen los 52 aislados, de los cuales el 9 % corresponden al patrón uno, 6 % al patrón dos, 19 % al patrón tres, 4 % al patrón cinco, 55 % al patrón Sc 47 y 7 % no tienen patrón de amplificación (Figura 19). En el cuadro 7 se describen los patrones a los 40 días de edad.

No se logró la identificación de *S. cerevisiae* cepa Sc 47 de manera directa en excretas en lechón con la prueba de PCR.

5.3. Identificación de la cepa Sc 47 de *S. cerevisiae* de las colonias provenientes del medio de cultivo CA.**5.3.1. UFC de *S. cerevisiae* cepa Sc 47 identificadas por la técnica de PCR.**

En el grupo control todas las colonias que se contaron como *S. cerevisiae*, ninguna pertenece a la cepa Sc 47. Todos los *S. cerevisiae* que se contaron al 5° y 8° día de muestreo tienen el patrón cuatro y las del 20° día tienen el patrón siete.

En el grupo testigo las colonias que se contaron el 2° día de muestreo en dos lechones con las que se determinaron 10,000 UFC/g de heces corresponden a la cepa Sc 47 (Cuadro 8, Figura 20). Las colonias que se contaron para determinar 5,000 UFC/g de heces en un lechón no tienen patrón de amplificación. No se lograron aislar las colonias que determinaron 5,000 UFC en un lechón.

Las colonias que se contaron el 5° día de muestreo en un lechón con las que se determinaron 50,000 UFC/g de heces corresponden a la cepa Sc 47 (Cuadro 8, Figura 20). Las colonias que se contaron para determinar 105,000, 150,000, 500,000 y 1,000,000 UFC/g en tres lechones tienen el patrón cuatro. Las colonias que se contaron para determinar 5,000 y 50,000 UFC/g en dos lechones no tienen patrón de amplificación.

Las colonias que se contaron el 8° día de muestreo en dos lechones, para determinar 350,000 y 1,000,000 UFC/g de heces corresponden a la cepa Sc 47; las colonias que se contaron en dos lechones para determinar 105,000 y 1,500,000 UFC/g de heces corresponden a la cepa Sc 47

únicamente el equivalente a 5,000 y 500,000 UFC/g de heces, respectivamente, el resto equivalen al patrón cuatro (Cuadro 8, Figura 20). Las colonias que se contaron para determinar 55,000 y 1,500,000 UFC/g de heces en dos lechones tienen el patrón cuatro. Las colonias que se contaron para determinar 50,000 UFC/g de heces en un lechón no tienen patrón de amplificación. No se lograron aislar las colonias que determinaron 50,000 y 200,000 UFC/g de heces en dos lechones.

Las colonias que se contaron el 11° día de muestreo en cuatro lechones con las que se determinaron 20,000, 20,000, 50,000, 70,000 UFC/g de heces no tienen patrón de amplificación. No se logró aislar las colonias que determinaron 10,000 UFC/g de heces en un lechón.

Las colonias que se contaron el 14° día de muestreo en un lechón para determinar 55,000 UFC/g de heces corresponden a la cepa Sc 47 únicamente el equivalente a 5,000 UFC/g de heces, el resto de las colonias no se pudieron aislar (Cuadro 8, Figura 20). Las colonias que se contaron para determinar 5,000 UFC/g de heces en un lechón no tienen patrón de amplificación. No se lograron aislar las colonias que determinaron 5,000 y 50,000 UFC/g de heces en dos lechones.

Las colonias que se contaron el 17° día de muestreo en tres lechones para determinar 5,000, 50,000 y 50,000 UFC/g de heces corresponden al patrón siete y ninguna al patrón de la cepa Sc 47.

Las colonias que se contaron el 20° día de muestreo en un lechón para determinar 70,000 UFC/g de heces corresponden al patrón siete y ninguna al patrón de la cepa Sc 47.

6. DISCUSIÓN.

En el experimento para determinar el número de UFC de *S. cerevisiae* por gramo de excretas en lechones con el medio de cultivo CA, no se detectó ninguna colonia sugerente de *S. cerevisiae* en todos los lechones de los dos grupos que se muestrearon el 1º día de experimentación y esto era esperado ya que este primer muestreo se realizó antes de administrar a cada lechón del grupo dos una dosis diaria de 1×10^8 levaduras. También sirvió para comprobar la ausencia de la cepa Sc 47 de *S. cerevisiae* y conocer el número de cepas silvestres de esta especie micótica.

El muestreo que se realizó 24 horas después de que los lechones del grupo dos recibieron su primer dosis de probiótico, se encontraron en dos lechones el 0.01 % (1×10^4 UFC/g de excretas) de los *S. cerevisiae* administrados. Al realizar la técnica de PCR, se confirmó que corresponden a la cepa Sc 47 y se comprobó el mismo tiempo de recuperación reportado por Pîrvulescu *et al.*, 1996.

En el 5º día de experimentación se observó una tendencia ascendente en las UFC/g de excretas de la cepa Sc 47; sin embargo, de 7 lechones en los que se determinaron colonias de *S. cerevisiae* en el medio de cultivo CA, sólo en un lechón se confirmó la cepa Sc 47 por la técnica de PCR. Mientras que las colonias obtenidas en cuatro lechones correspondieron por la técnica de PCR, a un patrón diferente al cepa-específico Sc 47. Dicho patrón fue clasificado como patrón 4. Estos hallazgos sugieren la posibilidad de que la presencia de esta cepa fuera favorecida por la levadura del probiótico, ya que no había sido aislada antes de administrar el probiótico.

En el 8° día de experimentación en cuatro de ocho lechones se observó un efecto acumulativo de la cepa Sc 47 de *S. cerevisiae* identificada por la técnica de PCR. Mientras que en 4 lechones persistió la cepa de *S. cerevisiae* con patrón 4. Es importante mencionar la presencia de *S. cerevisiae* en el alimento, agua y excretas, ya que el patrón 4 de la cepa de *S. cerevisiae* encontrada en los lechones del CEIEPP de la UNAM, ubicado en Jilotepec, edo. de México, también se encontró en los lechones del experimento a) realizado en Ajuchitlán, Querétaro.

Al parecer, la adición del probiótico *S. cerevisiae* cepa Sc 47 en los lechones, crea un efecto atrayente el cual puede ser nutricional o ambiental, con cepas silvestres de *S. cerevisiae* presentes en la microbiota intestinal transitoria, ya que se observó en el estudio que a partir del 11° día y hasta el 20° día de muestreo aparecieron colonias de la cepa de *S. cerevisiae* con el patrón 7, el cual no había sido encontrados antes.

La recuperación de la cepa Sc 47 en el medio de cultivo CA e identificada con la técnica de PCR fue detectada hasta el 14° día de muestreo es decir 7 días después que se dejó de administrar el probiótico, lo que confirma los resultados obtenidos por Maejima *et al.*, 1980 y Pecquet *et al.*, 1991. Que describen la eliminación rápida de *S. cerevisiae* por el tracto intestinal. Estos resultados indican que se debe realizar la administración diaria del probiótico BIOSAF® Sc 47 en los lechones, sobre todo en las fases críticas de mucho estrés como el destete para prevenir enfermedades gastrointestinales o una administración diaria de por vida si se desea un efecto promotor del crecimiento en los lechones.

El medio de cultivo CA, contiene sustancias nutritivas (peptona y glucosa), antibiótico (Cloramfenicol) y un sustrato cromogénico sobre el cual actúan enzimas específicas de cada especie micótica, para producir en cada especie cromóforos que al oxidarse dan una coloración insoluble a la colonia micótica, este color junto con las características morfológicas, le confieren a este medio la capacidad para poder identificar diferentes especies micóticas (Odds y Bernaerts,, 1994). En el estudio de las cepas de *S. cerevisiae* crecidas en el medio de cultivo CA, todas tuvieron las mismas características de la morfología colonial (Color púrpura brillante, sin pigmento, superficie lisa y borde entero). Así también en el estudio que se realizó al mezclar la cepa de *S. cerevisiae* con otras especies micóticas en el medio de cultivo CA, se encontró que *S. cerevisiae* conserva su morfología colonial. El color púrpura de las colonia de *S. cerevisiae* en el medio CA le confirió la capacidad para identificarla presuntivamente y diferenciarla entre las especies micóticas ensayadas, aun en aquellas que se tiene reportado que también pueden presentar colonias de color púrpura como *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. krusei*, *C. pelliculosa*, *C. utilis*, *Cr. laurentii* y *H. anomala*, posiblemente esto sea debido a que estas especies utilizan enzimas similares para degradar el cromógeno. Se encontró que *C. kefir (pseudotropicalis)* también muestra colonias púrpuras, este mismo color es reportado por Odds y Bernaerts,, 1994; sin embargo, García-Martos *et al.*, 1998 describe colonias de color beige, mates y el resto del morfotipo colonial idéntico a *S. cerevisiae*. La semejanza de colonias de estas 2 especies micóticas en el medio CA puede ser posible como lo es también en su perfil bioquímico; sin embargo, para identificar estas dos especies micóticas con pruebas convencionales sólo es posible con la producción de estructuras de reproducción sexual (ascosporas) en *S. cerevisiae* ya que *C. kefir* carece de éstas. La cercanía entre éstas dos especies también se demuestra en el estudio que realizó

Barns *et al.*, 1991, ya que al utilizar las secuencias completas del rRNA 18S de diversas especies del género *Candida* y formar un árbol filogenético, encontró relaciones entre las especies del género *Candida*, demostrando una relación cercana entre las especies *C. glabrata*, *C. kefyr*, *Kluyveromyces marxianus* (el estado imperfecto es *C. kefyr*) y *S. cerevisiae*, por lo que las conformo en un subgrupo.

Para la identificación de *S. cerevisiae* proveniente de muestras clínicas en el medio de cultivo CA, el investigador García-Martos *et al.*, 1998, determinó que la sensibilidad de la prueba es del 85.71 %, la especificidad del 99.95 % y el valor predictivo positivo del 87.5 %. Esta sensibilidad y valor predictivo positivo es bajo en comparación de especies como *C. albicans* y *C. tropicalis* (superior a 99 % en las dos especies con ambos estimadores) (Odds y Bernaerts, 1994; García-Martos *et al.*, 1998 y Yücesoy y Marol, 2003). En el presente estudio los valores fueron aun más bajos, obteniéndose una sensibilidad del 51.75 %, la especificidad del 54.91 % y el valor predictivo positivo del 67.45 %. Probablemente esto se deba al amplio rango de colores reportados en las colonias de *S. cerevisiae* ya que han sido reportados colores mates (García-Martos *et al.*, 1998), púrpura-blanco (Odds *et al.*, 1994) y rosas oscuros (Yücesoy y Marol, 1993), dando como resultado que otros investigadores (Yücesoy y Marol, 1993) encontraran falsos positivos con los aislamientos de *S. cerevisiae*. Sin embargo, en las 6 diferentes cepas de *S. cerevisiae* que se ensayaron en el presente estudio no se encontraron diferencias en el morfotipo colonial. Por otra parte, al realizar la técnica de PCR en los aislados de *S. cerevisiae* previamente identificados con pruebas bioquímicas, producción de ascosporas, pruebas fisiológicas y el sistema de identificación API 20 C® (bioMérieux), provenientes de los estudios a), b) y c), no se obtuvieron productos de amplificación en el 13 % de los

S. cerevisiae ensayados. Por lo anterior creemos que existe un grupo de *S. cerevisiae* que no produce ningún patrón de amplificación con las condiciones de amplificación utilizadas y por lo tanto genera verdaderos negativos.

Aunque el medio de cultivo CA fue elaborado para identificar levaduras de casos clínicos en humanos como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, etc. provenientes de muestras de orina, genitales y garganta (Odds y Bernaerts, 1994; Beighton *et al.*, 1995), su uso se ha extendido como nos lo demuestra Bovill, *et al.*, 2001, al utilizar este medio para aislar y contar colonias de *S. cerevisiae*, utilizadas en la alimentación animal como probiótico y encontrar que este medio comercial es uno de los mejores para aislar esta levadura, en comparación con otros 5 medios de cultivo utilizados para los mismos propósitos. Además, de tener la ventaja de distinguir fácilmente las colonias de esta especie micótica utilizada como probiótico. Al realizar el experimento para detectar la recuperación de *S. cerevisiae* en este medio comercial, corroboramos lo detectado por Bovill, *et al.*, 2001, ya que el medio CA a las 72 horas de incubación a 30 °C, es capaz de recuperar una levadura de *S. cerevisiae* contenida en heces de lechón. Posteriormente esta colonia fue sometida a la prueba de PCR y se encontró el patrón de amplificación de *S. cerevisiae* cepa Sc 47. También se corroboran los hallazgos de Odds y Bernaerts, 1994, al reconocer inmediatamente cada especie micótica por su morfotipo colonial aun cuando se mezclan 4 diferentes especies conocidas de levaduras. Por otra parte, este medio contiene Cloramfenicol (50 µg/ml) para inhibir el crecimiento bacteriano. En el presente estudio se encontró que sólo retarda el crecimiento bacteriano, ya que en el estudio de recuperación de *S. cerevisiae* crecieron colonias con un centro de color púrpura y un halo blanco-transparente (Figura 11) y que corresponden a

bacilos y cocabacilos Gram negativos determinados por la tinción de Gram, lo que posiblemente corresponda a *E. coli*. Sin embargo, estas colonias bacterianas son fácilmente distinguibles de las de *S. cerevisiae*. En los estudios realizados por Odds y Bernaerts, 1994, también encontraron crecimiento de *E. coli* en 4 hisopos anorectales de 116 analizados. Sin embargo, en las placas que se utilizaron para el muestreo de las excretas de los lechones, nunca crecieron colonias bacterianas. En los experimentos realizados con el medio de cultivo CA por Bovill *et al.*, 2001, no reporta problemas de contaminación por hongos filamentosos como *Aspergillus oryzae* y *Mucor racemosus*, aun cuando estos fueron mezclados intencionalmente en el alimento con *S. cerevisiae* antes de inocularlos a la placas del medio comercial. Esto no sucedió en los estudios realizados por Odds y Bernaerts, 1994, ya que de 66 mohos, entre ellos *Aspergillus* spp, mucorales y géneros contaminantes de laboratorio, 60 de estos crecieron a las 48 h a 30 °C en el medio de cultivo CA. En este trabajo experimental en el que se utilizaron las placas de CA, se tuvo crecimiento de hongos filamentosos del genero *Aspergillus* y del grupo de los mucorales. En algunos casos esta contaminación impidió que se realzaran algunas colonias identificadas presuntivamente como *S. cerevisiae*, por lo que en estas colonias perdidas no se pudo realizar la técnica de PCR para identificar la cepa Sc 47.

Se sugiere que para el uso de este medio con muestras de excretas o de alguna otra fuente con una fuerte carga de mohos, sería recomendable adicionarle rosa de bengala, diclorano y propionato como inhibitorios del desarrollo de mohos (Bovill *et al.*, 2001).

Empleando la técnica de PCR con los iniciadores D1 y D2 que reconocen las secuencias δ en el genoma de *S. cerevisiae*, se obtiene un

patrón de amplificación mostrando un polimorfismo de las secuencias amplificadas que es cepa-específico de *S. cerevisiae*. Lo anterior se debe a la posición y número de elementos δ únicos en cada cepa, haciendo posible la identificación y diferenciación de las cepas de *S. cerevisiae*. Esta técnica fue desarrollada por Ness *et al.*, (1993) y a la fecha es una de las más utilizadas por diversas empresas que utilizan *S. cerevisiae* por su rapidez y capacidad de discriminación. En la técnica de PCR del presente estudio se utilizó la información contenida en la versión 1 del protocolo LD 3002 y los estudios realizados por Ness *et al.*, (1993). En el protocolo LD 3002 se describe en las condiciones de amplificación que las temperaturas de alineación en los 4 y 30 ciclos de amplificación son de 45 y 42 °C, respectivamente, mientras que en el estudio de Ness *et al.*, (1993) las temperaturas de alineación en los 4 y 30 ciclos de amplificación son de 42 y 45 °C, respectivamente. Aun cuando el investigador Fernández-Espinar *et al.*, (2001), reporta que ambas temperaturas de alineación son bajas, en el estudio realizado por Ness *et al.*, (1993) no describe deficiencias en su técnica por utilizar estas temperaturas de alineación. En el estudio realizado se obtenían patrones de amplificación variables o en algunos casos ningún patrón de amplificación, por lo que se modificó la temperatura de alineación en los 30 ciclos de amplificación que originalmente eran de 42 °C por 50 °C, esto con base en el número de guaninas y citosinas que contienen los iniciadores. Esta modificación permitió un patrón de amplificación estable de la cepa Sc 47 de *S. cerevisiae* y un polimorfismo de secuencias amplificadas que permitió la diferenciación del resto de las cepas de *S. cerevisiae* encontradas. Se utilizaron las secuencias de los iniciadores descritos en el protocolo LD 3002 y aun cuando son diferentes a las utilizadas por Ness *et al.*, (1993) por que faltan dos bases, estas diferencias no afectaron la amplificación de las secuencias interdelta por la técnica de PCR de las cepas de *S. cerevisiae*.

En la Figura 12 (carriles 1 y 2) se observan patrones de amplificación que no varían por los métodos de preparación de los templados de ADN, mismos resultados describe de Barros-López *et al.*, (1996), por lo que se eligió el método de congelación-calentamiento súbito que describe el mismo investigador por las ventajas en cuanto a rapidez y simplicidad. También se cuantificó la cantidad de levaduras mínimas necesarias para poder llevar a acabo la técnica de PCR, ensayándose diferentes concentraciones que incluyeron las concentraciones de 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 y 1×10^5 levaduras. Se encontró que se necesitan a partir de 1×10^5 levaduras para obtener el patrón de amplificación, mientras que en los experimentos de Barros-López *et al.*, (1996) logra tener patrones de amplificación consistentes cuando se utilizan cantidades de 5×10^3 a 5×10^5 . Por lo que la técnica demuestra que no se necesita cuantificar el número de levaduras para cada reacción.

Al realizar la técnica de PCR con las especies de *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. valida*, *Cr. uniguttulatus*, *H. anomala*, *R. glutinis*, *R. minuta* y *T. globosa*, no se obtuvieron productos de amplificación, esto sugiere la ausencia de elementos δ en estas especies. Sin embargo, se obtuvo un patrón de amplificación en *C. kefir* y *C. guilliermondii* (ver carriles 6 y 7 de la Figura 13), aun cuando no se han reportado secuencias homólogas a los elementos δ en estas especies micóticas. Esto no es raro ya que la presencia de retrotransposones han sido reportados en otras especies micóticas como *C. albicans* (ver carril 8 de la Figura 13), los cuales fueron denominados Tca1 (transposón *C. albicans*) por Chen y Fonzi, (1992). También los estudios realizados por Ness *et al.*, (1983); Legras y Karst, (2003), reportan amplificación con las especies *Hanseniaspora uvarum* y *Saccharomyces carlsbergensis* En esta ultima levadura los investigadores

Legras y Karst, 2003 demuestran que es debido a la presencia de secuencias homólogas al retrotransposón Ty en su genoma, mientras que en *H. uvarum* se desconoce aún el porque de la amplificación. También han sido reportados en otras levaduras los retrotransposones Tf1 y Tf2 en *Schizosaccharomyces pombe* (Levin et al., 1994), Ylt1 en *Yarrowia lipolytica* (Schmid-Berger et al., 1994) y Pm-T1 en *Pichia membranaefaciens* (Pearson et al., 1995), así como en *Neurospora crassa* (Kinsey y Helber, 1989) y en *Cladosporium fulvum* (McHale et al., 1992).

De las cinco cepas de *S. cerevisiae* diferentes a la cepa Sc 47, se encontró que en dos de ellas, cepa 2003 y cepa 1 (Figura 13), tiene cada una un patrón único de amplificación. La cepa 1999, tiene el mismo patrón de la cepa Sc 47, ya que fue utilizada como una muestra ciega; sin embargo, hay una banda en la cepa 1999 (asterisco del carril 3 de la Figura 13) que no se encuentra en la cepa Sc 47 (control positivo de la Figura 13). Este tipo de bandas son reportados por Ness et al., (1993) como "bandas fantasmas" y el mismo investigador sugiere que esta aparición o desaparición de bandas sea ocasionada por la accesibilidad del iniciador en la región concerniente. Con respecto a las dos cepas restantes que no tienen patrón de amplificación, posiblemente se deba a la ausencia de elementos δ o estos se encuentren en distancias genómicas distantes que impidan la completa amplificación por la enzima polimerasa, ya que estas levaduras fueron previamente identificadas como *S. cerevisiae*, mediante pruebas bioquímicas, morfológicas y el medio de cultivo CA. De igual forma se encuentra involucrada la eficiencia de hibridación de los iniciadores D₁ y D₂ a las secuencias complementarias en las cadenas de ADN. Así como el número de secuencias complementarias disponibles con los iniciadores (Legras et al., 2003). También el investigador Fernández-Espinar et al., (2001) reporta 5 cepas comerciales vinícolas de *S. cerevisiae*,

que no muestran productos de amplificación de las regiones interdelta por la técnica de PCR. Todo lo anterior nos conduce a la necesidad de optimizar los iniciadores con una mayor homología a las secuencias δ que permitan incrementar el nivel de amplificación y de especificidad.

Por otra parte, en el experimento a), en el cual se muestreo la mucosa del tracto intestinal de duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon de lechones a los 8, 25 y 40 días de edad en la estación de otoño y cuyas madres habían recibido el 0.3 % del probiótico en su alimentación, se aislaron colonias de *S. cerevisiae* las cuales se identificaron por una metodología simplificada de pruebas bioquímicas, fisiológicas y morfológicas. Cada aislado de *S. cerevisiae* fue sometido a la amplificación de las regiones interdelta con los iniciadores D₁ y D₂ por la técnica de PCR, posteriormente, los productos de amplificación fueron clasificados de acuerdo al polimorfismo obtenido, encontrándose que existen poblaciones predominantes de una cepa silvestre (clasificada con el patrón 1, Figura 17) de *S. cerevisiae* en las tres edades del muestreo. Se propone que esto puede deberse a una influencia del tipo de insumos alimenticios que se utilizan en la estación de otoño o un efecto del probiótico *S. cerevisiae* cepa Sc 47 al favorecer el aumento de las poblaciones silvestres de *S. cerevisiae* en la madre y que estas sean heredadas a sus lechones en el momento del nacimiento. Un efecto contrario se observó en el experimento b) en el que se utilizaron lechones de la misma edad, pero cuya madre no recibió probiótico en su alimentación, ya que no se aisló ninguna colonia de *S. cerevisiae* a los 8 y 25 días de edad (ver Cuadro 6). En el experimento a) también se encontró que a medida que los lechones crecen y poseen una microbiota estable (40 días de edad), las poblaciones de *S. cerevisiae* aumentan, junto con la diversidad de cepas, las cuales fueron clasificadas por el polimorfismo de

los productos de amplificación con la técnica de PCR (Cuadro 5). Misma diversidad de cepas se encontró en los lechones de 40 días del experimento b), apareciendo de nueva cuenta como predominante el patrón 1 de *S. cerevisiae* (Cuadro 6). Al administrar a lechones el probiótico BIOSAF® Sc 47 en el experimento c), se encontraron en todos los lechones altas poblaciones de *S. cerevisiae* cepa Sc 47, identificada por la técnica de PCR, además de una gran variedad de cepas de *S. cerevisiae* clasificadas por el polimorfismo que se obtuvo al realizar la técnica de PCR, demostrando otra vez la influencia de la cepa Sc 47 de *S. cerevisiae* en la microbiota intestinal al favorecer el aumento en las poblaciones de cepas silvestres de *S. cerevisiae*, así como en variedad de estas cepas (Cuadro 7, Figura 19).

Con ayuda del polimorfismo de las secuencias interdelta amplificadas por la técnica de PCR de los *S. cerevisiae* provenientes de las excretas de los lechones y los *S. cerevisiae* provenientes de la mucosa intestinal de lechones, se obtuvieron 7 patrones diferentes además del patrón específico de la cepa Sc 47, por lo que se confirma la capacidad de la técnica para identificar la especie micótica a nivel de cepa (Ness *et al.*, 1993). De hecho, Fernández-Espinar *et al.*, (2001) reportaron que esta técnica posee un gran nivel de discriminación entre cepas en comparación con pruebas como el análisis de restricción del ADN mitocondrial y la cariotipificación electroforética. El identificar la cepa Sc 47 con el polimorfismo cepa-específico en las excretas de lechones, después de que la cepa pasó por el tracto gastrointestinal y se recuperó en un medio cromogénico, nos demuestra que no hay modificación de los elementos δ en el genoma de la levadura, esto es, que los elementos δ son muy estables. De acuerdo a los estudios realizados por Cameron *et al.*, (1979) y Ness *et al.*, (1993), se necesitan por lo menos 300 generaciones

para que se produzca una pequeña variación, incluso los experimentos de Ness *et al.*, (1993), demuestran que no hay variación aun cuando la levadura lleve a cabo procesos de fermentación por 30 generaciones o permanezca en condiciones de conservación a -170° C.

En el Cuadro 9 se comparan las ventajas y desventajas del medio de cultivo CA y la técnica de PCR para identificar la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

En los aislados que presuntamente por el medio de cultivo CA corresponde a *S. cerevisiae*, pero que no se obtuvieron productos de amplificación de los elementos δ por la técnica de PCR, es necesario realizar la prueba de cariotipificación electroforetica del genoma de *S. cerevisiae* (Fernández-Espinar *et al.*, 2001) para confirmar la cepa de *S. cerevisiae*.

Es posible que al utilizar animales de la misma camada, no se controlara el factor genético de colonización de la levadura, por lo que otros estudios requerirían repeticiones o utilizar animales de la misma edad pero de diferente camada.

Definitivamente, el uso de técnicas moleculares facilitan y simplifican la identificación y discriminación a nivel de cepa, por lo que con su aplicación permitirá la identificación más completa de la microbiota intestinal y la detección de los probióticos, durante su adición en la alimentación animal, ya que es indudable su potencial terapéutico y promotor de crecimiento para el bien de los animales y del hombre.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, se señalan las siguientes conclusiones:

El medio de cultivo CA resultó confiable para recuperar al probiótico *S. cerevisiae* de excretas, sin embargo, la sensibilidad (51.75 %) y especificidad (54.91 %) para identificar presuntivamente a *S. cerevisiae* al formar colonias púrpuras resultó poco satisfactoria. El seguimiento de la cepa Sc 47 de *S. cerevisiae*, se llevo a cabo de manera exitosa con el polimorfismo de secuencias amplificadas de los elementos δ por la técnica de PCR. Además, con esta técnica se identificaron y diferenciaron otras 7 cepas de *S. cerevisiae* que se encontraron de forma silvestre en el tracto gastrointestinal del lechón.

Los resultados indicaron que el probiótico BIOSAF[®] Sc 47, se aisló en las excretas de los lechones hasta 7 días después de suspender la administración del probiótico, por lo que se sugiere una administración continua del probiótico a lechones, para mantener un efecto constante del mismo.

7. REFERENCIAS.

1. Agarwal N, Kamra DN, Chaudhary LC, Sahoo A and Pathak NN. (2000). Selection of *Saccharomyces cerevisiae* strains for use as a microbial feed additive. *Lett Appl Microbiol*, 31:270-273.
2. Baleiras CMM, Eijsma B, Hofstra H, Huis in't Veld JHJ and van der Vossen JMBM. (1996). Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl Environ Microbiol*, 62:41-46.
3. de Barros LM, Soden A, Henschke PA and Langridge P. (1996). PCR Differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Appl Environ Microbiol*, 62:4514-4520.
4. de Barros LM, Soden A, Martens LA, Henschke PA and Langridge P. (1998). Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *In J Syst Bacteriol*, 48:279-286.
5. Barnett AJ, Payne WR and Yarrow D.: **Yeast: Characteristics and Identification**, First Published, Cambridge University Press, Great Britain, 1983.
6. Barns MS, Lane JD, Sogin LM, Bibeau C and Weisburg GW. (1991). Evolutionary Relationships among Pathogenic *Candida* Species and Relatives, *J Bacteriol*, 173:2250-2255.

-
7. Baumgartner C, Freydiere A-M and Gille Y. 1996. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using Albicans ID and CHROMagar Candida plates, *J Clin Microbiol*, 34:454-456.
 8. Beighton D, Ludford R, Clark TD, Brailsford RS, Pankhurst LC, Tinsley FG, Fiske J, Lewis D, Daly B, Khalifa N, Marren V and Lynch E. (1995). Use of CHROMagar Candida Medium for Isolation of Yeasts from Dental Samples, *J Clin Microbiol*. 33:3025-3027.
 9. Bezkorovainy A. (2001). Probiotics: determinants of survival and growth in the gut, *Am J Clin Nutr*, 73:399S-405S.
 10. Blum S, Reniero R, Schiffrin JE, Crittenden R, Mattila-Sandholm T, Ouwehand CA, Salminen S, von Wright A, Saarela M, Saxelin M, Collins K and Morelli L. (1999). Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement. *Trends in Food Science & Technology*, 10:405-410.
 11. Boeke JD, Garfinkel DJ, Styles CA and Fink GR. (1985). Ty elements transpose through an RNA intermediate, *Cell*. 40:491-500.
 12. Bourlioux P, Koletzko B, Guarner F and Braesco V. (2003). The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine", held in Paris, June 14, 2002. *Am J Clin Nutr*. 78:675-683.

-
13. Bovill R, Bew J and Robinson S. (2001). Comparison of selective media for the recovery and enumeration of probiotic yeasts from animal feed. *Int J. Food Microbiol.* 67:55-61.
 14. Brassart D and Schiffrin JE. (1997). The use of probiotics to reinforce mucosal defence mechanisms. *Trends in Food Science & Technology.* 8:321-326.
 15. Cameron JR, Loh EY and Davis RW. (1979). Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. *Cell,* 16:739-751.
 16. Carter RG and Chengappa MM.: **Bacteriología y Micología Veterinarias**, Editorial Manual Moderno, segunda edición, 1994.
 17. Chen JY and Fonzi WA. (1992). A temperature-regulated, retrotransposon-like element from *Candida albicans*. *J Bacteriol,* 174:5624-5632.
 18. Clemons VK, Park P, McCusker JH, McCullough MJ, Davis RW and Stevens DA. (1997). Application of DNA typing methods and genetic analysis to epidemiology and taxonomy of *Saccharomyces* isolates. *J Clin Microbiol,* 35:1822-1828.
 19. Cuarón IJA. (1999). La influencia de la levadura en la dieta, respuesta microbiológica antagonista. 3er. Seminario de

- Microbiología aplicada a la nutrición animal. Noviembre. Mérida Yucatán, México.
20. Edel, V.: Polymerase Chain Reaction in Mycology: an Overview. En: **Applications of PCR in Micology**, Edited by P.D. Bridge, D.K. Arora, C.A. Reddy and R.P. Elander. CAB International, 1998, p.p. 1-20.
21. Ewing, WN and Cole DJA.: **The Living Gut**. Ed. *Context*. First edition 1994.
22. Fernandez-Espinar MT, López V, Ramón D, Bartra E and Querol A. (2001). Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *Int J Food Microbiol*, 70:1-10.
23. Flores BJ.: Comparación de la microbiota levaduriforme dominante en lechones de 8, 25 y 40 días y la aislada en lechones de la misma edad provenientes de madres que recibieron un probiótico (Sc 47). Tesis de licenciatura Médico Veterinario Zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 2002.
24. Fooks LJ and Gibson GR. (2002). Probiotics as modulators of the gut flora. *B. J. of Nutrition*. 88:S39-S49.

-
25. Fuller R. (1989). A Review: Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol.* 66: 365-378.
26. Fuller R.. Introduction, In R. Fuller (ed.), **Probiotics 2. Applications and practical aspects.** Chapman and Hall, London.1997,p.p. 1-9.
27. Fuller R.: Probiotics for farm animals. In: **Probiotics: A Critical review,** Edited by Gerald W. Tannock, Horizon Scientific Press, U.K., 1999, p.p. 15-22.
28. García-Martos P., García-Agudo R., Hernández-Molina JM., Marín P., Tallero E. y Mira J. (1998). Identificación de levaduras de interés clínico en el medio de cultivo CHROMagar Candida. *Rev Iberoam Micol.* 15:131-135.
29. Giger-Reverdin S, Bezault N, Sauvant D and Bertin G. (1996). Effects of a probiotic yeast in lactating ruminants: interaction with dietary nitrogen level. *Animal Feed Science Technology*, 63: 149-162.
30. Goldin BR, Gorbach SL, Saxelin M, Barakat S, Gualtieri L and Salminen S. (1992). Survival of *Lactobacillus species* (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci.* 37:121-128.
31. Guarner F and Malagelada J-R. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet.* 361:512-519.

-
32. Hennequin C, Thierry A, Richard GF, Lecointre G, Nguyen HV, Gaillardin C and Dujon B. (2001). Microsatellite Typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains, *J Clin Microbiol*, 39:551-559.
33. Hillman K. 1999. "Manipulation of the intestinal microflora for improved health and growth in pigs". <http://www.pighealth.com/News99/GROWTH2.HTM>
34. Holzapfel H W, Haberer P, Snel J, Schillinger U and Huis in't Veld HJJ. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol*, 41:85-101.
35. Jadamus A, Vahjen W and Simon O. (2001). Growth behaviour of a spore forming probiotic strain in the gastrointestinal tract of broiler chicken and piglets. *Arch Tierernahr*, 54:1-17.
36. Kennedy MJ and Volz PA. (1985). Ecology of *Candida albicans* Gut Colonization: Inhibition of *Candida* Adhesion, Colonization, and Dissemination from the Gastrointestinal Tract by Bacterial Antagonism. *Infect immun*. 49:654-663.
37. King-Jordan I and McDonald JF. (1999). Tempo and mode of Ty element evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 151:1341-1351.

38. Kinsey JA and Helber J. (1989). Isolation of a transposable element from *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:1929-1933.
39. Legras J-L and Karst F. (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiol Lett*, 221:249-255.
40. Levin HL, Weaver DC and Boeke JD. (1990). Two related families of retrotransposons from *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*, 10:6791-6798.
41. Lewin B. Retrovirus y retroposones In Lewin B. Genes VII edición en español. Marbán libros S.L., España. 2001, p.p. 496-498.
42. Lieckfeldt E, Meyer W and Börner T. (1993). Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *J. Basic Microbiol*, 33:413-426.
43. Lin D & Lehmann PF. (1995). Random amplified polymorphic DNA for strain delineation within *Candida tropicalis*. *J Med Vet Mycol*, 33:241-246.
44. Lockhart SR, Pujol C, Joly S & Soll DR. (2001). Development and use of complex probes for DNA fingerprinting the infectious fungi. *Med Mycol*, 39:1-8.

-
45. Maejima K, Shimoda K, Morita C, Fujiwara T and Kitamura T. (1980). Colonization and pathogenicity of *Saccharomyces cerevisiae*, MC16, in mice and cynomolgus monkeys after oral and intravenous administration. *Jpn J Med Sci Biol.* 33:271-276.
46. Masneuf I, Aigle M and Dubourdieu D. (1996). Development of a polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism method for *Saccharomyces bayanus* identification in enology. *FEMS Microbiol Letts*, 138:239-244.
47. McCullough MJ, Clemons KV, McCusker JH and Stevens DA. (1998). Intergenic transcribed spacer PCR ribotyping for differentiation of *Saccharomyces* species and interspecific hybrids. *J Clin Microbiol*, 36:1035-1038.
48. McHale MTI, Roberts SM, Noble C, Beaumont M, Whitehead MP, Seth D and Oliver RP. (1992). Cf-T1, an LTR retrotransposon in *Cladosporium fulvum*, a fungal pathogen of tomato. *Mol. Gen. Genet.* 233:337-347.
49. McGrath A, Higgins DG and McCarthy TV. (1998). Sequence analysis of DNA randomly amplified from the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Mol Cell Probes*, 12:397-405.

-
- 50.Mendoza L.: Manual teórico-práctico del III Curso de Micología Molecular, 1 de Julio al 12 de Julio de 2002, Michigan State University, East Lansing Michigan, USA.
- 51.Mitsuoka T. (1992). Intestinal Flora and Agind. *Nutrition Reviews*, 50:438-446.
- 52.Murphy RA and Kavanagh KA. (2000). Adherence of clinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae* to buccal epithelial cells. *Med. Mycol*, 39:123-127.
- 53.Ness F, Lavallée F, Dubourdieu D, Aigle M and Dulau L. (1993). Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *J Sci Food Agric*, 62:89-94.
- 54.NOM – 111 – SSA1 – 1994. Bienes y servicios. Métodos para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- 55.Odds FC. and Bernaerts R. (1994). CHROMagar Candida a New Differential Isolation Medium for Presumptive Identification of Clinically Important *Candida* Species. *J Clin Microbiol*. 32:1923-1929.
- 56.Ogawa H, Fukushima K, Sasaki I, Matsuno S. (2000). Identification of genes involved in mucosal defense and inflammation associated

-
- with normal enteric bacteria. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 279:G492- G499.
57. O'Sullivan DJ. Analysis of the intestinal microflora. En: **Probiotics A critical review**, Edited by Gerald W. Tannock, Horizon Scientific Press, U.K., 1999, p.p. 23-44.
58. Pearson BM, Carter AT, Furze JM and Roberts IN. (1995). A novel approach for discovering retrotransposons: Characterization of a long terminal repeat element in the spoilage yeast *Pichia membranaefaciens* and use in strain identification, *Int J Syst Bacteriol*, 45:386-389.
59. Pedersen K and Tannock WG. (1989). Colonization of the Porcine Gastrointestinal Tract by Lactobacilli. *Appl Environl Microbiol*, 55:279-283.
60. Pecquet S, Guillaumin D, Tancrede C and Andremont A. (1991). Kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* elimination from the intestines of human volunteers and effect of this yeast on resistance to microbial colonization in gnotobiotic mice. *Appl Environ Microbiol*, 57:3049-3051.
61. Piper, P.: Isolation of Yeast DNA. En: **Yeast Protocols, Methods in Cell and Molecular Biology**, Edited by Ivor H. Evans, Human Press, Totowa, New Jersey, 1996, p.p. 103-107.

-
62. Pîrvulescu M, Panta L, Bucur E, Ionita C, Tetu-Oporanu M, Gruia M, Cariaban I and Ionescu C. (1996). Probiotic microorganisms for young pigs: testing and characterisation under gnotobiotic conditions. *Stud Res Vet Med*, 4:98-108.
63. Protocolo LD 3002, Versión 1, Lesaffre Développement, 07/02/01. Identification de souches de lev PCR RAPD – Ty.
64. Reid G and Frienship R. (2002). Alternatives to antibiotic use: probiotics for the gut. *Animal Biotech*. 13:97-112.
65. Rogelj I, Bogovic MB, Canzek MA and Stojkovic S. (2002). The survival and persistence of *Lactobacillus acidophilus* LF221 in different ecosystems. *Int J Food Microbiol*. 76:83-91.
66. Salminen S, Isolauri E and Salminen E. (1996). Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70:347-358.
67. Salminen S, von Bright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, M de Vos W, Fondén R, Saxelin M, Collins K, Mogensen G, Birkeland S-E and Mattila-Sandholm T. (1998). a . Demonstration of safety of probiotics – a review. *Intl J Food Microbio*. 44:93-106.
68. Salminen S, Ouwehand AC and Isolauri E. (1998). b . Clinical Applications of Probiotic Bacteria. *Int. Dairy Journal*, 8:563-572.

-
- 69.Sambrook J, Fritsch FE and Maniatis T.: **Molecular Cloning a Laboratory Manual**, Book 3, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 70.Sambrook J and Rusell WD.: **Molecular Cloning a Laboratory Manual**, Volume 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, third edition, 2001.
- 71.Schmid-Berger N, Schmid B and Barth G. (1994). Ylt1, a highly repetitive retrotransposon in the genome of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *Jf Bacteriol*, 176:2477-2482.
- 72.Shah M P, Schäfer V and Knothe H. (1993). Medical and veterinary use of antimicrobial agents: implications for public health. A clinican's view on antimicrobial resistance. *Vet Microbiol*. 35:269-274.
- 73.Shortt C. (1999). The probiotic century: historical and current perspectives. *Trends in Food Science & Technology*. 10:411-417.
- 74.Spencer TJF and Spencer MD.: Isolation and Identification of Yeasts from Natural Habitats. In: **Yeast Protocols, Methods in Molecular Biology** Vol. 53. Edited by: Evans, H.I., Human Press, New Jersey, 1996. p.p. 1-4.

-
75. Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. (2002). Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:15451-15455.
76. Tannock WG.: A fresh look at the intestinal microflora. In: **Probiotics: A Critical review**, Edited by Gerald W. Tannock, Horizon Scientific Press, U.K., 1999, p.p. 4-14.
77. Vázquez -Juárez R, Andlid T and Gustafsson L. (1997). Adhesión of yeast isolated from fish gut to crude intestinal mucus of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Mol Mar Biol Biotechnol*. 6:64-71.
78. Waaij van der D.: Microbial Ecology of the Intestinal Microflora: Influence of Interactions with the Host Organism. In: **Probiotics, Other Nutritional Factors, and Intestinal Microflora**. Edited by Lars A. Hanson and Robert H. Yolken. Nestlé Nutrition Workshop Series, Philadelphia, 1999, p.p. 1-14.
79. Walker MG.: Yeast technology. In: **Yeast physiology and biotechnology**, Ed. John Wiley & Sons, reprinted January 2000.
80. Zeng S, Wu LC & Lehmann PF. (1996). Random amplified polymorphic DNA analysis of culture collection strains of *Candida* species. *J Med Vet Mycol*. 34:293-297.

-
81. Yücesoy M and Marol S. (2003). Performance of CHROMagar candida and BIGGY agar for identification of yeasts species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2:8-14.

Cuadro 1. Bacterias, levaduras y hongos filamentosos usados como probióticos en animales domésticos. Fuente original: Fuller, 1999.

<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>B. pseudolongum</i>
<i>L. delbrueckii ss. bulgaricus</i>	<i>B. brevis</i>
<i>L. casei ss. casei</i>	<i>B. thermophilus</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>B. cereus</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>B. toyoi</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. natto</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. mesentericus</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>B. licheniformis</i>
<i>L. lactis</i>	<i>Clostridium butyricum</i>
<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>S. salivarius ss. thermophilus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Candida pintolopesii</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	

Cuadro 2. UFC de *S. cerevisiae* por gr. de heces en el medio CA en lechones que recibieron 1×10^8 *S. cerevisiae* por 7 días.

Días de muestreo									
1º día	2º día	5º día	8º día	11º día	14º día	17º día	20º día	23º día	26º día
0	5,000	5,000	50,000	10,000	5,000	5,000	70,000	0	0
	5,000	50,000	55,000	20,000	5,000	50,000			
	10,000	50,000	105,000	20,000	50,000	50,000			
	10,000	105,000	200,000	50,000	55,000				
		150,000	350,000	70,000					
		500,000	1,000,000						
		1,000,000	1,500,000						
			1,500,000						

Cuadro 3. Descripción del morfotipo colonial de 18 diferentes especies micóticas en el medio de cultivo CA.

Genero/especie	Color,	Pigmento	Superficie	Borde
<i>Candida albicans</i>	Verde, pálida	Verde	Lisas	Enteras
<i>Candida glabrata</i>	Morado claro, brillante	Ninguno	Lisas	Enteras
<i>Candida guilliermondii</i>	Azul marino, brillante	Azul	Lisas	Enteras
<i>Candida lusitanae</i>	Morado, pálida	Morado	Lisas	Enteras
<i>Candida kefyr</i>	Púrpura, brillante	Ninguno	Lisas	Enteras
<i>Candida krusei</i>	Rosa claro, seca	Ninguno	Rugosas	Filamentosas
<i>Candida parapsilosis</i>	Morado claro, pálida	Ninguno	Lisas	Enteras
<i>Candida rugosa</i>	Azul rey, pálida	Azul	Lisas	Enteras
<i>Candida tropicalis</i>	Azul marino, opaca	Azul	Lisas	Enteras
<i>Candida valida</i>	Blanca, brillante	Ninguno	Lisas	Enteras
<i>Candida zeylanoides</i>	Morado claro	Ninguno	Rugosas	Filamentosas
<i>Cryptococcus laurentii</i>	Verde azul, brillante	Ninguno	Lisas	Onduladas
<i>Cr. uniguttulatus</i>	Crema, brillante	Ninguno	Lisas	Enteras
<i>Hansenula anomala</i>	Blanca, brillante	Ninguno	Lisas	Enteras
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Coral, opaca	Ninguno	Lisas	Onduladas
<i>Rhodotorula minuta</i>	Coral, brillante	Ninguno	Lisas	Enteras
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Púrpura, brillante	Ninguno	Lisas	Enteras
<i>Torulaspota globosa</i>	Crema/rosa, brillante	Ninguno	Lisas	Enteras

Cuadro 4. Morfotipo en el medio de cultivo CA de 126 especies de levaduras: identificación presuntiva de la especie en el medio de cultivo CA y confirmación por PCR en el caso de los *S. cerevisiae* y en el resto de las levaduras por métodos de identificación convencionales.

Numero de especies	Especie sospechada	Especie confirmada	Sensibilidad	Especificidad	Valor predictivo positivo
114	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i> (59) <i>C. kefir</i> (1) No <i>S. cerevisiae</i> (54)	51.75 %	54.91 %	67.45 %
12	Otras cepas <i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. lusitaniae</i> <i>C. kefir</i> <i>C. krusei</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. valida</i> <i>Cr. uniguttulatus</i> <i>R. glutinis</i> <i>R. minuta</i> <i>T. globosa</i>	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. lusitaniae</i> <i>C. kefir</i> <i>C. krusei</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. valida</i> <i>Cr. uniguttulatus</i> <i>R. glutinis</i> <i>R. minuta</i> <i>T. globosa</i>			

Cuadro 5. Agrupación de los patrones obtenidos por la técnica de PCR en los *S. cerevisiae*, aislados del tracto intestinal de lechones cuya madre recibió el 0.3 % del probiótico BIOSAF® Sc 47 en su alimentación.

Días de edad de los lechones	Patrón de amplificación	% del patrón de amplificación (número de aislados micóticos)
8 días	Ningún patrón	16 % (3)
	Patrón uno	79 % (15)
	Patrón cuatro	5 % (1)
25 días	Ningún patrón	17 % (1)
	Patrón uno	66 % (4)
	Patrón seis	17 % (1)
40 días	Ningún patrón	20 % (4)
	Patrón uno	50 % (10)
	Patrón dos	5 % (1)
	Patrón cuatro	10 % (2)
	Patrón cinco	10 % (2)
	Patrón seis	5 % (1)

Cuadro 6. Agrupación de los patrones obtenidos por la técnica de PCR en los *S. cerevisiae*, aislados del tracto intestinal de lechones cuyas madres sólo recibieron alimento comercial.

Días de edad de los lechones	Patrón de amplificación	% del patrón de amplificación
8 días	Ningún aislado	-
25 días	Ningún aislado	-
40 días	Ningún patrón	14 % (1)
	Patrón uno	58 % (4)
	Patrón tres	14 % (1)
	Patrón seis	14 % (1)

Cuadro 7. Agrupación de los patrones obtenidos por la técnica de PCR en los *S. cerevisiae* aislados del tracto intestinal de lechones que recibieron el 0.3 % del probiótico BIOSAF® Sc 47.

Días de edad de los lechones	Patrón de amplificación	% del patrón de amplificación
40 días	Ningún patrón	7 % (4)
	Patrón uno	9 % (5)
	Patrón dos	6 % (3)
	Patrón tres	19 % (10)
	Patrón cuatro	-
	Patrón cinco	4 % (2)
	Patrón seis	-
	Patrón Sc 47	55 % (30)

Cuadro 8. Número de UFC/g de heces de *S. cerevisiae* cepa Sc 47 confirmadas por la técnica de PCR.

Días de muestreo									
1º día	2º día	5º día	8º día	11º día	14º día	17º día	20º día	23º día	26º día
0	10,000	50,000	5,000	0	5,000	0	0	0	0
	10,000		350,000						
			500,000						
			1,000,000						

Cuadro 9. Ventajas y desventajas de los métodos de identificación utilizados: CA y el polimorfismo de secuencias amplificadas de los elementos δ por la técnica de PCR.

	Ventajas	Desventajas
CA	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Identifica a partir de una levadura. ✓ Identifica varias especies de levaduras. ✓ La identificación en excretas es posible cuando se hacen diluciones. 	<ul style="list-style-type: none"> • No identifica cepa, sólo especie. • Nivel de identificación de especie es medianamente específica. • Fácil contaminación, de no fácil control. • Identificación en tres días
PCR	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Identifica especie y cepa. ✓ Identificación en un día a partir de un cultivo de 24 horas. ✓ Nivel de identificación de especie y cepa es altamente específica. 	<ul style="list-style-type: none"> • Identifica a partir de 1×10^5 levaduras. • No fue posible la identificación en las excretas. • Sólo identifica especies y cepas de <i>S. cerevisiae</i>. • Falsos positivos, pero son controlables.

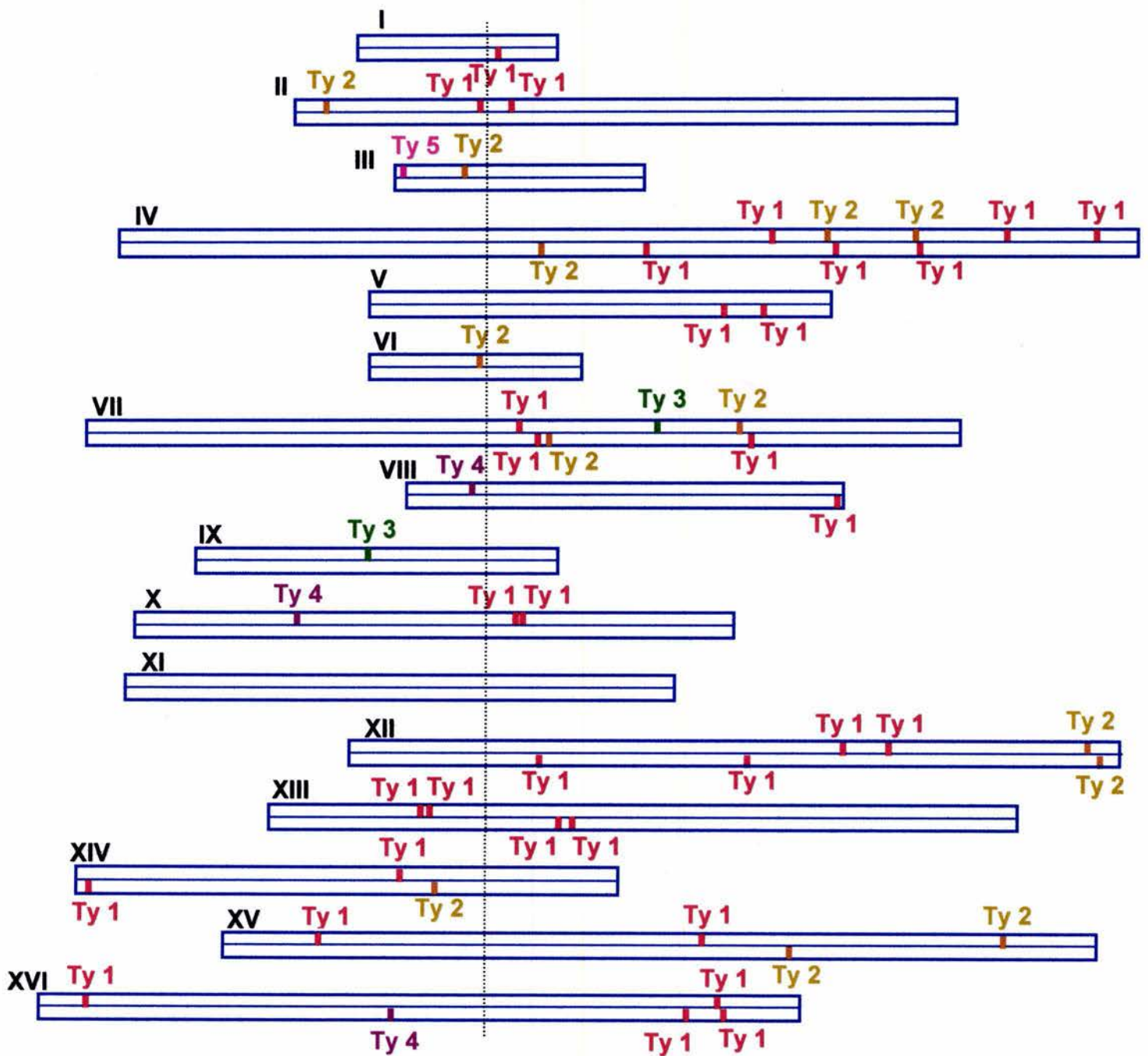


Figura 1. Elementos Ty en el genoma de *S. cerevisiae* cepa S288C.

Fuente original: http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/feldmann/yeast_genome/Yeast_2.htm

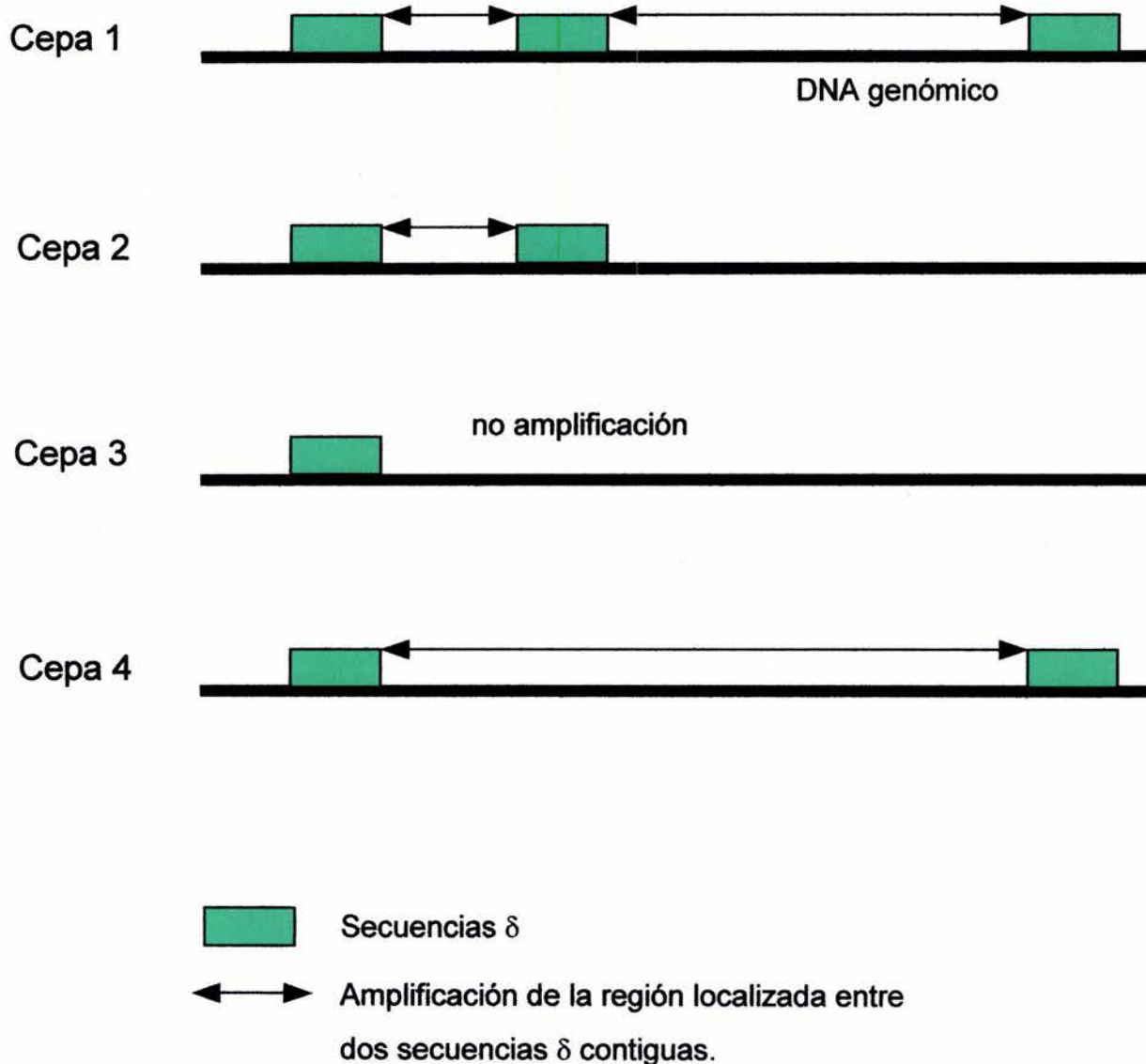


Figura 2. Principio de la técnica de PCR para amplificar las secuencias δ . Posible distribución de las secuencias δ en el mismo cromosoma pero en diferentes cepas. Dando origen al polimorfismo, ya que las bandas obtenidas en cada cepa son diferentes en tamaño y número, el cual es observado en el patrón de amplificación. Fuente original: Ness, *et al.*, 1993.

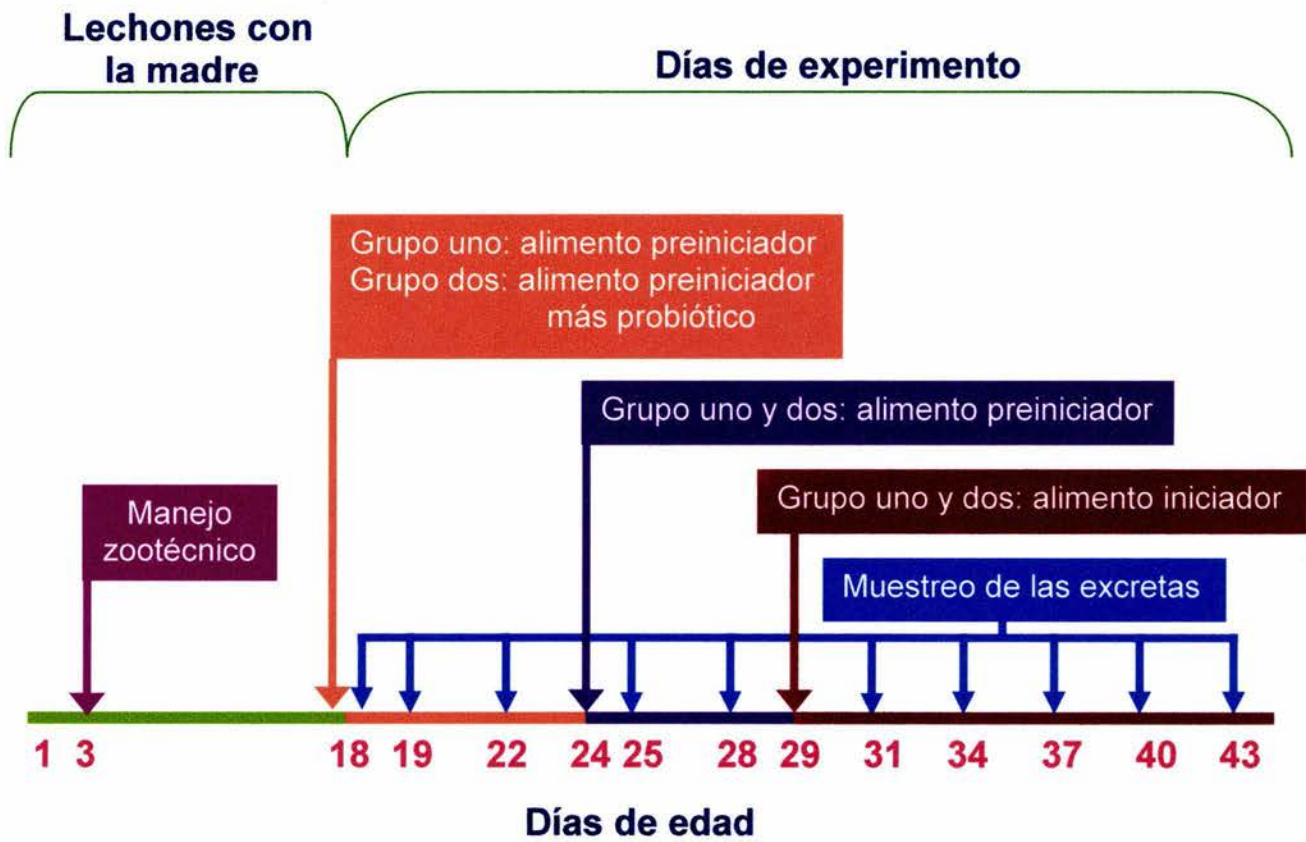


Figura 3. Cronograma de manejo zootécnico, alimentación y días de muestreo de las excretas de lechones.



Figura 4. Toma de muestras de los lechones utilizados en el experimento.

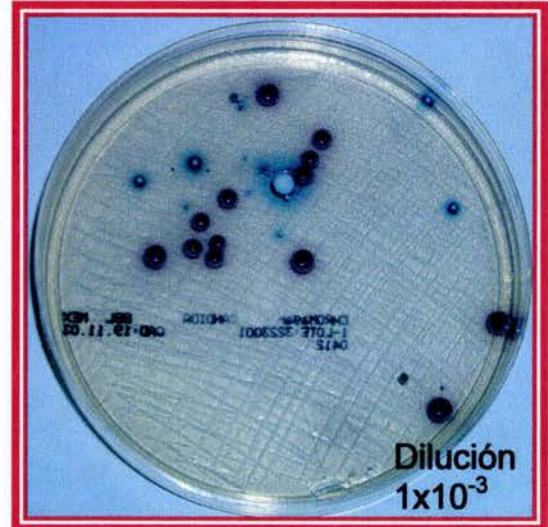
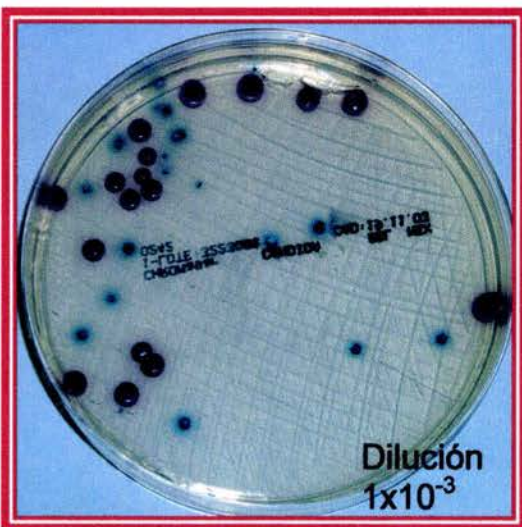
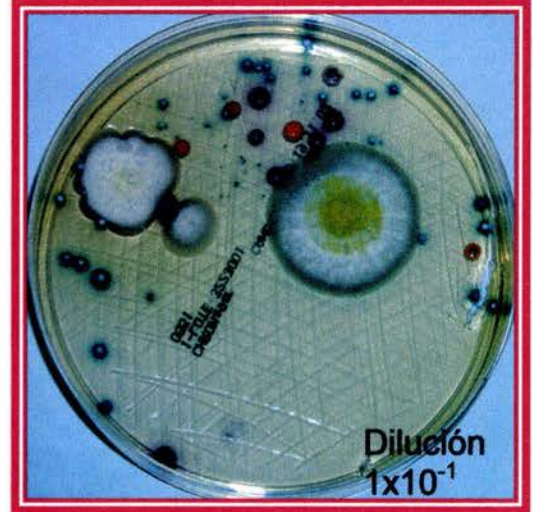
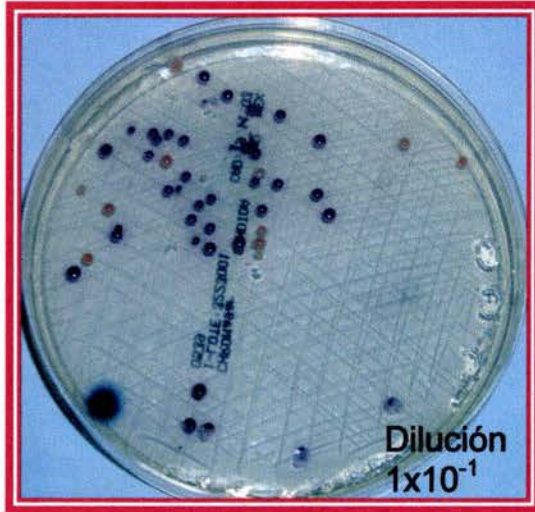
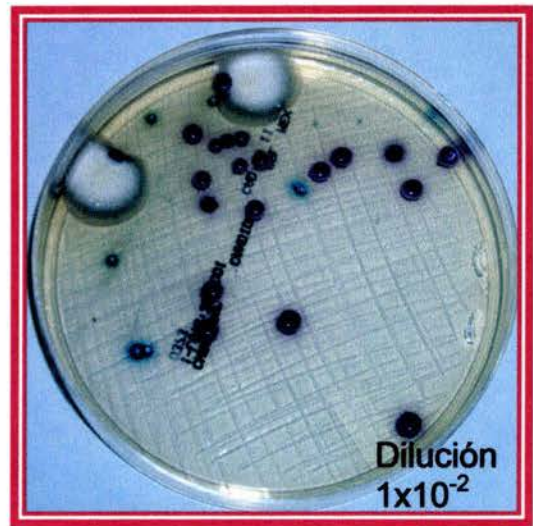
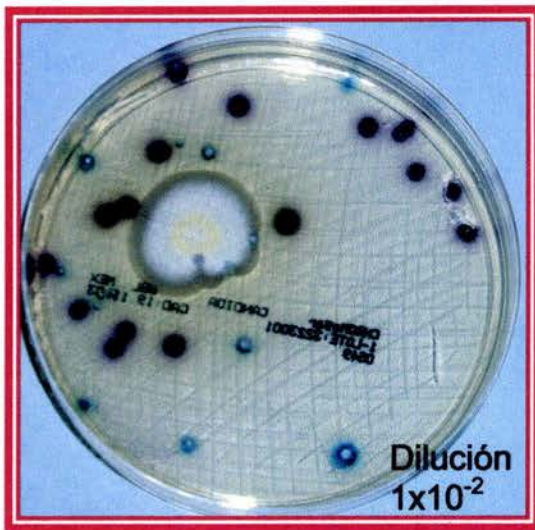


Figura 5. Unidades formadoras de colonias de *Saccharomyces cerevisiae* en el medio CHROMagar Candida®, se observan de color púrpura y lisas, a las 72 horas de incubación.

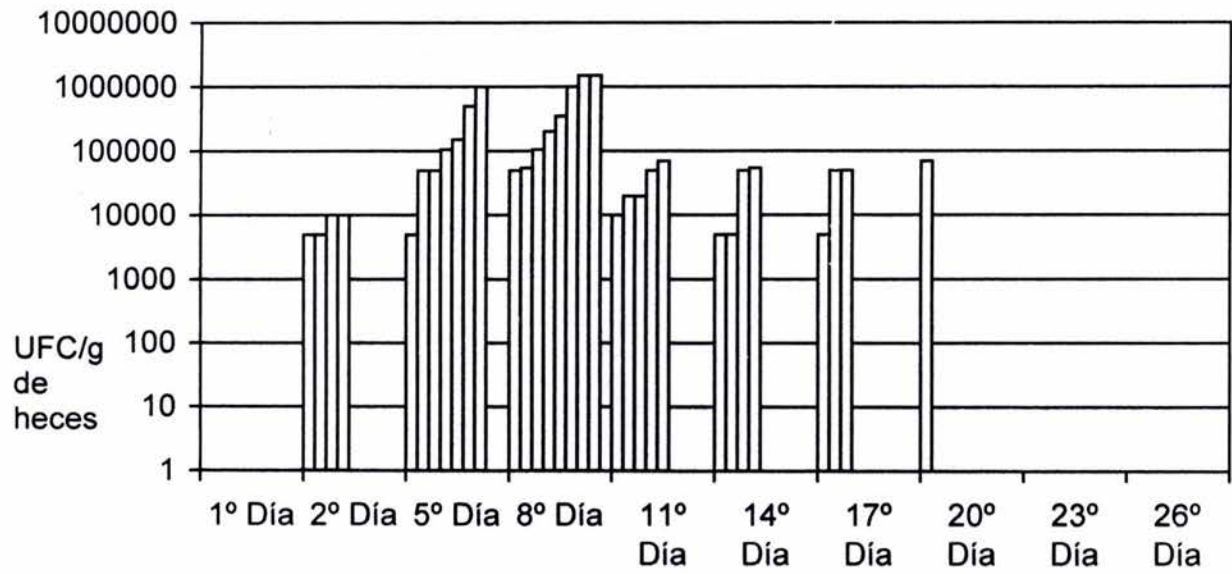


Figura 6. Número de UFC/gr de heces de *S. cerevisiae* en el medio CA.

□ Un lechón.

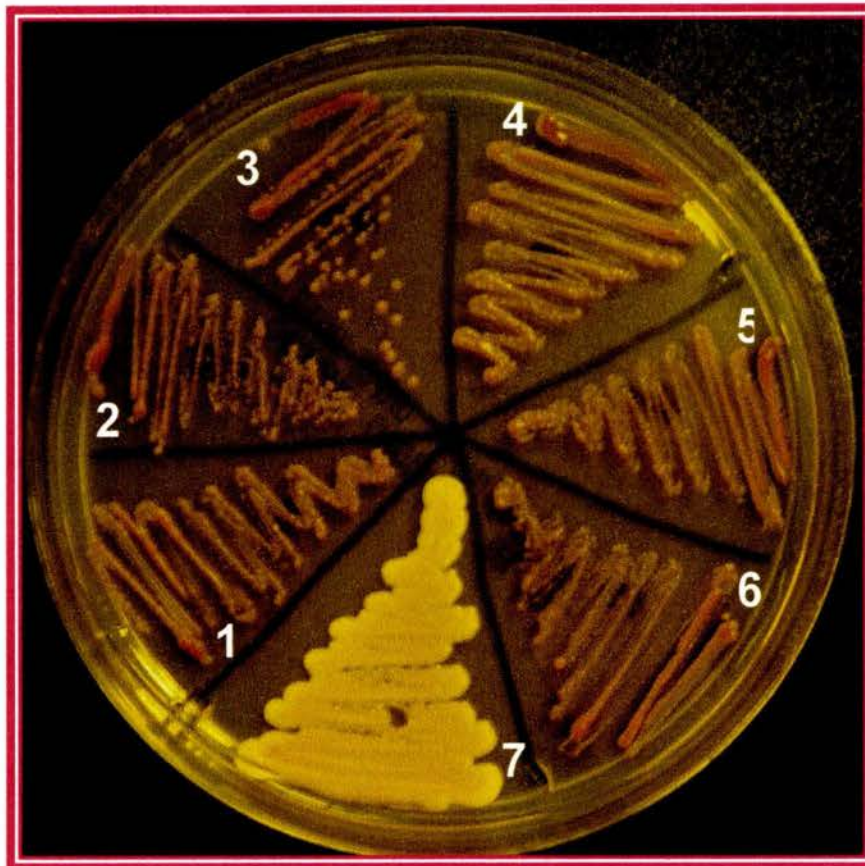


Figura 7. Morfotipo colonial de 6 cepas diferentes de *Saccharomyces cerevisiae* en el medio CHROMagar Candida® a las 72 horas de incubación a 30 °C.

1 – *Saccharomyces cerevisiae* BIOSAF Sc 47®, 2 – *Saccharomyces cerevisiae* Probios®, 3 – *Saccharomyces cerevisiae* Probiótico 2000, 4 – *Saccharomyces cerevisiae* Probiótico 1999, 5 – *Saccharomyces cerevisiae* Lev-Instant®, 6 – *Saccharomyces cerevisiae* Probiótico 2003, 7 – *Candida lambica*

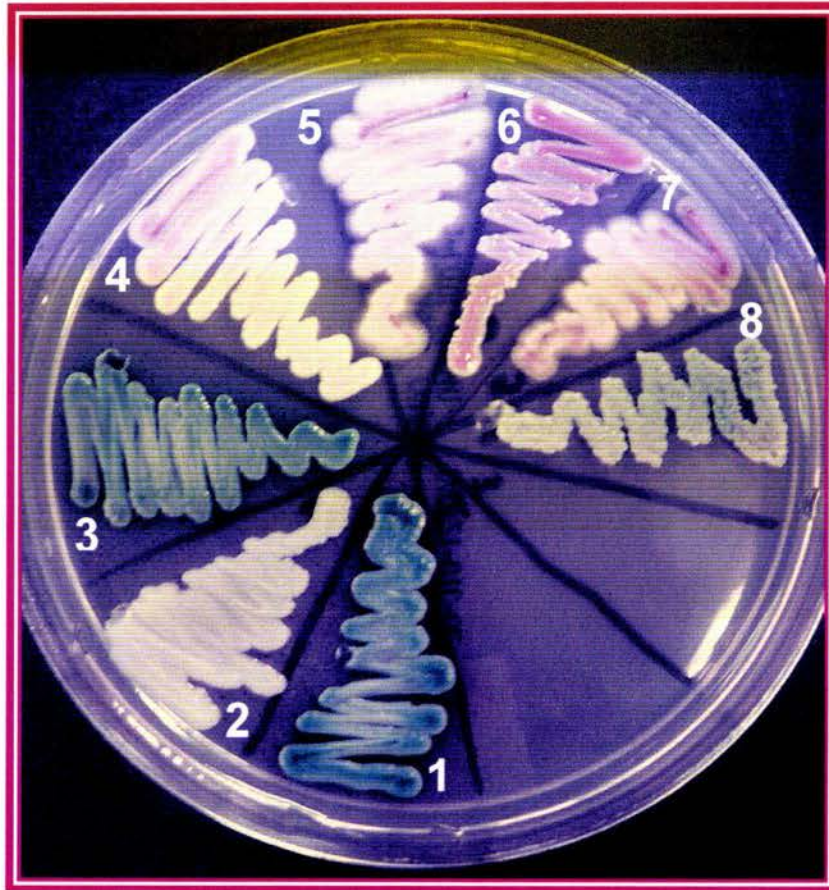


Figura 8. A. Morfotipo colonial de 8 especies micóticas en el medio CHROMagar Candida® a las 72 horas de incubación.

- 1 - *Candida tropicalis*; 2 - *Cryptococcus uniguttulatus*; 3 - *Candida guilliermondii*;
4 - *Candida parapsilosis*; 5 - *Candida zeylanoides*; 6 - *Torulopsis glabrata*;
7 - *Candida krusei*; 8 - *Cryptococcus laurentii*.

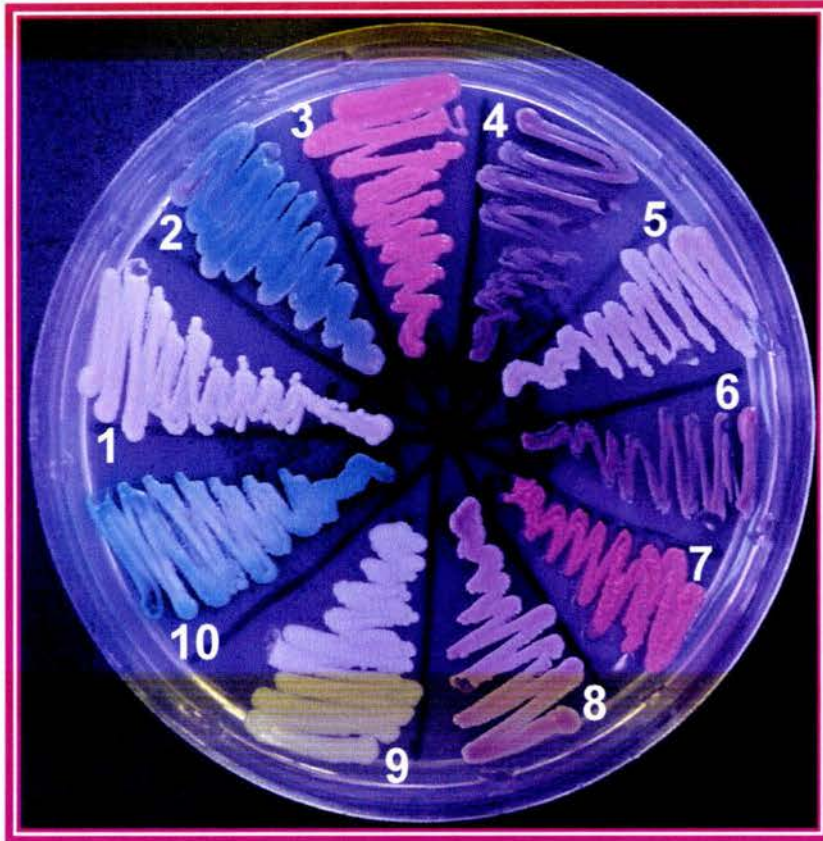


Figura 9. B. Morfotipo colonial de 10 especies micóticas en el medio CHROMagar Candida® a las 72 horas de incubación.

1 - *Torulaspota globosa*; 2 - *Candida rugosa*; 3 - *Rhodotorula minuta*; 4 - *Candida kefyr*; 5 - *Hansenula anomala*; 6 - *Saccharomyces cerevisiae*; 7 - *Rhodotorula glutinis*; 8 - *Candida lusitaniae*; 9 - *Candida valida*; 10 - *Candida albicans*.

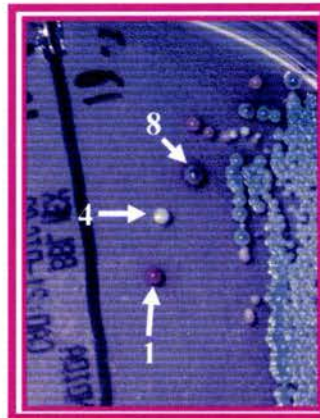
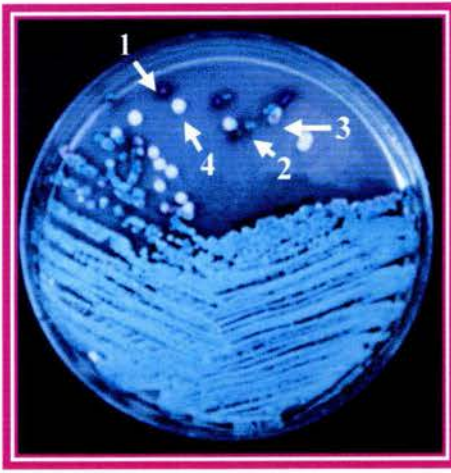


Figura 10. Morfotipo colonial de *Saccharomyces cerevisiae* mezclada con otras levaduras en el medio CHROMagar Candida® a las 72 horas de incubación.

- 1 - *Saccharomyces cerevisiae*, 2 - *Candida albicans*, 3 - *Candida guilliermondii*,
 4 - *Candida parapsilosis*, 5 - *Cryptococcus uniguttulatum*, 6 - *Hansenula anomala*,
 7 - *Candida krusei*, 8 - *Candida tropicalis*.

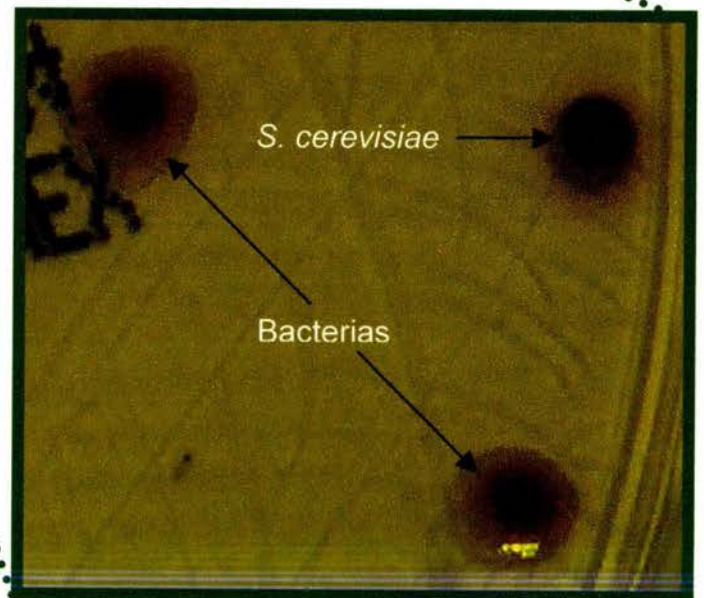
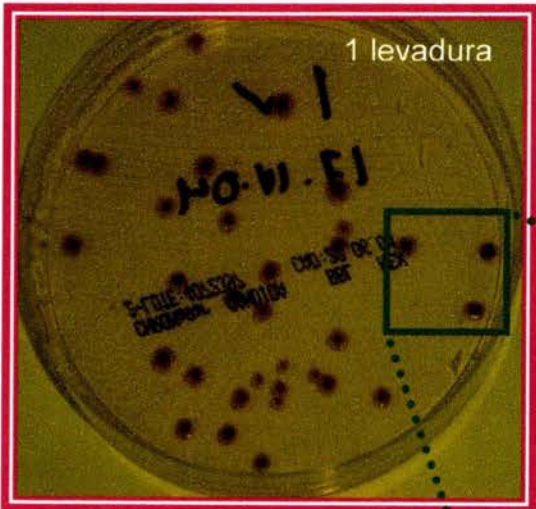
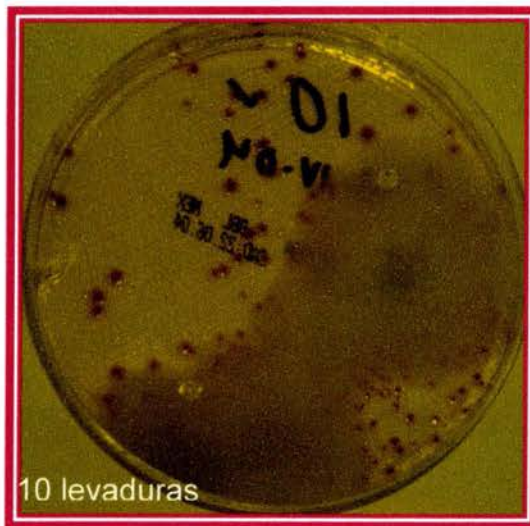


Figura 11. Recuperación de *S. cerevisiae* cepa Sc 47 contenido en excretas de lechón en el medio CHROMagar Candida® a las 48 horas de incubación.

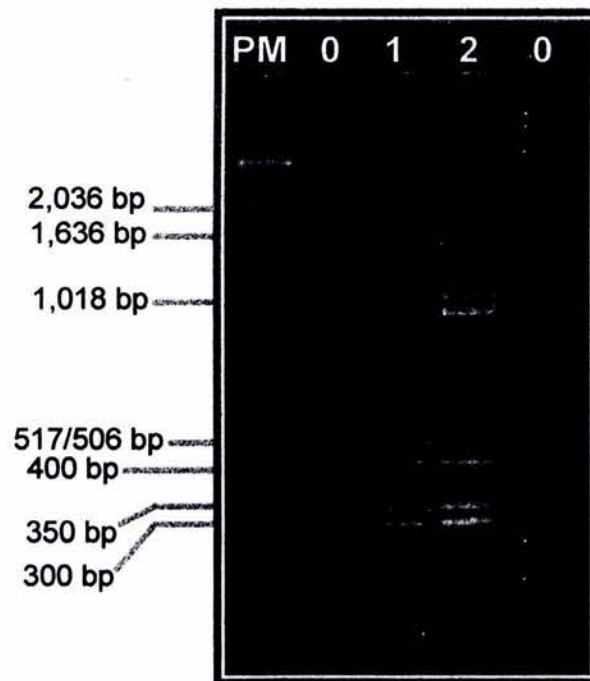


Figura 12. Amplificación por la técnica de PCR de *Saccharomyces cerevisiae* cepa Sc 47 con la ADN polimerasa (Amplificasa[®]). Gel de agarosa al 2 % en TBE 0.5 X, 100 Volts, 45 min. PM - Marcador 1 Kb (Gibco[®]). 0 - Control negativo, 1 - ADN de Sc 47 por el método de congelación-calentamiento súbito y 2 - ADN genómico de Sc 47 por el método de lisis alcalina-perlas de vidrio.

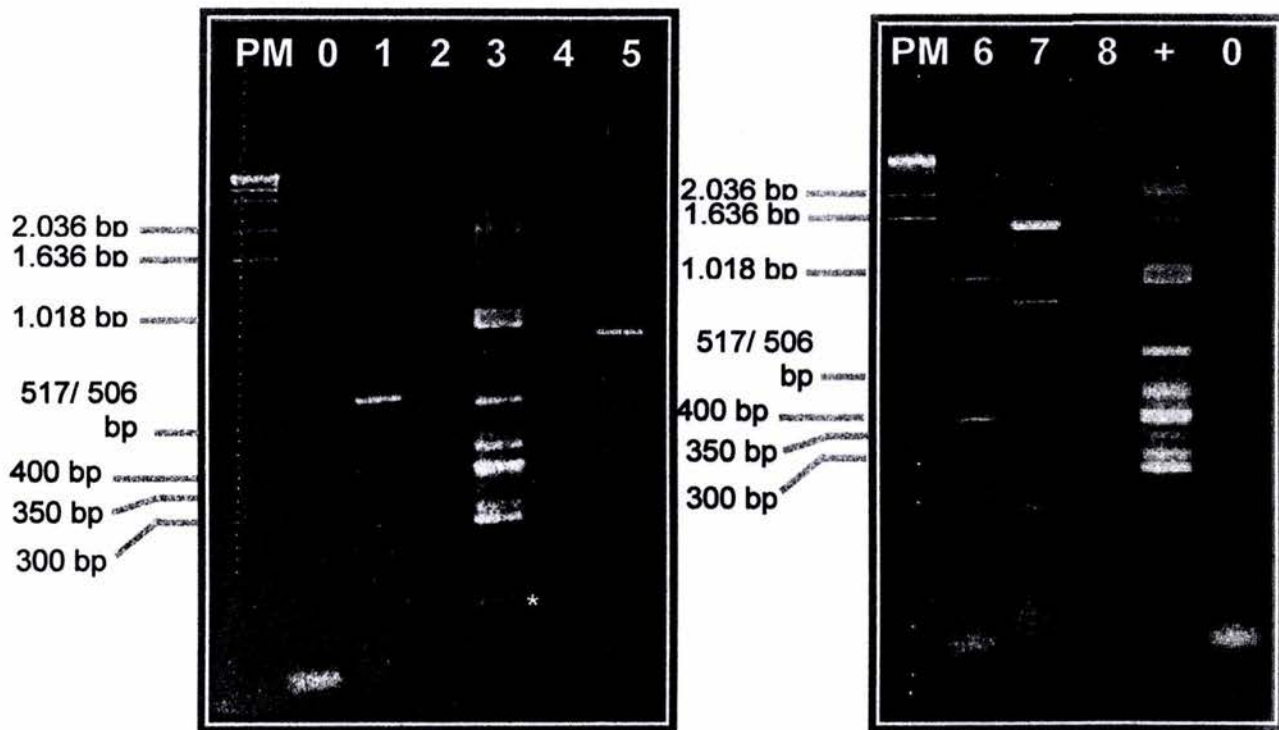


Figura 13. Amplificación por la técnica de PCR de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y especies micóticas no correspondientes a *S. cerevisiae*. Gel de agarosa al 2 % en TBE 0.5 X, 100 Volts, 45 minutos. PM - Marcador de 1 kb (Gibco®), 0 - Control negativo, 1 - cepa 2003, 2 - Probios®, 3 - cepa 1999, 4 - cepa 2000, 5 - cepa 1, 6- *Candida kefir*, 7 -*Candida guilliermondii*, 8 - *Candida albicans*, + Control positivo (Cepa Sc 47)



Figura 14. Amplificación por la técnica de PCR de 7 patrones de *S. cerevisiae* encontradas en el tracto intestinal y excretas de lechones. Gel de agarosa al 2 % en TBE 0.5 X, 100 Volts, 45 min. PM - Marcador de 1 Kb (Gibco®), 1 - Patrón 1, 2 - Patrón 2, 3 - Patrón 3, 4 - Patrón 4, 5 - Patrón 5, 6 - Patrón 6, 7 - Patrón 7, 8 - BIOSAF® Sc 47.

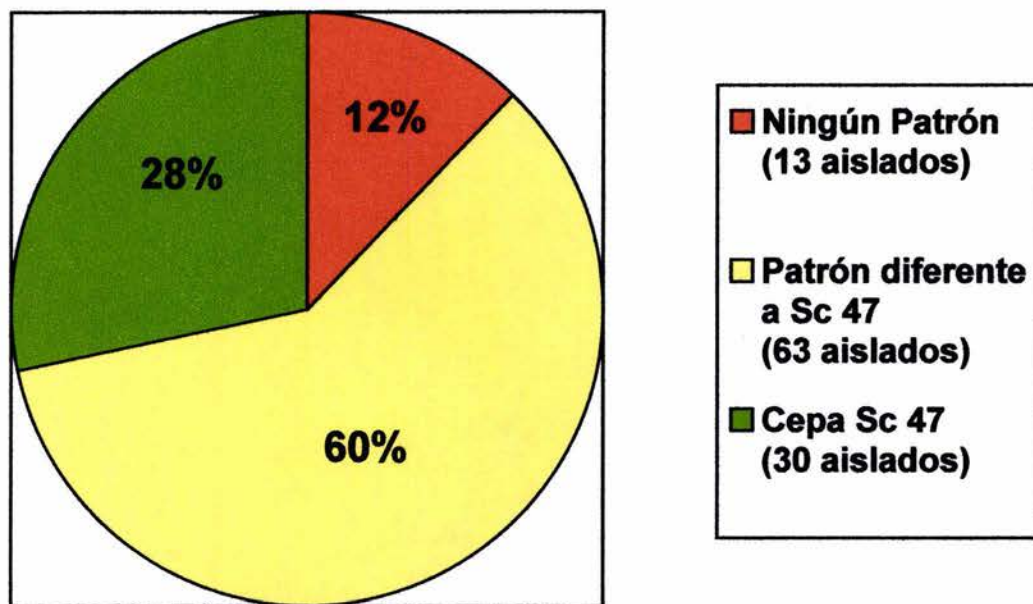


Figura 15. Identificación por la técnica de PCR de 106 aislados identificados por pruebas bioquímicas, fisiológicas y morfológicas como *S. cerevisiae*, provenientes de un estudio previo.

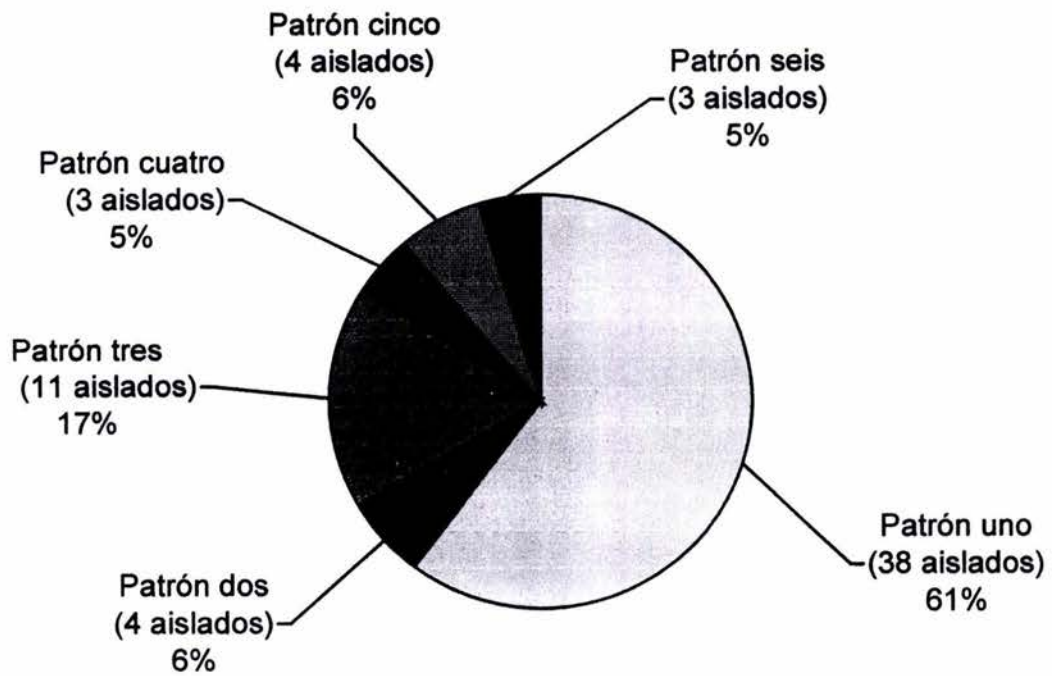


Figura 16. Agrupación de los *S. cerevisiae* diferentes a la cepa Sc 47 provenientes de un estudio previo, en seis patrones por la técnica de PCR.

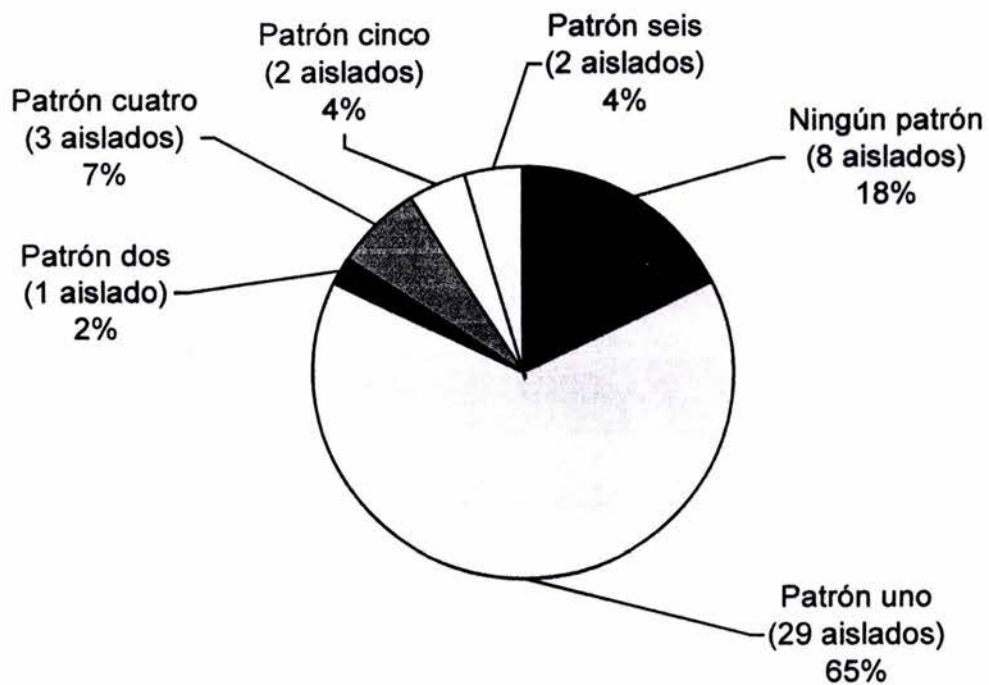


Figura 17. Agrupación por la técnica de PCR de los patrones de *S. cerevisiae*, provenientes del tracto intestinal de lechones cuya madre recibió el 0.3 % del probiótico BIOSAF® Sc 47 en su alimentación.

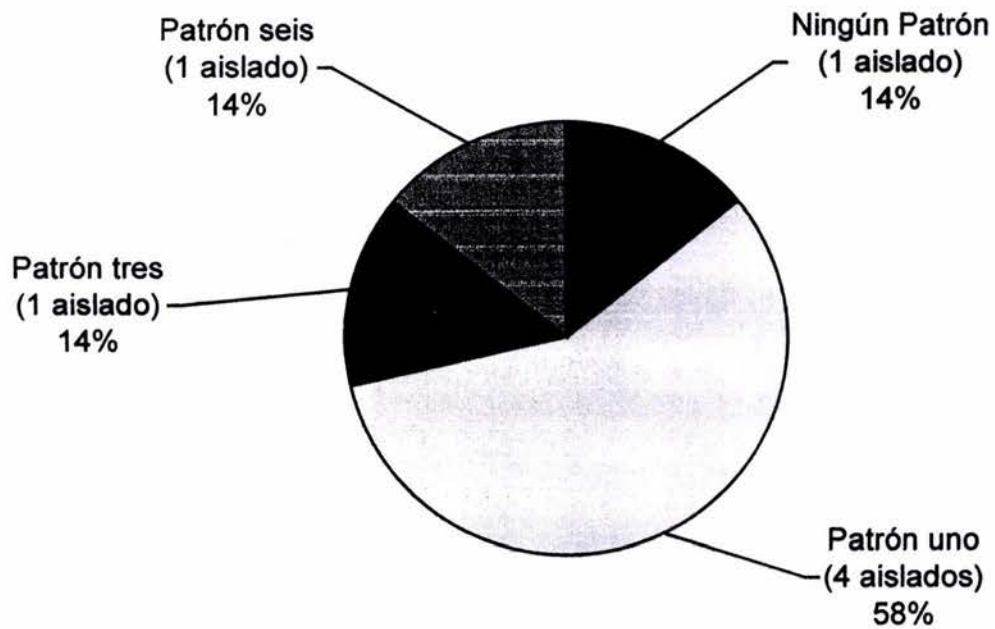


Figura 18. Agrupación por la técnica de PCR de los patrones de *S. cerevisiae*, provenientes del tracto intestinal de lechones cuyas madres sólo recibieron alimento comercial.

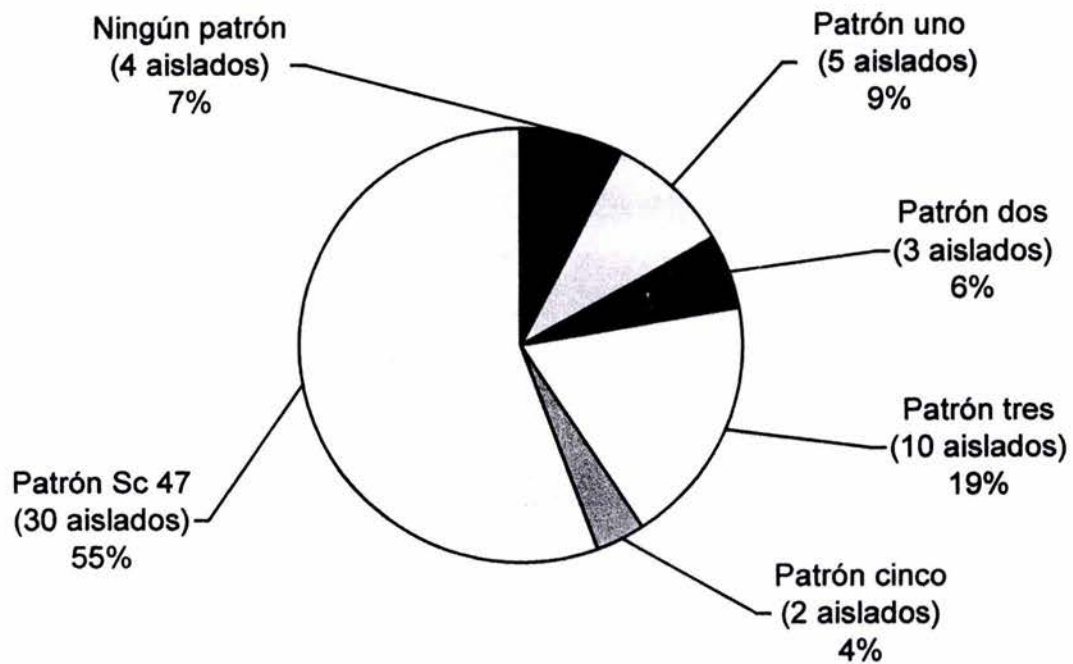


Figura 19. Agrupación por la técnica de PCR de los patrones de *S. cerevisiae*, provenientes del tracto intestinal de lechones que recibieron el probiótico BIOSAF® Sc 47 al 0.3 %.

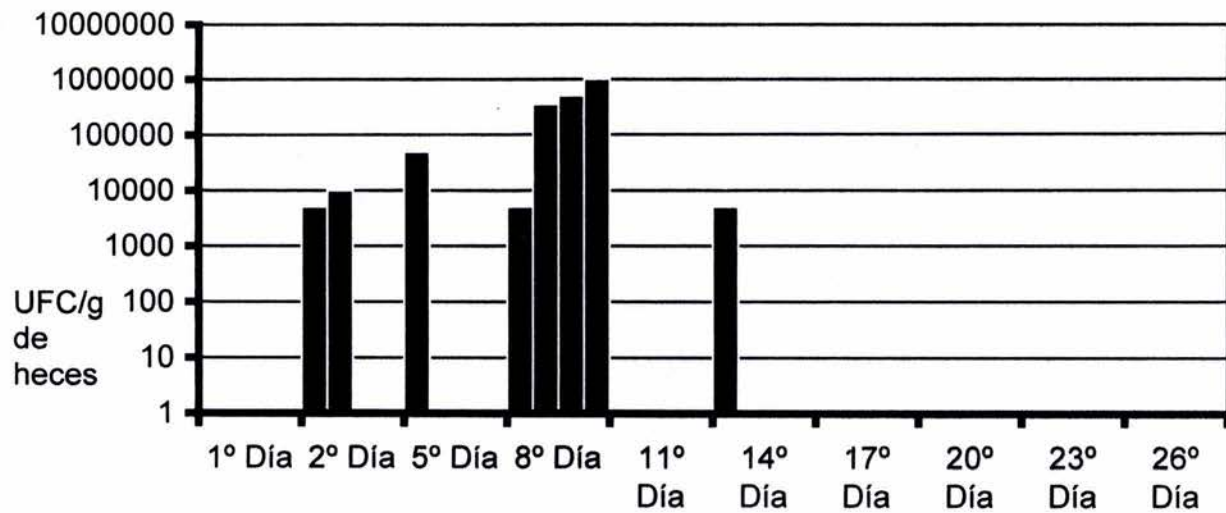


Figura 20. Número de UFC/g de heces de *S. cerevisiae* cepa Sc 47 confirmadas por la técnica de PCR. ■ Un lechón.