

17



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMPARACION DE LA MICROBIOTA
LEVADURIFORME DOMINANTE EN LECHONES DE
8, 25 Y 40 DIAS Y LA AISLADA EN LECHONES DE LA
MISMA EDAD PROVENIENTES DE MADRES QUE
RECIBIERON UN PROBIOTICO (Sc47)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
JOEL FLORES BONILLA

ASESOR: MVZ PhD ROBERTO ARNULFO CERVANTES OLIVARES
MVZ MPA GRACIELA TAPIA PEREZ

MEXICO, D.F.

2002





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIA

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por todo su apoyo: mis padres (Joel y Esmeralda) por el ejemplo que siempre nos han dado a mis hermanas (Livia, Ludivina, Esmeralda y Aida) y a mi.

A ti Gheysel por todo tu cariño, comprensión y amor.

Al Dr. Roberto A. Cervantes Olivares: por la confianza que deposito en mi, por toda su ayuda y enseñanzas, ya que sin ellas no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A todos mis maestros con los que he tenido el gusto de conocer durante mi formación, especialmente a:

QFB. MC. Carolina Segundo Zaragoza, por su amistad, ayuda y consejos para cumplir con mis objetivos.

Dra. Cristina Rodríguez Sánchez, por su amistad y el tiempo dedicado a la revisión de mi tesis.

Dra. Graciela Tapia Pérez, por toda su ayuda como asesora en la parte estadística de este trabajo.

A mis sinodales por su tiempo y ayuda en las correcciones para mejorar este trabajo: MVZ Roberto Martínez Gamba, Dr. Francisco Suárez Güemes y MVZ Luis Corona Gochi.

Al proyecto CONACYT y los laboratorios SAFMEX quienes aportaron parte del financiamiento para que este estudio se llevara a cabo.

Al departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia en especial al laboratorio de Micología, por haberme permitido realizar este estudio.

Al personal académico del departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ que me ha acompañado en mi estancia en el laboratorio. A los técnicos que forman parte del laboratorio de preparación de prácticas por su ayuda en la preparación de los medios y reactivos.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM por haberme permitido realizar mi formación profesional.

A todos ustedes muchas gracias.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVOS.....	7
HIPÓTESIS.....	8
MATERIAL Y METODOS.....	9
RESULTADOS.....	20
DISCUSIÓN.....	23
LITERATURA CITADA.....	30
CUADROS.....	35
FIGURAS.....	41
APÉNDICE A.....	44
APÉNDICE B.....	57

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Dieta, 6-AJ' cerdas gestación y sementales (2.875 Mcal de EM / Kg y 11.7 % de proteína digestible), elaborada en el CENID-Fisio (INIFAP) Ajuchitlán, Qro. para la alimentación de cerdas en gestación y sementales.

Cuadro 2. Dieta, 7-AJ' cerdas lactación (3.302 Mcal de EM / Kg y 16.1 % de proteína digestible), elaborada en el CENID-Fisio (INIFAP) Ajuchitlán, Qro. para la alimentación de cerdas en lactación.

Cuadro 3. Dieta, 1-AJ' cerdos iniciación (3.500 Mcal de EM / Kg y 16.8 % de proteína digestible), elaborada en el CENID-Fisio (INIFAP) Ajuchitlán, Qro. para la alimentación de cerdos iniciación (primera semana postdestete).

Cuadro 4. Dieta, 2-AJ' cerdos destete (3.301 Mcal de EM / Kg y 15.7 % de proteína digestible), elaborada en el CENID-Fisio (INIFAP) Ajuchitlán, Qro. para la alimentación de cerdos destetados (8 a 14 días postdestete).

Cuadro 5. Dieta, 3-AJ' cerdos destete (3.304 Mcal de EM / Kg y 16.5 % de proteína digestible), elaborada en el CENID-Fisio (INIFAP) Ajuchitlán, Qro. para la alimentación de cerdos destetados (15 a 35 días postdestete).

Cuadro 6. Descripción de la morfología colonial de levaduras y bacterias.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la metodología utilizada para el aislamiento de colonias levaduriformes provenientes del tracto intestinal del lechón.

Figura 2. 7 especies micóticas de 29 aislados del tracto intestinal de lechones de 8 días de edad cuyas madres se les adiciono probiotico (grupo dos).

Figura 3. Comparación de 11 especies micóticas de 24 aislados del tracto intestinal de lechones de 25 días de edad cuya madre recibió alimento balanceado (grupo uno) y 12 especies micóticas de 34 aislados del tracto intestinal de lechones a la misma edad, cuya madre se le adiciono en su alimentación probiotico (grupo dos).

RESUMEN

FLORES BONILLA JOEL. 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). (Bajo la asesoría de MVZ Ph.D. Roberto Arnulfo Cervantes Olivares y MVZ MPA Graciela Tapia Pérez).

Debido al limitado conocimiento sobre la flora micótica intestinal del cerdo, se realizó el presente estudio, para aislar los agentes levaduriformes dominantes en la microflora intestinal de lechones. Se utilizaron 36 lechones cruce Yorkshire x Duroc, 18 en primavera y 18 en otoño, en cada estación se dividieron dos grupos de nueve lechones cada uno, cada grupo con su respectiva madre. En ambas estaciones las madres de los grupos uno, recibieron alimento balanceado y en los grupos dos de ambas estaciones las madres recibieron alimento balanceado además de probiótico BIOSAF Sc 47 (SAFMEX) al 3 %. De cada grupo se sacrificaron 3 lechones a los 8, 25 y 40 días de edad, se muestrearon los segmentos intestinales (duodeno, yeyuno, ileon, ciego y colon) con un hisopo, las muestras fueron mantenidas en refrigeración hasta su aislamiento e identificación. Se diseñó una metodología que pueda ser empleada de rutina para la identificación de levaduras saprófitas en los animales e incluyó: morfología microscópica y estructural (observación de las estructuras de reproducción sexual y asexual) y pruebas bioquímicas (asimilación y fermentación de carbohidratos y utilización de nitratos y citratos), con base en Barnett, *et al* (1983), la identificación de los aislados se comparó con el sistema API 20 C (bioMérieux). Los resultados

obtenidos en primavera y otoño no mostraron diferencias estadísticas. Las especies de levaduras dominantes encontradas como parte de la microflora del tracto intestinal de lechones fueron: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. parapsilosis*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. valida*, *C. zeylanoides*, *Cryptococcus laurentii*, *C. neoformans*, *C. uniguttulatum*, *Hansenula anomala*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta* y *Torulaspota globosa*. También se encontró en los lechones de los grupos dos, *Saccharomyces cerevisiae* que fue inducida previa ingesta de las madres. La adición del probiótico Sc 47 en la alimentación de la cerda influyó en el número de aislados levaduriformes que se obtuvieron del tracto intestinal de sus lechones, en comparación de los aislados levaduriformes en los lechones cuyas madres solo recibieron alimento balanceado ($p < 0.05$). Pero no influyó en la colonización con una mayor variedad de especies micóticas dominantes (doce en total), con respecto a las especies micóticas dominantes de los lechones cuyas madres no recibieron probiótico (once en total).

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 PROBIOTICO (Sc 47).

INTRODUCCIÓN.

Al momento de nacer el tracto gastrointestinal del lechón es estéril, subsecuentemente, las bacterias y levaduras de origen materno y las del ambiente son las pioneras en colonizar el intestino del recién nacido.¹ Así la microflora intestinal del cerdo juega un papel importante en el huésped, colaborando en la protección de algunas enfermedades causadas por la colonización de patógenos.² También la microflora intestinal lleva a cabo procesos de fermentación siendo el colon el lugar donde se efectúa con mayor eficiencia la fermentación microbiana, el ileon también cuenta con una población microbiana significativa.³

La microflora normal o nativa consta de una población residente, la cual permanece constante en el huésped, y una población transitoria que cambia dinámicamente en composición.⁴ Cada segmento del tracto intestinal puede contener distintas especies microbianas. Se calculan aproximadamente de 10 a 100 mil millones de bacterias por gramo de contenido intestinal, constituida por una diversidad taxonómica de más de 300 diferentes especies microbianas.⁴

Entre los factores que modifican el balance de la microflora intestinal se encuentran: a) los nutrientes disponibles, b) la ingesta de poblaciones bacterianas

y micóticas,^{5,6} c) el estrés a que son sometidos con las técnicas de manejo y d) la inclusión de antibióticos en la dieta.^{2,7}

El control de la colonización de la mucosa digestiva por nuevos microorganismos, se lleva a cabo mediante la resistencia a la colonización del tracto digestivo por la microflora nativa y el hospedador.⁸ La flora nativa juega un papel importante en la resistencia a la colonización. Sin embargo, no está claro aún cuáles son los grupos microbianos que participan en los mecanismos de resistencia a la colonización. Los mecanismos microbianos consisten en la producción de bacteriocinas junto con otras enzimas extracelulares, ácidos grasos de cadenas cortas y competencia de nutrientes. El hospedero también contribuye con factores inespecíficos como: movimiento peristáltico, secreción de saliva y moco, descamación de células epiteliales, la producción de IgA por el tejido linfóide intestinal asociado (GALT),³ ácidos biliares, lisozima y lisolecitina.⁵

PROBIOTICOS.

Un probiótico por definición es: un microorganismo vivo usado como suplemento alimenticio que beneficia al animal hospedero al colaborar en el mejoramiento del balance microbiano intestinal.^{9,10,11} Por lo que representa una alternativa para prevenir y curar enfermedades en cerdos. Las especies bacterianas utilizadas como probióticos son entre otras: *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium*, y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*.^{10,12}

En la industria porcina los probióticos han mostrado un mejoramiento en ganancia de peso, conversión alimenticia y número de lechones vivos,^{2,13} esto se debe según los beneficios potenciales propuestos por las compañías productoras

de probióticos, como son: incremento en la resistencia a las enfermedades infecciosas (particularmente del intestino), disminución de la duración de diarreas, estimulación de la fagocitosis por leucocitos sanguíneos periféricos y modulación de la expresión de citocinas como un efecto adyuvante.⁹

Aunque los probióticos para cerdos se han estudiado desde hace décadas, recientemente han recibido más atención, debido a la resistencia bacteriana que han ocasionado los antibióticos y los residuos de estos que permanecen en los tejidos.^{2,14} Siendo este uno de los principales motivos por los que la industria de los probióticos este floreciendo día con día, motivando a los investigadores a establecer una credibilidad con bases científicas, por lo que actualmente se investigan evidencias experimentales que soporten tales atributos asociados a los productos existentes en el mercado.⁹ Probablemente la falta de credibilidad científica se deba en parte al concepto de probiótico, ya que está basado en un entendimiento muy pobre de la microflora intestinal, concentrándose esencialmente en 2 grupos de bacterias, *Lactobacilos* y *Bifidobacterias*, mientras que prácticamente se han ignorado otras especies microbianas que habitan el tracto intestinal.⁹

Las teorías propuestas por Fuller (1999)⁹, Cuarón (1999)¹² y Lee (2000)² como mecanismos de acción de los probióticos son las siguientes: producción de sustancias anti-patogénicas (producción de ácidos u otros materiales), competencia por nutrientes disponibles (utilización de enzimas), mejoramiento del sistema inmune (estimulación de macrófagos y neutrófilos) y competencia por los sitios de colonización (adhesión de receptores a la pared intestinal). Otros mecanismos de acción que han sido reportados por Williams (1988)¹⁵ y Mendoza

(1996)¹⁶ al usar *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico, son los siguientes: promueve el crecimiento de bacterias anaeróbicas y celulolíticas, efectúa una simbiosis no solo con el huésped, sino también con las poblaciones bacterianas, ya que las levaduras tienen la capacidad de desdoblar nutrientes que las bacterias no son capaces de desdoblar y viceversa. Por otro lado Chapman (1988)¹⁴ y Pirvulescu (1996)¹⁰ reportan que *Saccharomyces cerevisiae* mejora la utilización de alimentos, incrementando la digestibilidad de la fibra.

El conocimiento de la microflora intestinal en animales monogástricos es necesario, especialmente en lo concerniente a las relaciones entre el hospedero y la microflora. Lo que permitirá una evaluación científica de los probióticos para así, sentar las bases del desarrollo de suplementos alimenticios que puedan mejorar la salud y producción animal.¹⁷

OBJETIVOS.

1. Comparar la microbiota levaduriforme dominante del grupo de lechones provenientes de madres sin probiotico, a los 8, 25 y 40 días de edad con la encontrada a las mismas edades en el grupo de lechones cuyas madres recibieron probiotico.

2. Diseñar una rutina metodologica para identificar la microflora levaduriforme dominante en lechones.

HIPÓTESIS.

Los lechones provenientes de madres que se les adiciono *Saccharomyces cerevisiae* (Sc 47) en su alimentación adquirirán la levadura por contacto con las heces y secreciones de la madre, por lo que se encontrara un mayor número de aislados micóticos en comparación de lechones cuyas madres no se les adiciono dicha levadura en su alimento.

MATERIAL Y METODOS.

MATERIAL BIOLÓGICO.

Se utilizaron 36 lechones híbridos de cruce Yorkshire x Duroc. Los cuales se alojaron y alimentaron en el Centro Nacional de Investigación y Desarrollo en Fisiología y Mejoramiento Animal (CENID-Fisio) del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Forestales y Pecuarias (INIFAP), ubicado en Ajuchitlán Querétaro. Los lechones permanecieron con su respectiva madre desde el nacimiento hasta los 25 días de edad en que fueron separados a otro corral.

El estudio se dividió en dos partes, el primero se realizó en primavera y el segundo en otoño, en cada uno los animales se dividieron en dos grupos:

Primavera (abril-mayo del 2000).

Grupo uno. Nueve lechones de los cuales tres fueron sacrificados a los 8 días, tres a los 25 días y tres a los 40 días de edad. La madre de los lechones recibió un alimento formulado para gestación y lactancia.

Grupó dos. Nueve lechones de los cuales tres fueron sacrificados a los 8 días, tres a los 25 días y tres a los 40 días de edad. La madre recibió un alimento formulado para gestación y lactancia al cual se le resto 30 Kg./Ton de sorgo o de maíz y se incluyo 30 Kg./Ton. de probiotico (Sc 47).

Otoño (octubre-noviembre del 2000).

Grupo uno. Nueve lechones, se utilizó el mismo esquema de sacrificio. La madre recibió un alimento formulado para gestación y lactancia.

Grupo dos. Nueve lechones, se utilizó el mismo esquema de sacrificio. La madre recibió un alimento formulado para gestación y lactancia al cual se le resto 30 Kg./Ton de sorgo o de maíz y se incluyo 30 Kg./Ton. de probiotico (Sc 47).

Se utilizó el probiotico comercial BIOSAF Sc 47 elaborado por los Laboratorios SAFMEX el cual consiste en un liofilizado de *Saccharomyces cerevisiae*.

La alimentación de las madres en ambas estaciones fue de la siguiente manera:

Grupo uno. Durante los 114 días de gestación, se les suministro 2 Kg de alimento (6-AJ' CERDAS, GESTACIÓN Y SEMENTALES) (Cuadro 1), hasta el día de parto las cerdas recibieron 2 Kg de alimento, después se aumento de manera progresiva $\frac{1}{2}$ Kg hasta alcanzar los 5 kilogramos, después de ello la alimentación fue con la formula alimentaría (7-AJ' CERDAS, LACTACIÓN) (Cuadro 2).

Grupo 2. Durante los 114 días de gestación de las madres, se les suministro 2 Kg de alimento (6-AJ' CERDAS, GESTACIÓN Y SEMENTALES) (Cuadro 1), a la formula se le sustituyo 30 Kg./Ton. de sorgo o de maíz por 30 Kg./Ton. de Sc 47, hasta el día de parto las cerdas recibieron 2 Kg de alimento, después se aumento de manera progresiva $\frac{1}{2}$ Kg hasta alcanzar los 5 kilogramos, después de ello la alimentación fue con la formula alimentaría (7-AJ' CERDAS, LACTACIÓN) (Cuadro 2), a la formula se le sustituyo 30 Kg./Ton. de sorgo o de maíz por 30 Kg./Ton. de Sc 47.

La alimentación posdestete de los lechones fue de la siguiente manera: en la primer semana posdestete los lechones de ambos grupos recibieron el alimento denominado 1-AJ' CERDOS, INICIACIÓN (Cuadro 3). De los 8 a 14 días posdestete los lechones recibieron el alimento denominado 2-AJ' CERDOS, DESTETE (Cuadro 4). De los 15 a 30 días posdestete los lechones recibieron el

alimento denominado 3-AJ' CERDOS, DESTETE (Cuadro 5). Los lechones no recibieron en ninguna etapa levaduras, ni antibióticos.

COLECCIÓN DE MUESTRAS.

Se tomaron muestras de las regiones del intestino (duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon) de 3 lechones elegidos aleatoriamente por cada grupo (grupo uno y grupo dos).

Utilizando la misma metodología una repetición se realizó en otoño, las muestras se colectaron a la mismas edades (8, 25 y 40 días) y en las mismas regiones (duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon).

Los animales fueron sacrificados con bióxido de carbono. Las muestras se obtuvieron separando los intestinos de la cavidad abdominal, identificando anatómicamente cada porción intestinal. Se realizó una descontaminación de la superficie en el área del tejido conjuntivo que recubre externamente a los intestinos mediante una espátula al rojo blanco. Con el material de cirugía, previamente flameado, se efectuó un corte longitudinal de aproximadamente un cm de largo y con hisopos estériles se froto un área de aproximadamente un cm² de mucosa. Se utilizó siempre la misma metodología.^{18,19}

TRANSPORTE DE MUESTRAS.

Cada hisopo fue colocado e identificado individualmente en tubos con medios de transporte de Stuart.^{18,19} Las muestras fueron transportadas en refrigeración, hasta el Laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia en la UNAM, Campus Ciudad Universitaria.

ASLAMIENTO.

Las muestras fueron sembradas por el método de aislamiento en cultivo puro en el medio Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) adicionado con antibiótico (cloranfenicol) e incubadas a 30 ° C.¹⁹

Se reviso el crecimiento en las cajas cada 24 horas, durante 72 horas. Se seleccionaron las diferentes colonias levaduriformes, realizando la tinción de Gram para observar la morfología microscópica (ovalada, redonda, alargada)^{19,20,21} y las características de la morfología colonial (Cuadro 6).²² Todas las colonias se sembraron por el método de aislamiento en cultivo puro en SDA y se incubaron a 30 ° C, de 24 a 48 horas,²³ obtenido el crecimiento se comprobó la pureza del cultivo mediante observación microscópica (figura 1).

Cuando no estaba puro el cultivo se hicieron diluciones decimales, bajo el siguiente procedimiento: en un tubo con 10 ml de Solución Salina Fisiológica (SSF) se coloca una pequeña asada de la colonia, se agita el tubo en un agitador mecánico y se toma un mililitro (ml) con una pipeta estéril para transferirlo a un tubo con 9 ml de SSF, se vuelve a agitar el tubo, con otra pipeta se vuelve a tomar un ml y se transfiere a un tercer tubo también con 9 ml, esto se repite hasta un quinto tubo (1×10^{-5}), desechando el mililitro tomado del quinto tubo.²⁴

METODOLOGÍA DE IDENTIFICACIÓN.

Las levaduras encontradas se identificaron mediante pruebas bioquímicas y la observación de morfología microscópica y estructural de acuerdo a lo descrito por Barnett, *et al* (1983)²⁰.

A continuación se describen las características de algunos géneros micóticos que se pueden encontrar en la flora intestinal del cerdo.

IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES MICOTICAS DE *Cryptococcus albidus*, *C. curvatus*, *C. laurentii*, *C. neoformans* y *C. uniguttulatum*.

Se han descrito alrededor de 26 especies del género *Cryptococcus*, de las cuales estas 5 se han aislado los animales.²⁰

Se han aislado de piel, membranas mucosas y tracto intestinal de animales sanos y aves.²⁴ Solamente *C. neoformans* es considerada patógena en animales y humanos;^{18,24} tomando importancia clínica en pacientes inmunosuprimidos afectando principalmente el tracto respiratorio y el tejido del sistema nervioso central.^{18,24,25,26}

Morfología colonial en SDA a las 48 horas: brillantes, húmedas, difusas y mucoides. El color al principio es crema y con los días se torna de un color café claro en SDA.²⁷ Todas tienen cápsula. La blastoconidia de *Cryptococcus neoformans* mide de 4 hasta 20 micras.²⁷

Pruebas primarias

1. Tinción negativa.^{27,28}
2. Siembra en medio de Niger (*Guizotia abyssinica*).^{22,26,28}
3. Utilización de nitratos.^{20,28,29}
4. Crecimiento en SDA a 35 °C.^{20,25}
5. Asimilación de carbohidratos.^{20,27,28}

Prueba secundaria.

Sistema API 20 C (bioMérieux).^{19,20,28,30}

IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES MICOTICAS DE *Rhodotorula aurantiaca*,
R. glutinis, *R. minuta* y *R. mucilaginosa*.

Existen 18 especies del género *Rhodotorula* descritas por Barnett, *et al* (1983),²⁰ solamente estas 4 especies se han aislado en los animales.

A este genero se le considera como contaminante. Aunque se le a aislado en tejidos traumatizados,²⁷ en la fase terminal de enfermedades debilitantes²⁴ y en casos de fungemia.²⁷

Las levaduras del genero *Rhodotorula* son ovaladas y pequeñas, tiene cápsula, la morfología macroscópica es mucoide, convexa, lisa, húmeda y de un color rosa o coral pero puede ser naranja, roja o amarilla, son urea positivo y no produce cambio de color en el medio de Níger (*Guizotia abyssinica*).²⁷

Pruebas primarias.

1. Tinción negativa.^{27,28}
2. Urea.^{22,29}
3. Utilización de nitratos.^{20,28,29}
4. Crecimiento en SDA a 35 °C.^{20,25}
5. Asimilación de carbohidratos.^{20,27,28}

Prueba secundaria.

Sistema API 20 C (bioMérieux).^{19,20,28,30}

IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES MICOTICAS DE *Hansenula anomala* y
H. jadinii.

Existen 27 especies del género *Hansenula* descritas por Barnett, *et al* (1983)²⁰ de las cuales solo dos se han encontrado en los animales.

El nombre genérico de *Hansenula* corresponde en algunos los casos a la forma sexual de las especies de *Candida*.²⁰ Comúnmente considerada como saprofita,^{27,28} se ha encontrado como parte de la flora normal de garganta y tracto alimentario en humanos;¹⁸ causando ocasionalmente infecciones en pacientes inmunocomprometidos.²⁷ En animales no se encuentran reportes.

La morfología colonial de esta levadura es lisa, mucoide, convexa, brillante y color crema. Microscópicamente son levaduras ovaladas de 2 a 4 micras y en Czapeck-Dox forma pseudohifas.²⁷ Cuando es cultivada en medio para producción de ascoporas produce de 1 a 4 ascoporas en forma de sombrero.^{20,27}

Pruebas primarias.

1. Tinción negativa.^{27,28}
2. Fermentación de glucosa.^{19,20,29,30}
3. Utilización de nitratos.^{20,28,29}
4. Asimilación de carbohidratos.^{20,27,28}
5. Crecimiento en SDA a 37 y 42 °C.^{20,25}
6. Producción de ascosporas.^{16,20,27}
7. Morfología en Czapeck-Dox + 1 % Tween 80.^{20,27,28}

Prueba secundaria.

Sistema API 20 C (bioMérieux).^{19,20,28,30}

IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES MICOTICAS DE *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. lipolytica*, *C. kefyr*, *C. lusitanae*, *C. silvae*, *C. famata*, *C. pelliculosa*, *C. utilis*, *C. chodatii*, *C. pulcherrima*, *C. valida*, *C. norvegensis*, *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens* y *C. zeylanoides*.

Se les encuentra como flora normal de piel, áreas mucocutaneas y en particular del aparato genital y tracto digestivo de muchas especies animales incluyendo al hombre.^{18,24,26} Solo son consideradas como oportunistas en pacientes inmunocomprometidos.^{18,23,27,28} Sin embargo la especie más importante clínicamente es *C. albicans* ya que es bien reconocida por su importancia en distintas patologías, Ej. mastitis, enfermedades entericas, candidiasis en mucosas oral y genital, vaginitis y metritis, etc^{18,23}

Las especies de *Candida* microscópicamente son ovaladas, redondas o alargadas, la blastoconidia de *Candida albicans* mide de 3 a 8 micras de diámetro, la morfología colonial es color blanca, amarilla o crema, lisas y rugosas, convexas y difusas, brillantes u opacas y mucoides; forma hifas y pseudohifas en Czapeck Dox + 1 % Tween 80 (excepto *C. glabrata*, que solo forma blastoconidias).^{27,28}

Pruebas primarias.

1. Tinción negativa.^{27,28}
2. Fermentación de glucosa.^{19,20,29,30}
3. Utilización de nitratos.^{20,28,29}
4. Crecimiento en SDA a 37 °C y 42 °C.^{20,25}
5. Producción de ascosporas.^{16,20,27}

6. Morfología y formación de clamidoconidias en Czapeck-Dox + 1 % Tween 80.^{20,27,28}
7. Asimilación de carbohidratos.^{20,27,28}
8. Utilización de citrato.^{22,24,29}
9. Crecimiento con ciclohexamida 0.1 %.²⁰
10. Formación de almidón.²⁰

Solo si forma clamidoconidias, se realiza la prueba de formación de tubo germinal.^{26,27,28}

Prueba secundaria.

Sistema API 20 C (bioMérieux).^{19,20,28,30}

IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES MICOTICAS DE *Saccharomyces cerevisiae* y *S. telluris*.

Existen 7 especies del género *Saccharomyces* descritas por Barnett, *et al* (1983),²⁰ de las cuales solo dos se han encontrado en los animales.

No se consideran especies patógenas, más bien son de interés en la industria de la fermentación como la levadura de la cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*).³¹ La morfología colonial es de color blanco a crema, lisas, mucoides, brillantes u opacas y umbilicadas. La blastoconidia de *Saccharomyces cerevisiae* mide de 3 a 9 micras por 5 a 20 micras; en Czapeck-Dox forma blastoconidias pero puede llegar a formar pseudohifas simples y cortas. La característica más importante de *S. cerevisiae* es que en el laboratorio puede formar de 1 a 12 ascoporas redondas u ovals y *S. telluris* de 1 a 4 ascoporas redondas, cuando son sembradas en medios especiales como el agar V-8.^{20,27,28}

Pruebas primarias.

1. Tinción negativa.^{27,28}
2. Fermentación de glucosa.^{19,20,29,30}
3. Utilización de nitratos.^{20,26,29}
4. Asimilación de carbohidratos.^{20,27,28}
5. Crecimiento en SDA a 37 y 42 °C.^{20,25}
6. Producción de ascosporas.^{16,20,27}
7. Morfología en Czapeck-Dox + 1 % Tween 80.^{20,27,28}

Prueba secundaria.

Sistema API 20 C (bioMérieux).^{19,20,28,30}

IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE MICÓTICA DE *Torulaspota globosa*.

Se encuentra en suelo y heces. Morfología colonial: colonias blancas o cremas. Morfología microscópica: levaduras ovaladas. Se reproducen sexualmente formando ascosporas conteniendo de 1 a 2 ascosporas redondas.²⁰

Pruebas primarias.

1. Tinción negativa.^{27,28}
2. Fermentación de glucosa.^{19,20,29,30}
3. Utilización de nitratos.^{20,28,29}
4. Morfología en Czapeck-Dox + 1 % Tween 80.^{20,27,28}
5. Producción de ascosporas.^{16,20,27}
6. Asimilación de carbohidratos.^{20,27,28}
7. Crecimiento en SDA a 42 °C.^{20,25}
8. Crecimiento con ciclohexamida 0.1 %.²⁰

Prueba secundaria.

Sistema API 20 C (bioMérieux).^{19,20,28,30}

Las siguientes especies micóticas también se han reportado en animales, pero no se encontraron como parte de la flora dominante intestinal del lechón: *Debaromyces marama*, *Geotrichum candidum*, *Geotrichum capitatum*, *Pichia farinosa*, *Stephanoascus ciferii*, *Sporobolomyces roseus* y *Trichosporon beigelii*.^{20,27}

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos obtenidos fueron evaluados con el método de razón de verosimilitud para variables categóricas de X^2 (chi cuadrada), (Agresti, 1989)³² con el paquete SPSS (Statistical Package of Social Sciences) Versión 9 para Windows.

RESULTADOS.

Se obtuvieron en primavera y otoño un total de 213 aislados levaduriformes, 81 correspondieron a los grupos uno y 132 a los grupos dos. No se encontraron diferencias entre primavera y otoño por lo que los resultados se evaluaron en conjunto.

Las levaduras dominantes encontradas en el intestino del lechón fueron: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. kefir*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. rugosa*, *C. valida*, *C. zeylanoides*, *Cryptococcus laurentii*, *C. neoformans*, *C. uniguttulatus*, *Hansenula anomala*, *Rhodotorula glutinis*, *R. minuta* y *Torulaspora globosa*. En los grupos dos a los 8 y 25 días, a diferencia de los grupos uno, se encontró en intestino la presencia de *Saccharomyces cerevisiae*, ya que fue inducida al ser administrada en la alimentación de la cerda.

En los 6 lechones de 8 días de edad de los grupos 1 no se aisló ninguna levadura de los segmentos intestinales, mientras que en los grupos 2 se obtuvieron 29 aislados levaduriformes y se encontraron 7 especies micóticas (figura 2) correspondientes a: *Saccharomyces cerevisiae* 19 (65.5 %), *Candida glabrata* 3 (10.3 %), *Candida krusei* 2 (6.9 %), *Candida parapsilosis* 2 (6.9 %), *Candida kefir* 1 (3.4 %), *Candida guilliermondii* 1 (3.4 %) y *Torulaspora globosa* 1 (3.4 %).

A los 25 días de edad en los grupos 1 se identificaron 11 especies de 24 aislados levaduriformes (figura 3) que fueron: *Candida krusei* 5 (20.8 %), *Candida lusitaniae* 5 (20.8 %), *Candida tropicalis* 4 (16.7 %), *Candida parapsilosis* 2 (8.3

%), *Candida zeylanoides* 2 (8.3 %), *Candida guilliermondii* 1 (4.2 %), *Candida kefir* 1 (4.2 %), *Candida valida* 1 (4.2 %), *Cryptococcus uniguttulatus* 1 (4.2 %), *Hansenula anomala* 1 (4.2 %) y *Torulaspora globosa* 1 (4.2 %).

En los grupos 2 se encontraron 12 especies de 34 aislados (figura 3) que fueron: *Candida krusei* 8 (23.5 %), *Saccharomyces cerevisiae* 6 (17.6 %), *Candida guilliermondii* 6 (17.6 %), *Candida lusitanae* 3 (8.8 %), *Rhodotorula glutinis* 3 (8.8 %), *Hansenula anomala* 2 (5.9%), *Candida kefir* 1 (2.9 %), *Candida parapsilosis* 1 (2.9 %), *Candida rugosa* 1 (2.9 %), *Cryptococcus laurentii* 1 (2.9 %), *Rhodotorula minuta* 1 (2.9 %) y *Torulaspora globosa* 1 (2.9 %). Las levaduras que se encontraron a los 8 y 25 días de edad de los grupos 2 fueron: *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida kefir*, *Candida parapsilosis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspora globosa*.

Para el análisis estadístico no se tomaron en cuenta los resultados de ambos grupos de lechones de 40 días, debido al elevado número de *Saccharomyces cerevisiae* que se encontró en los segmentos intestinales, por lo que se sospecha que los cerdos recibieron alimento con probiótico. A continuación se mencionan las levaduras encontradas en los segmentos intestinales de lechones de 40 días. En los grupos uno se obtuvieron 57 aislados levaduriformes, correspondientes a: *Saccharomyces cerevisiae* 38 (66.7 %), *Candida glabrata* 13 (22.8 %), *Rhodotorula minuta* 2 (3.5 %), *Candida kefir* 1 (1.8 %), *Cryptococcus laurentii* 1 (1.8 %), *Cryptococcus neoformans* 1 (1.8 %) y *Hansenula anomala* 1 (1.8 %). En los grupos dos se obtuvieron 69 aislados levaduriformes, correspondientes a: *Saccharomyces cerevisiae* 46 (66.7 %), *Candida kefir* 10 (14.5 %), *Candida albicans* 8 (11.6 %), *Candida glabrata* 1

(1.4 %), *Candida parapsilosis* 1 (1.4 %), *Hansenula anomala* 1 (1.4 %), *Rhodotorula glutinis* 1 (1.4 %) y *Torulaspota globosa* 1 (1.4 %).

De acuerdo a los resultados obtenidos en los lechones de 8 y 25 días, se encontró que la adición del probiótico Sc 47 en la alimentación de la cerda si influye en el número de levaduras que colonizan el tracto intestinal de sus lechones, en comparación de madres que solo recibieron alimento balanceado ($p < 0.05$), pero no influye en la colonización con una mayor variedad de especies micóticas dominantes (doce en total), con respecto a la microflora intestinal de los lechones cuyas madres no recibieron probiótico (once en total).

DISCUSIÓN.

La microflora intestinal de los lechones esta calculada en más de 300 especies microbianas a lo largo del tracto gastrointestinal.⁴ Algunos reportes mencionan la presencia de levaduras del género *Torulopsis* en la mucosa intestinal del ratón⁶ y se han realizados estudios de poblaciones micológicas como parte de la microflora intestinal en palomas.²¹ Sin embargo en animales como el cerdo, las especies levaduriformes que habitan el tracto intestinal han sido prácticamente ignoradas.⁹ En el presente estudio se encontraron las siguientes levaduras que habitan el tracto intestinal como la microflora intestinal dominante del lechón: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida rugosa*, *Candida valida*, *Candida zeylanoides*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus uniguttulatus*, *Hansenula anomala*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta* y *Torulasporea globosa*. Estas levaduras se encuentran como habitantes de la flora normal de mucosas y piel en animales.^{18,24,28,31} En los segmentos intestinales de lechones de 8 y 25 días de los grupos dos se encontró *Saccharomyces cerevisiae*, lo que confirma nuestra hipótesis acerca de la adquisición de la levadura por los lechones a través de las heces u otras secciones de la madre cuando es alimentada con el probiotico Sc 47, mientras que en los lechones de las mismas edades de los grupos uno, no se llevo a cabo el aislamiento de *Saccharomyces cerevisiae*.

Es importante que la colonización del tracto intestinal de bacterias y hongos se inicie a partir del nacimiento, ya que es la primera defensa del organismo en contra de las enfermedades entéricas, de acuerdo a los resultados obtenidos en

el presente estudio, en los lechones de 8 días cuya madre no recibió probiótico, no se encontró crecimiento de ninguna levadura dominante en los lechones de 8 días de los grupos uno, mientras que en los lechones cuya madre recibió probiótico se encontró *Saccharomyces cerevisiae* junto con otras especies micóticas dominantes: *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* y *Torulaspota globosa* por otro lado Williams (1988)¹⁵ y Mendoza (1996)¹⁶ reportan que la ingesta de *Saccharomyces cerevisiae* promueve el crecimiento de ciertos tipos de bacterias, sin embargo no mencionan que promueve el crecimiento de otras levaduras.

El no encontrar *Saccharomyces cerevisiae* en los lechones de 8 y 25 días en los grupos uno, confirma y corrobora lo mencionado por Cuarón (1999),¹² ya que *Saccharomyces cerevisiae* no es habitante normal del tubo digestivo en cerdos.

Los resultados encontrados en los lechones de los grupos dos que de manera indirecta ingirieron *Saccharomyces cerevisiae* por el contacto con las excretas de las madres y otras secreciones, se encontró la presencia de la levadura en los segmentos intestinales de los lechones a las edades que permanecieron con la madre (8 y 25 días de edad). En el estudio realizado por Pirvulescu, *et al* (1996)¹⁰ se encontró que cuando *Saccharomyces cerevisiae* es ingerida de manera directa por lechones, la colonización de la levadura es en todos los segmentos del tracto digestivo a las primeras 24 horas.

Esta reportado por Fuller, *et al* (1978),⁵ Harker (1989)⁷ y Pirvulescu, *et al* (1996)¹⁰ que el estrés que sufren los lechones en sistemas intensivos por el cambio de alimentación y de ambiente da como resultado un incremento en el pH

intestinal por lo que también favorece la proliferación de patógenos. En el experimento los lechones de ambos grupos fueron destetados a los 24 ± 2 días de edad, por lo que a esta edad se presentaron en los lechones estos factores desencadenantes. En el experimento los lechones de 25 días de edad de los grupos uno, las levaduras encontradas forman parte de la microflora del tracto gastrointestinal de muchos animales^{18,24,31} como son las especies de *Candida* (*C. guilliermondii*, *C. kefir*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. valida*, *C. zeylanoides*) y *Cryptococcus uniguttulatus*; *Hansenula anomala* de la cual no se tienen reportes en los animales pero en el hombre forma parte de la microflora del tracto alimentario y *Torulaspora globosa* la cual se encuentra en heces y suelo. A los 25 días de edad de los grupos uno se volvieron a aislar 6 de las 7 especies micóticas encontradas a los 8 días (*Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefir*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* y *Torulaspora globosa*) junto con 6 nuevas especies micóticas (*Candida lusitaniae*, *C. rugosa*, *Cryptococcus laurentii*, *Hansenula anomala*, *Rhodotorula glutinis* y *Rhodotorula minuta*). Las levaduras que se encontraron tanto a los 8 y 25 días de edad podrían ser parte de la microflora residente. Y las que aparecen solo a los 25 días, podría deberse a las condiciones del ambiente que les permitió sobresalir y aislarse como levaduras dominantes.

En los lechones de 25 días de edad de los grupos dos, también las levaduras encontradas forman parte de la microflora intestinal^{18,24,31}, como son las especies de *Candida* (*C. guilliermondii*, *C. kefir*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. rugosa*), *Cryptococcus laurentii*, *Hansenula anomala* y *Torulaspora globosa*; además de *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta*, las

cuales son consideradas como contaminantes y *Saccharomyces cerevisiae* la cual tampoco es patógena.³³ En los grupos 2 se encontró un aumento en el número de aislados y especies micóticas con respecto a lo encontrado a los 8 días de edad, pero una disminución en el número de aislados de *Saccharomyces cerevisiae* con respecto a lo encontrado a los 8 días de edad, esto puede deberse a que los lechones dejaron de estar en contacto con *Saccharomyces cerevisiae* que es eliminado por las excretas de la madre. Al parecer *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* y *Torulaspota globosa* tienen un papel importante como la microflora levaduriforme intestinal en lechones de 25 días de edad, ya que se aislaron como levaduras dominantes en ambos grupos.

Las especies levaduriformes dominantes aisladas en ambos grupos a los 40 días mostraron un número de aislados de *Saccharomyces cerevisiae* muy alto en los grupos uno: 38 de 57 y en los grupos dos: 46 de 69, por lo que se sospecha que los lechones ingirieron probiótico. En los lechones de 40 días de los grupos uno se encontró una levadura que solo se aisló a esta edad: *Cryptococcus neoformans*, esta levadura se le ha aislado del tracto gastrointestinal de aves,²¹ piel y mucosas de otros animales como oportunista^{18,24,33} pero no se le involucra en enfermedades entericas si no más bien en problemas respiratorios o nerviosos.^{18,24} En los lechones de 40 días de los grupos dos se encontró otra levadura que no había sido aislada antes: *Candida albicans*, la cual se encuentra como flora normal en intestino, sin embargo si el animal se encuentra inmunosuprimido por alguna enfermedad y/o esta recibiendo una terapia con antimicrobianos que modifique la población bacteriana puede entonces provocar enfermedades entericas.^{18,24,34}

Se pudo comprobar que la rutina metodología diseñada cumplió con su fin, ya que se pudieron identificar 213 (97 %) aislados micóticos de 219. Al comparar los resultados obtenidos con el sistema API 20 C (bioMérieux), el cual se tiene reportado³⁴ que identifica correctamente las levaduras desde un 77 % hasta un 98% por medio de la asimilación de carbohidratos, coincidieron 154 (70 %) aislados micóticos de 219, encontrándose identificaciones finales que otorga el API 20 C de muy buena a excelente (estas categorías se basan en frecuencias estimadas de ocurrencia). Los aislados que no coincidieron con la identificación de nuestra metodología y el API 20 C fueron 43 (20 %), en estos aislados se encontraron 2 tipos de levaduras, un tipo de levaduras que al realizarles las pruebas que indica el sistema API 20 C para correlacionar su identificación final, se comprobó que no correspondía con las características de la especie identificada con el API 20 C, se le dio más importancia a los resultados de las pruebas complementarias realizadas para obtener su identificación. El otro tipo de levaduras, al cual pertenecían la mayoría de las levaduras que eran identificadas de manera diferente con el API 20 C, correspondía a dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, las características de las cepas son las siguientes:

Cepa 1. Morfología microscópica.- Ovaladas

Czapeck Dox con 1 % de Tween 80.- Pseudohifas simples largas.

Morfología colonial.- Blanca, mucoide, lisa, umbilicada y opaca.

Cepa 2. Morfología microscópica.- Redondas y ovaladas

En Czapeck Dox con 1 % de Tween 80.- Blastoconidias y/o pseudohifas simples cortas.

Morfología colonial.- Crema, mucoide, lisa, umbilicada y brillante.

Con la metodología propuesta correspondía a *Candida kefyr* ya que al realizar la prueba de crecimiento con ciclohexamida al 0.1 % se encontraba poco crecimiento y al sembrarlas en Czapeck-Dox + 1 % de Tween 80 para observar su morfología microscópica las levaduras forman pseudohifas, sin embargo la identificación final con el sistema API 20 C era excelente y muy buena, finalmente se tomo la identificación del sistema API 20 C.

Los aislados que no identifico el sistema API 20 C (bioMérieux) fueron 22 (10 %), en estas levaduras la clave de 7 dígitos obtenida a las 72 horas no correspondió con ninguna de las claves del manual del sistema API 20 C, por lo que también se le dio más importancia a los resultados de las pruebas para su identificación.

En la metodología diseñada para identificar las especies micóticas se tomo en cuenta algunos factores como son la variabilidad de reproducción sexual, la variabilidad de asimilación de carbohidratos, el tiempo de incubación, la elaboración de medios y pruebas, ya que para la correcta identificación la levadura debe de cumplir con todas las características enzimáticas y morfológicas. Algunas desventajas de esta metodología son: utilizar pruebas bioquímicas ya que pueden ser variables, es decir pueden ser positivas o negativas, así como el tiempo de lectura que tienen que esperar pruebas como producción de ascosporas y reproducción asexual en Czapeck-Dox + 1 % de Tween 80. La ventaja es que se tiene una mayor variedad de pruebas (bioquímicas y morfología microscópica y estructural) para comparar las características de las levaduras.

La microflora intestinal es muy compleja por lo que se necesitan emplear pruebas más específicas, como por ejemplo herramientas moleculares que nos ayuden a conocer las poblaciones microbianas que constituyen la microflora intestinal y la relación hospedero-huésped ya que de esta manera se pueden tener bases científicas para utilizar las bondades de los probióticos en la alimentación de cerdos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio resultaron ser muy alentadores, ya que permitió conocer las levaduras dominantes que forman parte de la microflora intestinal del lechón, cuyo conocimiento no había sido estudiado antes, también permitió el diseño de una metodología para la identificación de levaduras, la corroboración de los conceptos de otros investigadores y su discusión, por ejemplo que *Saccharomyces cerevisiae* puede ser adquirido de manera indirecta por el contacto con las excretas y otras secreciones de la madre, además de que *Saccharomyces cerevisiae* no forma parte de la microflora levaduriforme normal del lechón. Asimismo el presente trabajo nos ofreció un mejor panorama para que en un futuro se continúen realizando estudios sobre la microflora intestinal.

LITERATURA CITADA.

1. Pluske, R.J., Hampson, J.D. and Williams, H.I.: Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livest. Prod. Sci.*, 51: 215-236 (1997).
2. Lee, J. (2000) "Probiotics For Swine Production" Abstract, Animal Science Graduate Seminar. <http://animsci.agrenv.mcgill.ca/courses/gradsem/W00/W00-8/Seminar8.html>
3. Hillman, K. (1999) "Manipulation of the intestinal microflora for improved health and growth in pigs" <http://www.pighealth.com/News99/GROWTH2.HTM>
4. Waaij van der, D. (2000). "The Normal (Physiologic) Microflora of the Digestive Tract" <http://www.isgnas.org>
5. Fuller, R., Barrow, P.A. and Brooker, B.E.: Bacteria associated with the gastric epithelium of neonatal pigs. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35: 582-591 (1978).
6. Ewing, W.N., and Cole, D.J.A.: *The Living Gut*. Ed. Context, First Published, Ireland, 1994.
7. Harker, J.A.: Improving Pig Performance While Satisfying Consumer Requirements: A Role For Yeast Culture and Probiotics. In: *Biotechnology in the Feed Industry*. Proceedings of Alltech's. Edited by: Lyons, P.T., Fifth Annual Symposium, All Tech Technical Publications, 1989, p.p. 138-147.
8. Waaij van der, D. (2001) "Colonization resistance (CR) of the digestive tract" <http://www.isgnas.org>
9. Tannock, W.G..A fresh look at the intestinal microflora. In *Probiotics: A Critical Review*. Horizon Scientific Press, U.K., 1999, p.p. 5-14.

10. Pirvulescu, M., Panta, L., Bucur, E., Ionita, C., Tetu-Oporanu, M., Gruia, M., Caraivan I and Ionescu, C.: Probiotic microorganisms for young pigs: Testing and characterization under gnotobiotic conditions. *Stud. Res. Vet. Med.*, 4: 98-108 (1996).
11. Fuller, R.: Modulation of the Intestinal Microflora by Probiotics. 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. 33-41.
12. Cuarón, I.J.A.: La influencia de la levadura en la dieta, respuesta microbiológica antagonista. 3er. Seminario de microbiología aplicada a nutrición animal. Mérida, Yucatán. Noviembre, 1999.
13. Casarín, A. y Forat, M: Resultados de pruebas con el uso de levaduras en dietas para cerdos. 2do. Seminario Microbiología aplicada a nutrición animal. México, D.F., 1998.
14. Chapman, D.J.: Probiotics, Acidifiers and Yeast Culture: A Place for Natural Additives in Pig and Poultry Production. In: Biotechnology in the Feed Industry: Proceedings of Alltech's. Edited by: Lyons, P.T., Fourth Annual Symposium, All Tech Technical Publications, 1988, p.p. 219-233.
15. Williams, V.P.E.: Understanding the Biochemical Mode of Action of Yeast Culture. In: Biotechnology in the Feed Industry: Proceedings of Alltech's. Edited by: Lyons, P.T., Fourth Annual Symposium, All Tech Technical Publications, 1988. p.p. 79-99.
16. Mendoza, R.V.: Efecto de microorganismos ruminales bajo condiciones de anaerobiosis y aerobiosis sobre la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* in

- vitro*. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1996.
17. Fuller, R.: Probiotics for farm animals. In: Probiotics: A Critical review. Horizon Scientific Press, U.K., 1999, p.p. 15-22.
 18. Carter, R.G. and Chengappa, M.M.: Bacteriología y Micología Veterinarias, Editorial Manual Moderno, segunda edición, 1994.
 19. Spencer T.J.F. and Spencer, M.D.: 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.
 20. Barnett, A.J., Payne, W.R. and Yarrow, D.: Yeast: Characteristics and Identification, First Published, Cambridge University Press, Great Britain, 1983.
 21. Martins, H.M.L., Bernardo, A.F.M., and Martins, M.L.L.: Yeast in pigeon fecal droppings in Lisbon – Portugal, 1994. Braz., *J. vet. Res. anim. Sci.*, Sao Paulo, 34: 259-260 (1997).
 22. Manual de prácticas de laboratorio de bacteriología y micología veterinarias. Departamento de Microbiología e inmunología. FMVZ – UNAM, 1997.
 23. Spencer, T.J.F. and Spencer, M.D.: Maintenance and Culture of Yeasts. In: Yeast Protocols, Methods in Molecular Biology Vol. 53. Edited by: Evans, H.I., Human Press, New Jersey, 1996, p.p. 1-5
 24. Quinn, J.P., Carter, E.M., Markey, B. and Carter R.G.: Clinical Veterinary Microbiology, Wolfe Publishing, 1994.
 25. Fisher, F. and Cook, B.N.: Fundamentals of Diagnostic Mycology, W.B. Saunders Company, United States of America, 1998.

26. Segundo, Z.C.: Manual teórico-práctico de micología médica para la carrera de Q.F.B. (Prácticas alternativas). Tesis de licenciatura Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlan Izcalli, Edo. de México, 1991.
27. Larone, H.D.: *Medically Important Fungi. A guide to identification*, ASM Press, third edition, U.S.A., 1995.
28. Campbell, C.M. and Stewart, L.J.: *The Medical Mycology Handbook*, John Wiley and Sons, U.S.A., 1980.
29. Barrow, G.I. and Feltham, R.K.A.: *Cowan and Steel's Manual for the identification of medical Bacteria*, Third edition, Cambridge University Press, 1995.
30. Rohm, H. and Lechner, F.: Evaluation and Reliability of a Simplified Method for Identification of Food-Borne Yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 1290-1295 (1990)
31. Vanbreuseghem, R.: The Levuroses. In: *Mycoses of man and animals*. J. Wilkinson, First English edition, 1958, p.p. 166-195.
32. Agresti, A.: *Analysis of Ordinal Categorical Data*, John Wiley and sons. Univ. Florida, 1989.
33. 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. 33-41.

34. Freydiere, A.M., Guinet, R. and Boiron, P.: Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical metods. *Medical Mycology.*, 39: 9-33 (2001).

Cuadro 1
DIETA, 6-AJ CERDAS GESTACIÓN Y SEMENTALES (2.875 Mcal DE EM / Kg Y
11.7 % DE PROTEÍNA DIGESTIBLE), ELABORADA EN EL CENID-FISIO
(INIFAP) AJUCHITLÁN QRO. PARA LA ALIMENTACIÓN DE CERDAS EN
GESTACIÓN Y SEMENTALES.

Ingredientes	Peso en Kg
Grano de sorgo	568.100
Salvado de Maíz	133.000
Heno de alfalfa	100.000
Pasta de canola	95.000
Pasta de soya	60.000
Sebo	12.000
Fósforo	16.000
Carbonato de calcio	5.800
Sal	4.000
Vitaminas, pmx. U-058	3.900
Vitaminas, pmx. U-059	1.600
Minerales, pmx. U-060	0.600

Formulada por el Dr. José Cuaron I.

Cuadro 2
DIETA, 7-AJ' CERDAS LACTACIÓN (3.302 Mcal DE EM / Kg Y 16.1 % DE
PROTEINA DIGESTIBLE), ELABORADA EN EL CENID-FISIO (INIFAP)
AJUCHITLÁN QRO. PARA LA ALIMENTACIÓN DE CERDAS EN LACTACIÓN

Ingredientes	Peso en Kg
Grano de sorgo	436.860
Pasta de soya	184.000
Pasta de canola	100.000
Azúcar	100.000
Melaza	80.000
Sebo	60.000
L-Lisina	2.100
L-Treonina	0.980
DL-Metionina	0.260
Fósforo	18.300
Carbonato de calcio	7.700
Sal	4.000
Vitaminas, pmx. U-059	2.000
Vitaminas, pmx. U-058	3.000
Minerales, pmx. U-060	0.800

Formulada por el Dr. José Cuaron I.

Cuadro 3
DIETA, 1-AJ CERDOS INICIACIÓN (3.500 Mcal / Kg DE EM Y 16.8 % DE
PROTEÍNA DIGESTIBLE), ELABORADA EN EL CENID-FISIO (INIFAP)
AJUCHITLÁN QRO. PARA LA ALIMENTACIÓN DE CERDOS EN INICIACIÓN
(PRIMERA SEMANA POSDESTETE)

Ingredientes	Peso en Kg
Maíz amarillo	440.880
Suero de leche	240.000
Pasta de soya	100.000
Aceite de soya	52.000
Lactosa	45.000
Soya	42.600
Plasma	40.000
L-Lisina	2.250
Tryptofano	2.110
DL-Metionina	1.930
L-Treonina	1.130
Fósforo	10.200
Carbonato de calcio	9.700
Oxido de zinc	4.000
Sal	3.800
Vitaminas, pmx. U-059	2.000
Vitaminas, pmx. U-060	1.200
Minerales, pmx. U-060	1.200

Formulado por el Dr. José Cuaron I.

Cuadro 4
DIETA, 2-AJ CERDOS DESTETE (3.301 Mcal / Kg DE EM Y 15.7 % DE
PROTEÍNA DIGESTIBLE), ELABORADA EN EL CENID-FISIO (INIFAP)
AJUCHITLÁN QRO. PARA LA ALIMENTACIÓN DE CERDOS DESTETADOS
(8 A 14 DÍAS POSDESTETE)

Ingredientes	Peso en Kg
Grano de sorgo	283.400
Maíz amarillo	280.000
Pasta de soya	200.000
Suero de leche	136.000
Sebo	34.000
Soya	27.000
L-Lisina	3.400
Triptofano	2.600
DL-Metionina	2.000
L-Treonina	2.400
Fósforo	12.500
Carbonato de calcio	9.500
Sal	3.800
Vitaminas, pmx. U-059	2.000
Minerales, pmx. U-060	1.000
Vitaminas, pmx. U-058	0.400

Formulado por el Dr. José Cuaron I.

Cuadro 5
DIETA, 3-AJ CERDOS DESTETE (3.304 Mcal / Kg DE EM Y 16.5 % DE
PROTEÍNA DIGESTIBLE), ELABORADA EN EL CENID-FISIO (INIFAP)
AJUCHITLÁN QRO. PARA LA ALIMENTACIÓN DE CERDOS DESTETADOS
(15 A 35 DÍAS POSDESTETE)

Ingredientes	Peso en Kg
Grano de sorgo	394.580
Pasta de soya	329.000
Maíz amarillo	200.000
Sebo	40.000
L-Lisina	3.400
L-Treonina	2.020
DL-Metionina	1.200
Fósforo	12.300
Carbonato de calcio	10.600
Sal	3.600
Vitaminas, pmx. U-059	2.000
Vitaminas, pmx. U-058	0.400
Minerales, pmx. U-060	0.900

Formulado por el Dr. José Cuaron I.

Cuadro 6
DESCRIPCIÓN DE LA MORFOLOGÍA COLONIAL DE LEVADURAS Y BACTERIAS

Color	Blanca, crema, amarilla, rosa o roja.
Superficie	Lisas o rugosas.
Opacidad	Brillante, opaca y traslúcida.
Estructura interna	Mucoide, granular y filamentosas.
Elevación	Umbilicadas, difusas, convexas y planas.

Tomado del Manual de practicas de laboratorio de Bacteriología y Micología Veterinarias²²

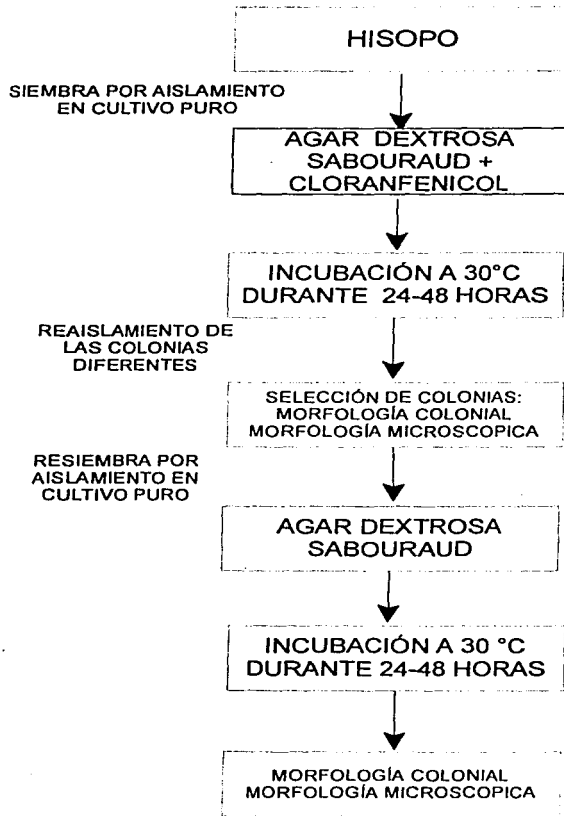


Figura 1. Esquema de la metodología utilizada para el aislamiento de colonias levaduriformes provenientes del tracto intestinal del lechón¹⁹

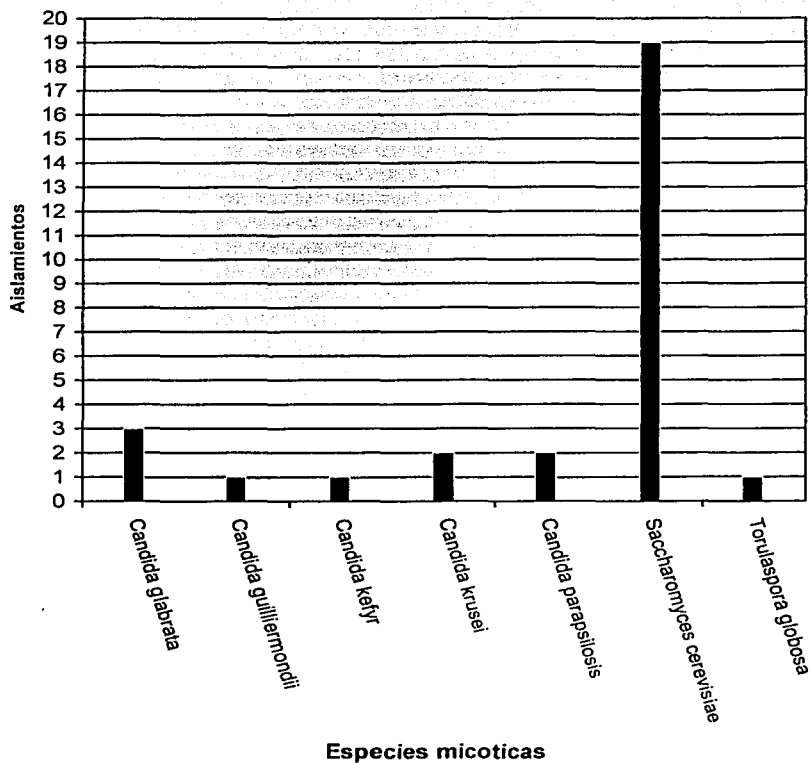


Figura 2. 7 especies micóticas de 29 aislados del tracto intestinal de lechones de 8 días de edad cuyas madres se les adiciono probiotico (grupo dos)

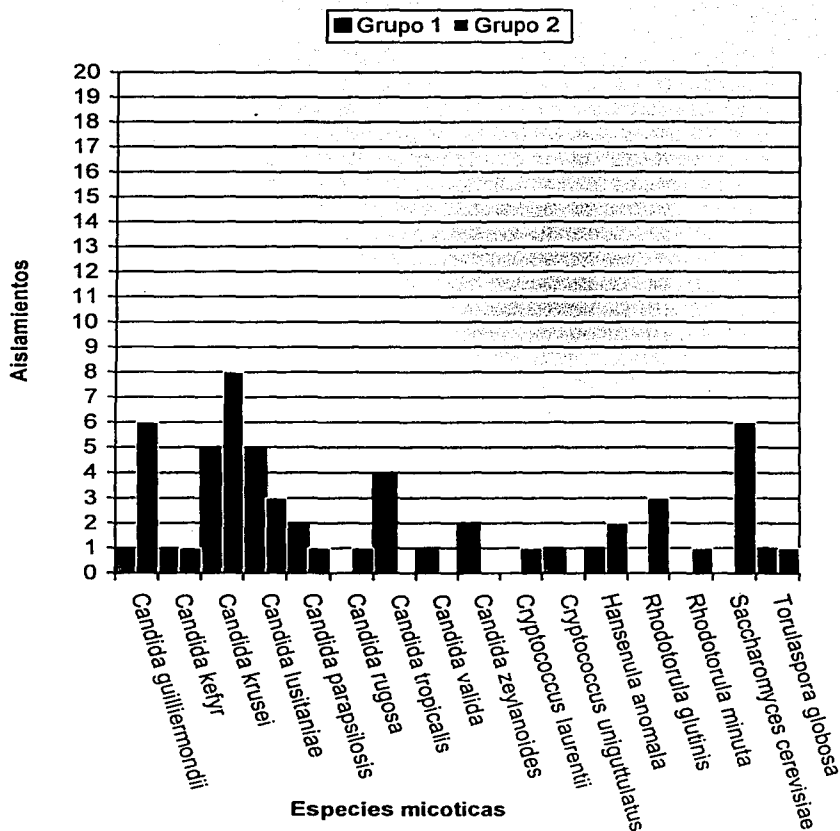


Figura 3. Comparación de 11 especies micóticas de 24 aislados del tracto intestinal de lechones de 25 días de edad cuya madre recibió alimento balanceado (grupo uno) y 12 especies micóticas de 34 aislados del tracto intestinal de lechones a la misma edad, cuya madre se le adiciono en su alimentación probiotico (grupo dos)

APÉNDICE A. PROCEDIMIENTOS DE PRUEBAS Y TINCIONES EMPLEADAS EN LA METODOLOGÍA PARA IDENTIFICAR LEVADURAS ENCONTRADAS EN ANIMALES.

1. Tinción de Gram.

La finalidad de esta tinción es para observar la morfología microscópica y afinidad tintorial que tienen las levaduras.²⁷

- 1.- En un portaobjetos limpio, marcar con un crayón un círculo.
- 2.- Colocar una gota de agua destilada dentro del círculo.
- 3.- Flamear una asa bacteriológica, enfriar en el agar, tomar una asada pequeña de la colonia y expandirla en la gota de agua destilada.
- 4.- Dejar que seque la laminilla y fijar a la flama.
- 5.- Cubrir el frotis con solución de cristal violeta, dejar en contacto durante 20 segundos.
- 6.- Lavar con agua corriente
- 7.- Cubrir el frotis con lodo, dejar durante 20 segundos.
- 8.- Lavar con agua corriente.
- 9.- Decolorar con 1 gota de Alcohol acetona, e inmediatamente lavar con agua corriente.
- 10.- Contrastar con la solución de fucsina básica o safranina, durante 10 segundos.
- 11.- Lavar con agua corriente.
- 12.- Secar entre hojas de papel absorbente y agregar 1 gota de aceite de inmersión.

13.- Observar al microscopio con objetivo de inmersión (100 x).²⁷

2. Tinción negativa (Tinta china).

Nos sirve para la observación de cápsula de los géneros *Cryptococcus* y *Rhodotorula*. La cual se observa por la apariencia de un halo bien demarcado y claro que rodea la levadura.^{27,28} El grosor de la cápsula de *Cryptococcus* es de 1 a 2 micras pero puede medir hasta 4 micras.²⁸

1.- Agitar el frasco de tinta china.

2.- Depositar una gota sobre un portaobjetos limpio.

3.- Flamear una asa bacteriológica, enfriar en el agar, tomar una asada pequeña de la colonia y expandirla en la gota de tinta china.

4.- Cubrir la tinta con un cubreobjetos deslizándolo poco a poco con ayuda de una aguja biselada, para evitar la formación de burbujas.

5.- Observar al microscopio con el objetivo de 10 x para enfocar y después con el de 40 x para ver con más detalle la presencia de cápsula.^{27,28}

3. Utilización de nitratos.

Es la utilización de una fuente de nitrógeno por un microorganismo en la presencia de oxígeno.^{20,28}

1.- Flamear una asa bacteriológica, enfriar en el agar y tomar una asada de una colonia que tenga 24 hrs. de incubación.

2.- Agitar el asa en un tubo con 5 ml de SSF al 0.85 %, después agitar el tubo en un agitador mecánico.

3.- Comparar la turbidez con el 0.5 de McFarland.

4.- Tomar 0.5 ml de esta suspensión con una pipeta serológica de un ml y adicinarla al tubo con caldo nitrato.

5.- Lectura cuando la turbidez sea aparente (7-14 días), incubación a 30 °C^{19,20,28,29}

Lectura.

Positivo (reducción de nitratos): Cambio de color amarillo a rojo.

En caso de que no haya cambio de color se realiza lo siguiente:

1.- Agregar 3 gotas de Nitratos A y agitar.

2.- Agregar 3 gotas de Nitratos B y agitar.

Positivo: Cambio de color a rojo.

Si permanece sin cambio de color, adicionar una asada de Zinc en polvo y agitar.

Positivo (reducción de nitratos): sin cambio de color.

Negativo (falta de reducción de nitratos): cambio de color a rojo.^{27,29}

4. Fermentación de glucosa.

Existen características que comparten los géneros levaduriformes y que también las diferencian; una muy importante es la de utilizar la glucosa en un ambiente carente de oxígeno para determinar si la levadura es capaz de fermentar.^{19,20,29,30}

Para esta prueba se usó base caldo rojo de fenol, 0.1 % de glucosa y tubo de Durham.

1.- Flamear una asa bacteriológica, enfriar en el agar y tomar una asada de una colonia que tenga 24 hrs. de incubación.

2.- Agitar el asa en un tubo con 5 ml de SSF al 0.85 %.

4.- Agitar el tubo en un agitador mecánico.

5.- Comparar la turbidez con el 0.5 de McFarland.

6.- Tomar 0.5 ml de esta suspensión con una pipeta serológica de un ml y adicionarla al tubo con carbohidrato.

7.- Incubación a 30 ° C y lectura a partir de las 24 hrs. hasta las 72 horas.^{19,20,27,28}

Lectura.

Positivo (utilización de glucosa en ausencia de oxígeno): cambio a un color amarillo y acumulación de gas en el tubo de Durham.

Negativo (falta de utilización de glucosa en ausencia de oxígeno): permanece del mismo color o cambio a un color amarillo pero sin la acumulación de gas en el tubo de Durham.^{27,28}

5. Crecimiento a diferentes temperaturas 35 °C, 37°C y 42 °C.

El crecimiento de las levaduras a diferentes temperaturas es posible solo en ciertas levaduras ya que no todas tienen la capacidad de crecer a 35 °C, 37°C y 42 °C.²⁰

1.- Flamear una asa bacteriológica, enfriar en el agar y tomar una asada de una colonia de 24 hrs. de incubación.

2.- Sembrar en SDA por el método de aislamiento en cultivo puro.

3.- Incubar en la estufa a 35 °C, lectura a las 24, 48 y 72 horas.

Repetir el mismo procedimiento para incubar a 37 ° C y 42°C.^{20,25}

Lectura.

Positivo: crecimiento.

Negativo: ausencia de crecimiento.

Variable: crecimiento lento y escaso.²⁰

6. Asimilación de carbohidratos.

Esta prueba nos sirve para determinar la actividad enzimática de las levaduras al utilizar como sustrato un carbohidrato. Los glúcidos utilizados fueron los siguientes: maltosa, sacarosa, galactosa, celobiosa, trehalosa y en algunos casos rhamnosa, D-arabinosa y xilosa.²⁰

Usando base caldo rojo de fenol y 0.1 % de carbohidrato.

- 1.- Flamear una asa bacteriológica, enfriar en el agar y tomar una asada de una colonia que tenga 24 hrs. de incubación.
- 2.- Agitar el asa en un tubo con 5 ml de SSF al 0.85 %.
- 3.- Agitar el tubo en un agitador mecánico.
- 4.- Comparar la turbidez con el 0.5 de McFarland.
- 5.- Tomar 0.5 ml de esta suspensión con una pipeta serológica de un ml y adicionarla a cada tubo con carbohidrato.
- 6.- Incubación a 30 ° C y lectura a partir de las 24 horas hasta los 7 días.^{20,27,28}

Lectura.

Positivo (utilización del carbohidrato en presencia de oxígeno): cambio de color a amarillo.

Negativo (utilización del carbohidrato en presencia de oxígeno): sin cambio de color.

Variable: el color no llega a ser amarillo, se queda en una tonalidad clara del naranja.^{20,27,29}

7. Morfología en Czapeck-Dox + 1 % Tween 80.

Esta prueba nos sirve para favorecer la reproducción asexual de las levaduras en el laboratorio, incluyendo la formación de clamidoconidias de *C. albicans*.

La forma básica de reproducción de las levaduras es por gemación es decir formando blastoconidias, sin embargo existen ciertos géneros levaduriformes que tienen la característica de ramificarse produciendo filamentos septados que se extienden arborizando el medio y que por su grado de organización se conocen como hifas verdaderas, otras lo intentan elongando sus estructuras generando pseudohifas que por su complejidad pueden ser simples o elaboradas.^{27,28}

La formación de clamidoconidas es la capacidad de *C. albicans* de formar esporas esféricas de doble pared y de gran tamaño, es producida por la modificación de una célula hifal preexistente; es considerada de reproducción asexual y de resistencia.^{27,28}

1.- Flamear una asa en "L", enfriar en el medio y tomar una asada de una colonia de 24 hrs. de incubación.

2.- Sembrar por el método de rasgadura: hundir el asa en el agar de un extremo de la caja, girar el asa 180 ° y rasgar en forma horizontal, hasta llegar al extremo opuesto, en donde se regresa a su posición original y se saca el asa del agar.

3.- Lectura a partir de las 72 horas de incubación (30 °C) hasta los 10 días.^{20,27,28}

Lectura.

Blastoconidias: únicamente observación de levaduras ovaladas o redondas.

Pseudohifas simples: unión de levaduras formando cadenas cortas.

Pseudohifas elaboradas: formación de cadenas largas, incluyendo pequeñas ramificaciones.

Hifas: formación de filamentos septados con ramificaciones.^{20,27,28}

8. Producción de ascosporas.

Usando un medio especial se puede inducir el estadio sexual de algunas levaduras en el laboratorio, las que pertenecen a la clase *ascomycota*, se reproducen convirtiéndose en asca y contienen en su interior células diploides llamadas ascosporas. El número de ascosporas así como la forma de estas varía dependiendo el género; desde 1 hasta 12 ascosporas y una variedad de formas como por ejemplo: redondas, ovales, de riñón, de sombrero, etc.²⁰

Se usó como medio de esporulación Agar jugo de vegetales (Agar jugo V8).

- 1.- Flamear una asa bacteriológica, enfriar en el agar y tomar una asada de una colonia de 24 hrs. de incubación.
- 2.- Sembrar por el método de estría continua sobre la superficie del agar.
- 3.- Lectura a partir de las 72 horas de incubación (30 ° C) hasta 6 semanas, una vez por semana después de los primeros 7 días^{16,20,27}

Lectura.

Mediante la preparación húmeda de gota suspendida.

- 1.- En un cubreobjetos poner en cada esquina una bolita de plastilina.
- 2.- Poner una gota de agua destilada en el centro, tomar una pequeña asada de la colonia y depositarla en la gota de agua.
- 3.- Colocar el portaobjetos encima del cubreobjetos y presionar para que se adhieran ambos.

4.- Observar al microscopio con el objetivo de 10 x y luego con el de 40 x.^{25,27}

Positivo: observación de las ascoporas.

Negativo: no encontrar ascoporas en un plazo de 6 semanas.²⁰

9. Formación de almidón.

El almidón es producido en la pared celular de algunas levaduras cuando asimilan o fermentan carbohidratos.²⁰

Lectura.

Positivo: al agregar una gota de sol. de Lugol cambia a un color azul, púrpura o verde.

Negativo: el cambio de color es a un café oscuro.²⁰

Nota. Para esta prueba siempre se utilizo el tubo fermentado de glucosa, se considero positivo cuando permanecía amarillo o ligeramente verde; y negativo cuando al adicionar la gota de Lugol el liquido tomaba inmediatamente el color ocre del Lugol.

10. Crecimiento en presencia de ciclohexamida al 0.1 %.

La ciclohexamida detiene el crecimiento de las células eucarióticas, mediante la inhibición en la síntesis de proteínas de la parte 80S ribosomal. Las levaduras, que son resistentes a la ciclohexamida, pueden modificar los ribosomas y no ser afectados por el antibiótico.²⁰

Se usó base de nitrógeno para levadura con 0.5 % de glucosa y 0.1 % de ciclohexamida.

- 1.- Flamear una asa bacteriológica, enfriar en el agar y tomar una asada de una colonia que tenga 24 hrs. de incubación.
- 2.- Agitar el asa en un tubo con 5 ml de SSF al 0.85 %.
- 3.- Agitar el tubo en un agitador mecánico.
- 4.- Comparar la turbidez con el 0.5 de McFarland.
- 5.- Tomar 0.5 ml de esta suspensión con una pipeta serológica de un ml y adicionarla al tubo.
- 6.- Incubación a 30 ° C y lectura a partir de las 24 horas hasta los 7 días.²⁰

Lectura:

Positivo (resistente a la ciclohexamida): turbidez que indica crecimiento.

Negativo (no resistente a la ciclohexamida): sin turbidez que nos indica ausencia de crecimiento.²⁰

11. Citrato.

Es la habilidad que tiene algunas levaduras al utilizar compuestos orgánicos como fuente de carbono.^{24,29}

Se utilizó el medio diferencial Citrato de Simmon's.²⁴

1. Flamear una asa bacteriológica, enfriar en el agar y tomar una asada de la colonia.
2. Sembrar por estría.
3. Incubar a 30 °C y leer a partir de las 24 horas hasta los 7 días.^{22,29}

Lectura:

Positivo (utilización del sustrato): cambio del medio a color azul.

Negativo (no utilización del sustrato): el medio permanece verde.^{22,29}

12. Sistema API 20 C (bioMérieux).

Se utilizó este metodo de referencia^{19,20,28,30} para comprobar la especie micótica obtenida utilizando la metodología diseñada para la identificación de levaduras aisladas en los animales.

Se siguieron las instrucciones del fabricante.

1. Estabilizar a temperatura ambiente el reactivo C y la placa, aproximadamente 1 hora antes de utilizarlo.
2. Llenar con agua destilada los pozos de la base de plástico e identificar la lengüeta lateral.
3. Romper la punta del frasco del reactivo C, ejerciendo presión sobre la punta con el dedo pulgar.
4. Flamear una asa bacteriológica, enfriar en el agar y tomar una asada de una colonia que tenga 24 hrs. de incubación.
5. Agitar el asa en el reactivo C.
6. Agitar el tubo en un agitador mecánico.
7. Comparar la turbidez con el 0.5 de McFarland.
8. Abrir por un extremo la envoltura de la placa y depositarla sobre la base de plástico.
9. Con ayuda de una pipeta Pasteur y una perilla de succión tomar parte de esta suspensión y depositar 7 gotas en cada pozo, evitando la formación de burbujas dentro del pozo.
10. Cubrir con la tapa de plástico e incubar a 30 °C.
11. Lectura a las 24, 48 y 72 horas, comparando la turbidez de los pozos con la del control positivo (Glucosa).

Otras pruebas que solo se realizan en algunas especies de levaduras.

Siembra en medio de Níger (*Guizotia abyssinica*).

Medio diferencial para la identificación de *Cryptococcus neoformans* entre las otras especies de *Cryptococcus* y otras levaduras, ya que tiene la característica de que al sembrarla en el medio de Níger (*Guizotia abyssinica*) por la presencia de la enzima fenoloxidasa que produce la levadura, reduce el ácido cafeínico a melanina observando el desarrollo de colonias café oscuras o negras.²⁸

- 1.- Flamear una asa bacteriológica, enfriar en el agar y tomar una asada de una colonia que tenga 24 hrs. de incubación.
- 2.- Sembrar por el método de aislamiento en cultivo puro.
- 3.- Incubar a 37 °C, durante 48-72 hrs.^{22,26,28}

Interpretación de resultados.

Las colonias cambian a un color oscuro: *Cryptococcus neoformans*

Las colonias son cremas o beiges o no hay crecimiento: Otras especies levaduriformes.^{22,26,28}

Formación de tubo germinal.

Para la identificación de *Candida albicans*, ya que produce un filamento hifal corto lateral que da origen al tubo germinativo, cuando son incubadas en suero o líquido amniótico a 37 °C. Esta hifa (tubo germinal) es el inicio de la formación de la hifa verdadera.^{27,28}

- 1.- Descongelar un tubo de líquido amniótico o suero (de equino o bovino).

2.- Colocarlo en la estufa a 37 °C., durante 15 minutos, para igualar la temperatura a la ambiental.

3.- Se flamea una asa bacteriológica, se enfría en el agar y se toma una asada de una colonia que tenga 24 horas de incubación, para depositarla en el tubo con líquido amniótico o suero y se agita en un agitador mecánico. Se deja en la estufa a 37 ° C y se saca a las 2 horas.

4.- Se coloca una gota de líquido o suero, sobre un portaobjetos limpio, y se le pone un cubreobjetos teniendo cuidado de no formar burbujas.

5.- Se observa al microscopio con objetivo de 40 x.^{26,27,28}

Lectura.

Positivo: *C. albicans*, producen este tubo a las 2 horas de haber sido incubada.

Negativo: Si no se observan estos filamentos, se deja una hora más a 37 ° C, si después de este tiempo no se observan los filamentos es que no es *Candida albicans*.^{26,27,28}

PROCEDIMIENTOS PARA CONSERVACIÓN DE CEPAS.

Una vez identificado cada aislado micótico se sembró cada uno en un tubo inclinado con SDA para conservar a 2-4 °C, se inoculo por triplicado en glicerol y agua para conservar a -20 °C y en leche descremada al 30 % para conservar a -170 °C.²³

Tubos inclinados con SDA.

1. Tomar una asada de una colonia con 24 horas de crecimiento.
2. Sembrar por estría continua sobre la superficie del agar.
3. Identificar el tubo, sellarlo con Parafilm y colocarlos en el refrigerador (2-4 °C).²³

Glicerol y agua (1:1).

1. Cerca del mechero depositar una asada grande de colonias con 24 horas de crecimiento en 3 tubos Ependorf.
2. Identificar los crioviales y colocarlos en el refrigerador (2-4 °C) para bajar la temperatura gradualmente y luego en congelación a (-20°C).^{23,27}

Leche descremada al 30 %

1. Tomar una asada grande de colonias con 24 horas de crecimiento y depositar la asada en el tubo con leche.
2. Disolver la levadura depositada, colocando el tubo en un agitador marca Vortéx.
3. En 3 crioviales depositar 1 ml de leche en cada uno.
4. Identificar los crioviales y colocarlos en el refrigerador (2-4 °C) para bajar la temperatura gradualmente, luego en congelación a (-20°C) y finalmente en nitrógeno líquido (-170 °C).^{23,27}

APÉNDICE B. ELABORACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO, PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y REPRODUCTIVAS UTILIZADAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS.

Agar Dextrosa Sabouraud.

Formula:

Agar bacteriológico (Bioxon).....	15 g.
Peptona de carne (Bioxon).....	10 g.
Dextrosa (J.T.Baker).....	40 g.
Agua destilada	1000 ml

1. Medir el volumen de agua requerida en una probeta y vaciarla a un matraz de vidrio.
2. Pesar los gramos correspondientes de cada ingrediente y agregarlos al matraz de vidrio.
3. Calentar con agitación constante hasta el punto de ebullición durante un minuto, y retirarlo de la flama.
4. Cerrar la boca del matraz con un tapón de algodón y gasa, proteger el tapón con un sombrero hecho de papel y pegarle un trozo de cinta testigo.
5. Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 libras y 15 minutos.
6. Sacar el matraz del autoclave y dejar que se enfríe un poco a temperatura ambiente (~50 °C).
7. Cerca del mechero depositar aproximadamente 25 ml del medio por cada caja de Petri.^{27,28}

Caldo Nitrato.**Formula.**

Extracto de carne (Bioxon).....	3 g
Peptona bacteriológica (Bioxon).....	5 g
Nitrato de potasio (J.T.Baker).....	1 g
Agua destilada.....	1000 ml

1. Medir el volumen de agua en una probeta y vaciarla a un matraz de vidrio.
2. Pesar los gramos correspondientes de cada ingrediente y agregarlos al matraz de vidrio.
3. Disolver por agitación y depositar 3 ml en tubos de vidrio (13 x 100) con tapón de rosca.
4. Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 libras por 15 minutos.^{27,29}

Urea semisólida de Christensen**Formula.**

1	
Agar bacteriológico (Bioxon).....	15 g
Agua destilada.....	900 ml
2	
Agar base Urea (DIFCO).....	29 g
Agua destilada.....	100 ml

1. Medir el volumen de agua en una probeta y pesar los gramos de la suspensión
- 1, disolver el agar en el agua en un matraz por agitación.

2. Calentar con agitación constante hasta el punto de ebullición durante un minuto y retirarlo de la flama.
3. Cerrar la boca del matraz con un tapón de algodón y gasa, proteger el tapón con un sombrero de papel y pegarle un trozo de cinta testigo.
4. Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 libras, durante 15 minutos.
5. Sacar el matraz del autoclave y esperar que iguale la temperatura ambiente.
6. Medir el volumen de agua en una probeta y pesar los gramos de la suspensión 2, disolver en un matraz por agitación.
7. La solución 2 filtrarla por una membrana de 0.45 micras al matraz con la solución 1 y agitar.
8. Cerca de un mechero depositar 10 ml en tubos de vidrio de 13x100 con tapón de rosca.
9. Inclinar los tubos.²⁹

Czapeck-Dox + 1 % de Tween 80

Formula.

Czapeck-Dox (Bioxon)	50 g
Tween 80 (Canamex).....	1 %
Agua destilada.....	1000 ml

1. Medir el volumen de agua en una probeta y vaciarla a un matraz de vidrio.
2. Pesar los gramos correspondientes de cada ingrediente y agregarlos al matraz de vidrio.
3. Calentar con agitación constante hasta el punto de ebullición, durante un minuto y retirarlo de la flama.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

4. Adicionar el Tween 80.
5. Cerrar la boca del matraz con un tapón de algodón y gasa, proteger el tapón con un sombrero de papel y pegarle un trozo de cinta testigo.
6. Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 libras y 15 minutos.
7. Sacar el matraz del autoclave y dejar que se enfríe un poco a temperatura ambiente.
8. Cerca del mechero depositar aproximadamente 25 ml del medio por cada caja de Petri.^{26,27}

Agar V8 o Agar jugo de vegetales.

Formula.

1

Agar bacteriológico (Bioxon).....	14 g
Agua destilada.....	340 ml

2

Jugo V8 (Campbells).....	350 ml
Extracto de levadura (acumedia).....	5 g
Agua destilada.....	10 ml

1. Medir el volumen de agua y pesar los gramos de la suspensión 1, disolverlos en un matraz por agitación. Así también disolver la suspensión 2.
2. Calentar la suspensión 2 (aproximadamente 10 minutos) y retirar de la flama.
3. Ajustar el pH de la suspensión 2 a 6.8 a 20 °C.
4. Mezclar las dos suspensiones en un solo matraz y agitar.

5. Se colocan 8 ml de la mezcla en tubos de vidrio 15x100 con tapón de rosca y fondo plano.

6. Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 libras y 15 minutos.^{20,25}

Fermentación de Glucosa.

Ingredientes.

Base caldo rojo de fenol (Bioxon).....	15 gr
Glucosa (J.T.Baker).....	0.1 gr
Agua destilada.....	1000 ml

1. Medir el volumen de agua en una probeta, separar 10 ml y el resto agregarlo a un matraz. Los mililitros que se tomaron se depositan en otro recipiente.
2. Pesar los gramos de la glucosa, agregarlos al recipiente con agua y disolver por agitación.
3. Pesar los gramos correspondientes de la base, agregarlos al matraz con agua y disolver por agitación.
4. Cerrar la boca del matraz con un tapón de algodón y gasa, proteger el tapón con un sombrero de papel y pegarle un trozo de cinta testigo.
5. Esterilizar en autoclave a 15 libras, 121 °C durante 15 minutos. Al mismo tiempo esterilizar tubos de vidrio 13x100 con tapón de rosca que en su interior tengan un tubo de Durham en posición invertida.
6. Sacar el matraz del autoclave y dejar que se enfríe un poco a temperatura ambiente para después filtrar por una membrana de 0.45 micras el agua con la dextrosa disuelta y agitar.

7. Con una pipeta estéril adicionar 6 ml a cada tubo de vidrio 13x100 con tapón de rosca hasta cubrir el tubo de Durham.^{27,28}

Asimilación de Carbohidratos.

Ingredientes.

Base caldo rojo de fenol (Bioxon).....	15 gr
Carbohidrato.....	0.1 gr
Maltosa (Bioxon), Sacarosa (Merck), Trehalosa (Merck), Dextrosa (acumedia) Celobiosa (Nutritional Biochemical Corp.)	
Agua destilada.....	1000 ml

1. Medir el volumen de agua necesaria en una probeta, separar 10 ml y el resto agregarlo a un matraz. Los mililitros que se tomaron se depositan en otro recipiente.
2. Pesar los gramos del carbohidrato, agregarlos al recipiente con agua y disolver por agitación.
3. Pesar los gramos correspondientes de la base, agregarlos al matraz con agua y disolver por agitación.
4. Cerrar la boca del matraz con un tapón de algodón y gasa, proteger el tapón con un sombrero de papel y pegarle un trozo de cinta testigo.
5. Esterilizar en autoclave a 15 libras, 121 °C durante 15 minutos. Al mismo tiempo esterilizar tubos de vidrio 13x100 con tapón de rosca.

6. Sacar el matraz del autoclave y dejar que se enfríe un poco a temperatura ambiente para después filtrar por una membrana de 0.45 micras el agua con el carbohidrato disuelto y agitar.
7. Con una pipeta estéril adicionar 3 ml a tubos de vidrio 13x100 con tapón de rosca.^{26,27,29}

Crecimiento en presencia de ciclohexamida al 0.1 %.

Ingredientes.

Base de Nitrógeno para

Levaduras (DIFCO).....	6.7 g.
Dextrosa (acumedia).....	5 g.
Ciclohexamida (SIGMA).....	0.1 %
Agua destilada.....	1000 ml

1. Medir el volumen de agua en una probeta, separar 10 ml y el resto agregarlo a un matraz. Los mililitros que se tomaron se depositan en otro recipiente.
2. Pesar los gramos del carbohidrato, agregarlos al recipiente con agua y disolver por agitación.
3. Pesar los gramos de Base de Nitrógeno para Levaduras, agregarlos al matraz con agua y disolver por agitación.
4. Cerrar la boca del matraz con un tapón de algodón y gasa, proteger el tapón con un sombrero de papel y pegarle un trozo de cinta testigo.
5. Esterilizar en autoclave a 15 libras, 121 °C durante 15 minutos. Al mismo tiempo esterilizar tubos de vidrio 13x100 con tapón de rosca.
6. Basándose en la siguiente regla diluir la ciclohexamida en acetona:

20 ml de acetona por cada 0.1 gr de ciclohexamida.

7. Sacar el matraz del autoclave y dejar que se enfríe un poco a temperatura ambiente para después filtrar por una membrana de 0.45 micras la acetona con la ciclohexamida disuelta y el agua con la glucosa, después agitar.

8. Con una pipeta estéril adicionar 3 ml a tubos de vidrio 13x100 con tapón de rosca.²⁰

Solución de Yodo-lugol.

Ingredientes.

Yodo (J.T.Baker).....	5 g.
Potasio iodado (J.T.Baker).....	10 g.
Agua destilada.....	100 ml

1. Pesar los gramos de yodo y potasio iodado para después disolverlos en 10 ml de agua destilada.

2. Aforar con agua destilada a 100 ml.^{20,29}

ELABORACIÓN DE MEDIOS DE CONSERVACIÓN.

Leche descremada al 30 %

Ingredientes.

Leche comercial en

polvo descremada (Nestle).....	30 gr
Agua destilada.....	100 ml