



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA

EFFECTO DE UNA CEPA DE LEVADURA CONCENTRADA (*SACCHAROMYCES  
CEREVISIAE*) SOBRE LAS POBLACIONES DE LA FAMILIA  
*ENTEROBACTERIACEAE* EN CORDEROS DE RAZA BLACKBELLY

**TESIS INDIVIDUAL**

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

**LICENCIADO EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

PRESENTA:

**JOSÉ RICARDO GARCÍA TREJO**

DIRIGIDO POR:

**DRA. ANDREA MARGARITA OLVERA RAMÍREZ**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO. NOVIEMBRE 2015.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA**



**EFFECTO DE UNA CEPA DE LEVADURA CONCENTRADA (*SACCHAROMYCES  
CEREVISIAE*) SOBRE LAS POBLACIONES DE LA FAMILIA  
*ENTEROBACTERIACEAE* EN CORDEROS DE RAZA BLACKBELLY**

**TESIS INDIVIDUAL**

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE**

**LICENCIADO EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**PRESENTA:**

**JOSÉ RICARDO GARCÍA TREJO**

**DIRIGIDO POR:**

**DRA. ANDREA MARGARITA OLVERA RAMÍREZ**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO. NOVIEMBRE 2015**



**Universidad Autónoma de Querétaro**  
**Facultad de Ciencias Naturales**  
Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia



**“Efecto de una cepa de levadura concentrada (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre las poblaciones de la familia *Enterobacteriaceae* en corderos de raza blackbelly”**

**Tesis individual**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
**Licenciado en Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**Presenta:**

José Ricardo García Trejo

**Dirigido por:**

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez

**Sinodales:**

**Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez**

Presidente

\_\_\_\_\_  
Firma

**Dr. Gerardo Manuel Nava Morales**

Secretario

\_\_\_\_\_  
Firma

**Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú**

Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

**Dra. Ma. Guadalupe Bernal Santos**

Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

**Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca**

Directora

Facultad de Ciencias Naturales

Centro Universitario.  
Querétaro, Qro.  
Noviembre 2015.

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la suplementación de una cepa comercial de levadura viva (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre la familia *Enterobacteriaceae* en corderos de engorde mediante técnicas moleculares. Para evaluar el efecto del probiótico sobre las enterobacterias se utilizaron muestras gastrointestinales de un experimento con bloques completamente al azar realizado con corderos blackbelly. Dicho experimento se llevó a cabo en la Nave de Infectómica Animal (NINFA) de la UAQ. Los tratamientos evaluados fueron: el grupo testigo (dieta, n=10) y grupo con tratamiento (dieta+ inclusión de 2.5 g de levadura viva/día, n=10); los cuales fueron ofrecidos en un lapso de 29 días con una semana previa de adaptación a la dieta. Las muestras evaluadas fueron contenido ruminal y heces obtenidas en tres diferentes días 01, 21 y 28. Para la identificación de las enterobacterias, primeramente se hizo la extracción de DNA; posteriormente se utilizaron cebadores específicos para su amplificación por PCR en punto final, obteniendo bandas de amplificación del DNA de dichas bacterias con peso molecular de 400 a 500 pb. La cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC) de enterobacterias de las muestras se llevó a cabo mediante la técnica de PCR tiempo real. Los resultados mostraron que la excreción de UFC de enterobacterias disminuyó significativamente, al día 28 ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, la suplementación de levadura viva en la dieta de corderos de engorda no tuvo influencia sobre las UFC de la familia *Enterobacteriaceae* tanto en rumen como en heces ( $P > 0.05$ ). En conclusión, la inclusión de levadura viva en la dieta de corderos de engorda no tuvo efecto reductor sobre las enterobacterias.

**Palabras clave:** Enterobacterias, *Saccharomyces cerevisiae*, PCR.

## SUMMARY

The aim of this research was to evaluate the effect of supplementation of commercial live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on the *Enterobacteriaceae* family survival in fattening lambs, using molecular techniques. Probiotic effect on enterobacteria was evaluated using gastrointestinal samples of an experiment with two randomized blocks in Blackbelly lambs. This experiment was done in Animal Infectomics Unit (NINFA), UAQ. Only two treatments of the experiment were evaluated: control group (diet, n=10) and treatment group (diet+ 2.5 g live yeast/day, n=10); all treatments were given during 29 days with one week of adaptation period to the experimental diet. Samples of rumen fluid and faces from days 01, 21 y 28 were evaluated in this study. To identify the enterobacteria, firstly DNA extraction was done; later specific primers were used to amplify by end-point PCR, DNA amplification bands of these bacteria were obtained with molecular weight of 400 to 500 bp. Quantification of colony forming units (CFU) of enterobacteria samples was carried out by real time PCR. Results showed that the excretion of CFU of enterobacteria significantly decreased at day 28 ( $P < 0.05$ ). However, supplementation of live yeast in the diet of fattening lambs had no influence on the CFU of the family *Enterobacteriaceae* both rumen and faces ( $P > 0.05$ ). In conclusion, the inclusion of live yeast in the diet of feedlot lambs did not have a lowering effect on enterobacteria.

**Keywords:** Enterobacteria, *Saccharomyces cerevisiae*, PCR.

## ABREVIACIONES UTILIZADAS

µl: Microlitro

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AGV: Ácidos grasos volátiles

d: Día

EUA: Estados Unidos de Norte América

FAO: Organización de las Naciones  
Unidas para la Alimentación y la  
Agricultura

g: Gramo

ml: Mililitro

MOS: Manano-oligosacáridos

OMS: Organización Mundial de la Salud

LPS: Lipopolisacárido

pH: potencial de Hidrógeno

PBS: Solución buffer de fosfatos

PCL: Pared celular de levadura/ proteína  
concentrada de levadura

*Spp*: Especie

UE: Unión Europea

UFC: Unidades formadoras de colonia

GRAS: Aditivos alimentarios  
generalmente reconocidos como  
seguros

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

YPD: Agar levadura peptona y dextrosa

TS: Agar tripticasa de soya

Mg<sup>2+</sup>: Iones de magnesio

dNTPs: Dinucleótidos

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
en tiempo real

ng: Nanogramos

µmol: Micromoles

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

RT-PCR: Reacción en cadena de la  
polimerasa reversa

Ct: Ciclo umbral

G: Gravedades

Mg: Miligramo

Ig: Inmunoglobulina

UK: Reino Unido

Log<sub>10</sub>: Logaritmo natural

RPM: Revoluciones por minuto

## **DEDICATORIAS**

### ***A mis padres***

Que por su esfuerzo, sacrificios y mucho cariño hacia mí y a mis hermanos decidieron apoyarme en estudiar esta bella área del conocimiento. Además de ser mi recordatorio diario de que hay que luchar para conseguir lo que se quiere y sobre todo hay que disfrutar el proceso en todo momento. A ellos mi agradecimiento y mi amor.

### ***A mis hermanos y mis sobrinas***

Por ser parte de mi vida y darme un ejemplo claro en mi vida. Pues a pesar de las diferencias en personalidad y forma de ser, se puede convivir y contar con ellos tanto en momentos buenos y difíciles de la vida. ¡Gracias por estar a mi lado!

### ***A mi abuelo Materno***

Porque me enseñó a ser una persona de bien, tener fortaleza en mi persona y amar tanto al trabajo, al campo, como a los animales, además de ser un segundo padre para mí.

### ***A mis tíos y primos maternos***

Porque no hay mejor sitio donde estoy bien y a gusto que con su compañía, y compartir conmigo innumerables aventuras en el campo. Desde las jornadas de trabajo, sembrando y cosechando, hasta las buenas tardeadas pastoreando ovejas y vacas flacas en los pastizales, los amo.

### ***A mis amigos, especialmente a mi amiga Carmen (QEPD).***

Porque su apoyo y amistad estarán siempre en mi corazón, sabiendo que cuento con ellos siempre, y que forman parte de mi vida.

***A mis compañeros y profesores de la licenciatura***

Por los cinco años que pasamos juntos en las aulas y en prácticas y por su forma de ser única. En especial a mis profesores por permitirme aprender lo mejor de ustedes y edificar el conocimiento que ahora tengo.



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, agradecer a la Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez por la oportunidad de dejarme formar parte de este proyecto y por enseñarme el camino de la investigación, el cual ha ampliado mi conocimiento y mi desarrollo tanto en lo profesional como en lo personal.

A mi compañera Maira Ramírez Ramírez, por su alegría, por estar apoyándome en todo momento, y por su gran amistad.

Al Dr. Gerardo Manuel Nava Morales y a la Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú, por su amabilidad para asesorarme a lo largo de este trabajo compartiendo conmigo un poco de su amplio conocimiento en sus respectivas áreas, y a la Dra. Ma. Guadalupe Bernal Santos por su apoyo y amabilidad durante el proceso de la escritura de la tesis.

A la técnico del laboratorio de Microbiología Veterinaria QFB. Susana Lucía Sosa Gallegos por su paciencia, amabilidad para enseñarme y guiarme en las diversas actividades que realicé en el laboratorio, aun cuando era consciente que no tenía mucho conocimiento y experiencia en las técnicas moleculares.

A la empresa SAFMEX, S.A. de C.V. y al FOFI-UAQ 2013, por financiar y hacer posible que este proyecto se llevara a cabo, y fomentar así la generación del conocimiento en la salud y producción animal mediante la investigación.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	i
SUMMARY .....	ii
ABREVIACIONES UTILIZADAS .....	iii
DEDICATORIAS .....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	vi
ÍNDICE DE CUADROS .....	x
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Familia <i>Enterobacteriaceae</i> .....	3
2.1.1. Características biológicas.....	3
2.1.2. Géneros principales de la familia <i>Enterobacteriaceae</i> .....	5
2.1.3. Géneros de la Familia <i>Enterobacteriaceae</i> que causan enfermedades en los animales de producción de carácter zoonótico.....	7
2.2. Uso de probióticos en la producción animal.....	8
2.2.1. Definición de probiótico .....	8
2.2.2. Mecanismo de acción de los probióticos en la salud y producción animal. ....	9
2.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	10
2.3.1. Etiología de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	10
2.3.2. Mecanismo de acción de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en animales de producción monogástricos sobre enteropatógenos.....	13

2.3.3. Mecanismo de acción y efectos reportados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> al usarse como probiótico en rumiantes.....	15
2.4. Técnicas moleculares de diagnóstico clínico. ....	22
2.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	22
2.4.2. PCR tiempo real (qPCR) .....	24
3. JUSTIFICACIÓN .....	33
4. HIPÓTESIS .....	35
5. OBJETIVO GENERAL.....	35
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
7. MATERIALES Y MÉTODOS .....	36
7.1. Lugar experimental, animales experimentales y manejo.....	36
7.2. Tratamientos .....	36
7.3. Dieta experimental .....	36
7.4. Toma de muestras evaluadas de heces.....	37
7.5. Toma de muestras evaluadas de rumen. ....	37
7.6. Técnicas moleculares.....	37
7.6.1. Extracción de ADN de los contenidos de rumen y heces. ....	37
7.6.2. Estandarización del gradiente y detección de las enterobacterias por PCR punto final. ....	38
7.6.3. Determinación de la cinética bacteriana para la extracción de ADN de la población bacteriana control.....	39
7.6.4. Crecimiento y conteo de Unidades Formadoras de Colonias de la población control para obtención de ADN. ....	40
7.6.5. Extracción de DNA de la población bacteriana control .....	41
7.6.6. Estandarización de la curva estándar y análisis de pool's de los grupos de muestras con SYBER Green Takara.....	41

7.6.7. Estandarización de la curva estándar y análisis de pool de las muestras por qPCR con kit Thermo scientific .....	43
7.7. Análisis estadístico.....	45
8. RESULTADOS .....	47
8.1. Estandarización de las técnicas moleculares.....	47
8.2. Análisis de las muestras experimentales. ....	48
9. DISCUSIÓN.....	52
10. CONCLUSIONES.....	55
11. ANEXOS .....	56
Anexo 1. Protocolo de Extracción del ADN.....	56
Anexo 2. Resultados de estandarización PCR y qPCR.....	58
12. LITERATURA CITADA .....	62

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1. Principales géneros de la familia <i>Enterobacteriaceae</i> . .....	6
Cuadro 2.2. Características esperadas y criterios de seguridad de los probióticos en la alimentación y salud animal.....	10
Cuadro 2.3. Clasificación Taxonómica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	11
Cuadro 2.4. Efectos reportados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en Géneros de la Familia <i>Enterobacteriaceae</i> en experimentos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> en rumiantes .....	21
Cuadro 7.1. Reactivos para la mezcla de PCR. ....	38
Cuadro 7.2. Oligonucleótidos utilizados para la Amplificación del DNA de las enterobacterias en la mezcla de reacción. ....	38
Cuadro 7.3. Ciclo de amplificación para la detección de enterobacterias en población control y muestras de rumen y heces. ....	39
Cuadro 7.4. Concentraciones de ADN de las diluciones quíntuples seriadas para la Estandarización de la curva de PCR tiempo real. ....	42
Cuadro 7.5. Reactivos para la mezcla de amplificación para el PCR tiempo real. ....	42
Cuadro 7.6. Concentraciones de DNA de las diluciones quíntuples seriadas para la Estandarización de la curva de PCR tiempo real. ....	43
Cuadro 7.7. Reactivos para la mezcla de amplificación para el PCR tiempo real. ....	44
Cuadro 7.8. Ciclo de amplificación qPCR SYBR Green Thermo Scientific. ....	45
Cuadro 8.1. Efecto de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sobre la cantidad de UFC de enterobacterias en las muestras fecales de los corderos de Engorde. ....	50
Cuadro 8.2. Cantidad de UFC de enterobacterias en heces por día experimental	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.2. Estructura de la pared celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . .....	13
Figura 2.4. Fluoróforo por afinidad al ADN: SYBR GREEN.....	26
Figura 2.5. Cinética deç amplificación de la PCR.....	28
Figura 2.6. Curva de estandarización a partir de diluciones seriadas de ADN conocidas para la cuantificación absoluta de la qPCR .....	29
Figura 2.7. Análisis de la curva de fusión .....	31
Figura 8.2. PCR punto final de muestras de heces al día 21 bloque experimental 1 .....	49
Figura 8.3. PCR punto final de muestras de heces al día 28 bloque experimental 1. ....	49
Figura 8.4. Cantidad promedio de UFC de enterobacterias en las muestras de heces al día 01, 21 y 28 experimental.....	50
Figura 11.2 Gradiente de estandarización de PCR para amplificación de DNA de enterobacterias a partir de DNA de <i>S. typhimurium</i> . ....	58
Figura 11.3. Curva estándar qPCR cuantificación de enterobacterias con SYBR Green Takara ensayo 4.....	59
Figura 11.4. Amplificación diluciones ADN <i>S. typhimurium</i> SYBR Green Takara ensayo 4.....	59
Figura 11.5. Curva de disociación diluciones ADN <i>S. typhimurium</i> SYBR Green Takara ensayo 4.....	60
Figura 11.6. Curva estándar qPCR diluciones DNA <i>S. typhimurium</i> SYBR Green Thermo Scientific ensayo 4. ....	60
Figura 11.7 Amplificación de las diluciones DNA <i>S. typhimurium</i> SYBR Green Thermo Scientific ensayo 4 .....	61
Figura 11.8 Amplificación de las diluciones DNA <i>S. typhimurium</i> SYBR Green Thermo Scientific ensayo 4 .....	61

## 1. INTRODUCCIÓN

La familia *Enterobacteriaceae* son bacilos gram negativos que habitan en el tracto digestivo de los seres humanos y de los animales. Aunque la familia la integran más de 30 géneros, son pocos los causantes de enfermedades gastrointestinales. Entre los más importantes destacan *Escherichia* spp. y *Salmonella* spp., causantes de cuadros de diarrea hemorrágicas y de colitis en animales jóvenes y en el caso de los seres humanos el síndrome hemolítico-urémico (HUS, por sus siglas en inglés), por lo que son microorganismos de carácter zoonóticos, pues una vez que el animal se infecta, quedan como portadores sanos, los cuales diseminan a estos agentes infecciosos (Brewer *et al.*, 2014; Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010).

Sin embargo, debido a que esta familia bacteriana ha adquirido resistencia a los antibióticos, es importante encontrar y usar nuevos productos que ayuden a mejorar el desempeño productivo y la prevención de enfermedades causadas por estos microorganismos. De las principales alternativas se encuentra el uso de probióticos, los cuales se definen como “microorganismos vivos, administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio en la salud en el hospedero” (Gaggia *et al.*, 2010). Entre las principales propiedades de los probióticos está la capacidad de reducir enteropatógenos ya sea por i) competencia de nutrientes, ii) competencia por sitio de fijación en el intestino y iii) la estimulación de la respuesta inmune del hospedero. Además de eficientizar el proceso digestivo de los animales, reflejado en mayor captación de nutrientes y finalmente mejorar la producción según la función zotécnica que se trate (Carro, 2014; Gaggia *et al.*, 2010; Guevara, 2011).

Los organismos más usados son las bacterias ácido-lácticas, como *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. Sin embargo, también son muy empleados hongos y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus* spp, los cuales son considerados seguros para su uso. El uso de levaduras vivas o liofilizadas se ha ido incrementando, pues tiene efectos benéficos en la producción animal (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008). En el caso de los rumiantes se usan como aditivos en la dieta para prevenir desórdenes en la microbiota ruminal de los

animales causado por el consumo de concentrados con alto contenido energético, lo cual ocasiona una acidosis ruminal derivada de la disminución del pH en rumen (Sales, 2011). Además, al igual que monogástricos, se ha evaluado la capacidad de *Saccharomyces cerevisiae* de reducir la colonización y la patogenicidad de miembros de la familia *Enterobacteriaceae* en rumiantes, donde se han reportado efectos en la disminución de UFC en medio ruminal como en heces (Brewer *et al.*, 2014; Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010 ), por lo que el uso de la levadura se ha implementado para prevenir o combatir enfermedades causadas por enteropatógenos, que causan enfermedades gastrointestinales lo cual deriva en una disminución en parámetros productivos (ingesta diaria, ganancia diaria de peso, atraso en el desarrollo) y en casos más severos, pérdidas económicas por la muerte del animal.

Este trabajo tiene como finalidad evaluar la suplementación de una cepa comercial de levadura viva *Saccharomyces cerevisiae* sobre las cantidades de UFC de la familia *Enterobacteriaceae* en diversas porciones del tracto gastrointestinal de corderos de engorde.



## 2. REVISIÓN DE LITERATURA.

### 2.1. Familia *Enterobacteriaceae*

#### 2.1.1. Características biológicas

Las bacterias que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* son bacilos gram negativo de 2-4  $\mu$ l por 0.4-0.6  $\mu$ l, oxidasa negativos fermentadores de carbohidratos principalmente glucosa y galactosa. Son anaerobios facultativos, no formadores de esporas, catalasa-positivos (Merino y Losch, 2009; Quinn, 2011) y reducen los nitratos en nitritos. La mayoría de géneros presentan flagelos peritricos, lo que les confiere movilidad. Las enterobacterias habitan en el tracto intestinal de los animales y humanos, y contaminan vegetación, suelo y el agua. En el laboratorio pueden crecer en agar Mac ConKey en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, poseen un contenido de DNA del 39 al 59% de guanina más citosina (G+C). Algunos géneros poseen cápsula. La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, aunque se desarrollan entre 20 y 40°C. Al crecer en medio sólido, las colonias son lisas y regulares, midiendo aproximadamente 2mm de diámetro, excepto *Yersinia*, que sus colonias son más pequeñas, *Proteus* tiene la tendencia a invadir el agar y formar un tapiz uniforme, y *Klebsiella*, que forma colonias mucosas y de mayor tamaño (Stanchi, 2007).

Las enterobacterias poseen una membrana interna (citoplasmática), que consiste en una capa doble de fosfolípidos que regula el paso de metabolitos y macromoléculas; una capa externa, compuesta de peptidoglicano que la rodea y un espacio periplásmico que contiene una elevada concentración de proteínas, y la membrana externa compleja (pared celular) que está compuesta por otra capa doble de fosfolípidos que comprende lipopolisácarido compuesto por tres dominios principales: i. el lípido A, conocido también como endotoxina que es la parte biológicamente activa que el huésped reconoce; ii. oligosacárido fosfolidado central; y las cadenas laterales de repetición, conocido como antígeno O y que da la clasificación de los serogrupos; y iii. porinas (canales para la penetración de antibióticos y nutrientes). Además posee una serie de factores de virulencia que

son esenciales para la producción de los diferentes síndromes clínicos (Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010; Quinn, 2011).

Las enterobacterias poseen una estructura antigénica muy compleja. A Antígeno O somático, es parte del lipopolisacárido que se encuentra en la pared celular. Este lipopolisacárido tiene tres fracciones:

- i. Región uno: oligosacárido que contiene al Antígeno O.
- ii. Región dos: polisacárido central constante para un género determinado.
- iii. Región tres: dado por el lípido A, que constituye la endotoxina.

A) Antígeno K o capsular, que está presente sólo en algunas bacterias capsuladas como *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*.

B) Antígeno Vi es un polisacárido que rodea a la bacteria sin llegar a ser una cápsula y es característico de algunas especies de *Salmonella*.

C) Antígeno H o flagelar, el cual es proteico, es específico de especie y está presente sólo en las especies móviles.

D) Antígeno F o fimbrial, presente en las fimbrias. Son de naturaleza proteica.

continuación se muestran los más importantes (Merino y Losch, 2009):

Las enterobacterias tienen factores predominantes de patogenicidad, las cuales se mencionan a continuación (Merino y Losch, 2009):

- La cápsula tiene propiedades de adhesina y es antifagocitaria.
- Las fimbrias permiten la adherencia a la célula huésped e impiden el barrido por las barreras mecánicas de defensa del organismo.
- Algunas especies producen exoenzimas como ureasa, gelatinasa, lipasa, desoxirribonucleasa, las cuales actúan permitiendo la sobrevivencia de la bacteria dentro del órgano afectado.
- Producen aerobactinas que permiten la captación de hierro desde el medio, el cual es indispensable para la respiración de estos microorganismos
- Todas las enterobacterias poseen el lipopolisacárido (LPS) de pared, el cual tiene acción de endotoxina, la cual se libera al destruirse la bacteria.

Producen exotoxinas, sin embargo, no todas las especies las producen. Sólo son producidas por las patógenas obligadas y poseen efectos específicos.

Por otro lado, las enterobacterias tienen la capacidad de adquirir rápidamente resistencia a los antibióticos. Dicha resistencia puede estar mediada por plásmidos o ser cromosómica. La mayoría de las enterobacterias poseen plásmidos, que son unidades de ADN extracromosómico que se autorreplican y que transportan su propia estructura de replicación, los plásmidos R tienen un papel fundamental en la resistencia antibiótica de las enterobacterias y aunque la multirresistencia antibiótica de estos microorganismos es con frecuencia mediada por plásmidos, ciertas especies de *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Proteus* indol-positivo, *Providencia spp.* *Serratia spp.* poseen un gen cromosómico que codifica una Betalactamasa de amplio espectro, inducida por la presencia de algunos betalactámicos (Galí, 2010). Dicha resistencia se debe principalmente a la producción de enzimas, en este caso las betalactamasas, aunque debe considerarse también que en algunos casos la resistencia obedece a la asociación de distintos mecanismos de resistencia, tales como, alteraciones de la permeabilidad, alteración de receptores de la pared celular bacteriana afines de los antibióticos y, presumiblemente, expresión de bombas de eliminación activa. Un ejemplo de esto lo constituyen las cepas de *Enterobacter spp.* *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* con sensibilidad disminuida o resistencia a carbapenemasas. En estos casos se observa una disminución de la permeabilidad asociada a una sobreproducción de la betalactamasa cromosómica en el primero y a una betalactamasa plasmídica de clase C en los otros dos (Galí, 2010; Merino y Losch, 2009).

### **2.1.2. Géneros principales de la familia *Enterobacteriaceae***

Dentro de esta la familia *Enterobacteriaceae* se reconocen más de 30 géneros diferentes. A continuación se presentan algunos de los géneros, y dentro de ellos algunas especies, que con mayor frecuencia se aíslan a partir de muestras clínicas humanas (Cuadro 2.2). Actualmente, varios de ellos están siendo sometidos a revisión mediante técnicas de biología molecular, estudiando la homología de sus ADN ya que frecuentemente se crean nuevos géneros con especies de géneros ya existentes.

**Cuadro 2.1. Principales géneros de la familia *Enterobacteriaceae*.**

Género	Especies de importancia	Sitios de localización	Enfermedades que causan en animales y humanos
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i> .	Tracto gastrointestinal de los animales y humanos.	Diarrea, Colitis enterohemorrágica, Síndrome hemolítico-urémico (HUS).
<i>Shigella</i>	<i>S. flexneri</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>S. boydii</i> , <i>S. dysenteriae</i> .	Intestino grueso (microorganismo intracelular).	Disentería bacilar (similar a la causada por <i>E. coli</i> ).
<i>Salmonella</i>	<i>S. enterica</i> , <i>S. bongori</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. paratyphimurium</i> , <i>S. montevideo</i> .	Mucosa intestinal.	Fiebre tifoidea.
<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> .	Suelos, cavidad bucal, tracto gastrointestinal y respiratorio.	Asociado a casos de neumonías lobulares en hospitales.
<i>Enterobacter</i>	<i>E. cloacae</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. agglomerans</i> .	Ambiente (suelo y agua), forma parte de la microflora intestinal de los animales y humanos.	Infecciones oportunistas en heridas, quemaduras, respiratorias y urinarias.
<i>Serratia</i>	<i>S. marcescens</i> , <i>S. odorifera</i> , <i>S. fonticola</i> .	Medio ambiente, forma parte de la microflora fecal.	Infecciones nosocomiales (Vías respiratorias altas, urinarias, cutáneas y heridas quirúrgicas).
<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i> , <i>C. kooseri</i> .	Heces de animales y humanos, intestino grueso.	Raras veces causa infecciones urinarias en pacientes hospitalizados.
<i>Proteus</i>	<i>P. vulgaris</i> , <i>P. mirabilis</i> .	Suelo, agua, aguas residuales, animales en descomposición, tracto intestinal de animales y humanos.	Infecciones urinarias que pueden evolucionar a septicemias.
<i>Morganella</i>	<i>M. morganii</i> .	Flora fecal en animales y humanos.	Rara veces afecta sistema urinario y causa infecciones <i>post</i> quirúrgicas en los hospitales.
<i>Providencia</i>	<i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> .	Forma parte de la flora del colon.	Bacteriemias en individuos inmunodeprimidos y por lo regular en personas que sufren quemaduras.
<i>Yersinia</i>	<i>Y. enterocolitica</i> , <i>Y. pestis</i> .	No forma parte de la microflora animal; se aísla de animales enfermos.	Peste bubónica linfangitis supurante que puede evolucionar a septicemia, diarreas, colitis.

(Merino y Losch, 2009; Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010; Quinn, 2011).

### **2.1.3. Géneros de la Familia *Enterobacteriaceae* que causan enfermedades en los animales de producción de carácter zoonótico.**

Dentro de esta familia bacteriana, algunas especies de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter* spp. son capaces de causar enfermedades agudas en el tracto gastrointestinal en animales y humanos, por ser agentes oportunistas que causan enfermedades en individuos inmunodeprimidos (en humanos causan infecciones nosocomiales) (Singh *et al.*, 2014).

Aunque son residentes naturales del tracto intestinal, pueden tener la capacidad de ser transmitidos por medio de las secreciones de los animales hospederos, las cuales pueden contaminar agua de consumo y alimentos. La patogenicidad que manifiestan estos microorganismos producen endotoxinas y exotoxinas en el estómago (monogástricos), las cuales al interactuar con los jugos gástricos ocasiona una alta pérdida de agua corporal que puede conducir a la muerte (Singh *et al.*, 2014).

*Escherichia coli* O157:H7 enterohemorrágica se identificó por primera vez en 1982 y ha sido implicado en varios casos de colitis hemorrágica, así como agente causal del Síndrome urémico-hemolítico (HUS, por siglas en inglés). El ganado ha sido identificado como principal reservorio de la cepa O157:H7 de forma directa e indirecta, pues se consideran como vía primaria de transmisión a los humanos por medio de la leche no pasteurizada, o por la contaminación fecal de la carne con el microorganismo (Bach *et al.*, 2003; Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010). La colonización del tracto gastrointestinal de los rumiantes por parte de la cepa O157:H7 suele durar en promedio de 14 días a un mes. Algunos estudios previos establecen que el primer sitio de colonización de *E. coli* es el rumen, algunos otros estudios refieren que coloniza ciego, colon y recto. Se ha demostrado *in vitro* que algunas cepas enterohemorrágicas se adhieren a la mucosa del colon en bovinos, desarrollando las lesiones características de colibacilosis (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010).

*Salmonella spp.* es otro miembro de la familia *Enterobacteriaceae* causante de enfermedades intestinales en humanos y en animales de producción, principalmente en los neonatos rumiantes, los cuales se infectan principalmente por la vía oro-fecal. Los animales al enfermar desarrollan los siguientes signos clínicos: diarrea, fiebre, anorexia, deshidratación, enfermedad que compromete el crecimiento del animal. Sin embargo, los animales que se recuperan de la enfermedad se convierten en portadores sanos, excretando al agente infeccioso durante mucho tiempo, infectando nuevos animales por la contaminación del agua y el alimento con heces si no hay bioseguridad en las unidades de producción (Brewer *et al.*, 2014).

Los animales infectados con *Salmonella enterica* pueden transmitir este agente a los humanos a través del contacto directo, o de forma indirecta ya sea por contacto con material infectado con heces de los animales enfermos, así como también con productos de animales que por falta de buenas prácticas de manejo en la planta de proceso ocurre contaminación cruzada. Raras veces *Salmonella enterica* se encuentra en carne de animales que cursaron la fase septicémica de la enfermedad (Trepát-Quiléz, 2002).

## **2.2. Uso de probióticos en la producción animal**

### **2.2.1. Definición de probiótico**

Se han propuesto muchas definiciones para el término probiótico, sin embargo, el más aceptado es el usado por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) desde el año 2002, que los define como “microorganismos vivos, que cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio en la salud en el hospedero” (Gaggia *et al.*, 2010).

Dichos aditivos alimentarios se adicionan en cantidades trazas a las dietas y son usados habitualmente en la alimentación animal con tres propósitos fundamentales: mejorar el sabor u otras características de las materias primas y piensos, prevenir ciertas enfermedades y aumentar la eficiencia de la producción animal (Pérez, 2008).

Los probióticos que son organismos vivos, al ser ingeridos afectan benéficamente al huésped mejorando su balance intestinal. Los organismos más estudiados son las bacterias ácido-lácticas, sobre todo *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. Sin embargo, también se usan hongos y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus* spp. en la producción animal, ya que son considerados seguros para su uso (Rivas *et al.*, 2008). En décadas pasadas el método más común para prevenir enfermedades y aumentar la eficiencia alimentaria en los animales de producción fue mediante el uso de antibióticos como aditivo alimentario, pero se ha comprobado que este uso tiene influencia negativa en la eubiosis del sistema gastrointestinal, produciendo así la aparición de cepas bacterianas resistentes, proceso que se potencializó por la capacidad de transferir la resistencia entre bacterias, incluso de diferente género y especie hacia estos fármacos y su presencia residual en las carnes, huevos, leche y otros productos de origen animal. Es por ello que la aparición de los probióticos es visto como una solución alternativa promisoría (Guevara, 2011).

### **2.2.2. Mecanismo de acción de los probióticos en la salud y producción animal.**

El efecto benéfico de los probióticos (Cuadro 2.2) se atribuye en general a mecanismos diferentes que a su vez pueden deberse a varias causas: a) a la exclusión competitiva de bacterias nocivas, ya sea por: (i) competencia por nutrientes, (ii) competencia por sitios de fijación en el intestino, o (iii) aumento de la respuesta inmunológica del hospedero; y b) por aportes benéficos al proceso digestivo del hospedero, a través de: (i) aporte de macro y micronutrientes para el hospedero o (ii) aporte de enzimas digestivas (Guevara, 2011).

## Cuadro 2.2. Características esperadas y criterios de seguridad de los probióticos en la alimentación y salud animal.

Características
No tóxicos y no patógenos
Exacta identificación taxonómica
Habitante normal de las especies objetivo
Supervivencia, capacidad de colonización y ser metabólicamente activo en el sitio blanco, que implica: <ul style="list-style-type: none"><li>• Resistencia al medio ruminal, los jugos gástricos y bilis</li><li>• Persistencia en el Tracto Gastrointestinal</li><li>• Adhesión al epitelio de la mucosa</li><li>• Competición con la microbiota residente</li></ul>
Producción de sustancias antimicrobianas
Antagonismo hacia microorganismos patógenos
Modular la respuesta inmune
Habilidad para ejercer una de las promociones de salud en el huésped que se haya comprobado científicamente
Estabilidad genética
Viabilidad de la cepa y estabilidad de las características deseadas durante el procesamiento, almacenamiento y entrega
Viabilidad de altas poblaciones
Propiedades organolépticas y tecnológicas deseables cuyo se incluyen en el proceso industrial

(Gaggia *et al.*, 2010)

### 2.3. *Saccharomyces cerevisiae*.

#### 2.3.1. Aspectos biológicos de *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* es una levadura unicelular, correspondiente al reino fungi, división ascomycota, subdivisión ascomicotina. En la naturaleza se encuentra sobre sustratos ricos en azúcares o en los exudados y savias dulces de algunas plantas (Pérez, 2009; Walker, 2009).

Es un organismo unicelular, eucariota, redondo u ovalado, con medida de diámetro largo de 5–10  $\mu\text{m}$  y diámetro corto de 1–7  $\mu\text{m}$  (Walker, 2009;. Figura 2.1). Su ciclo de vida comprende dos tipos: ciclo de vida vegetativo, donde la célula se divide por gemación, donde la célula hija comienza su crecimiento

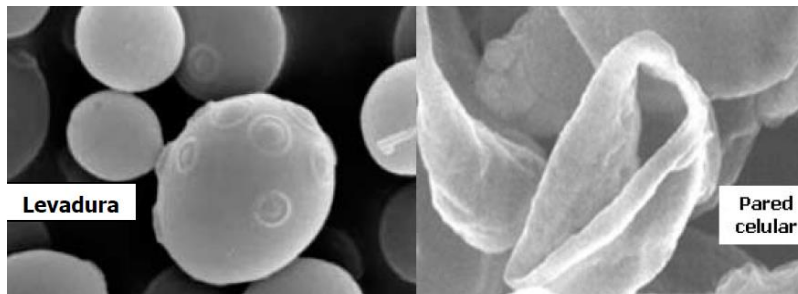


formando una yema en la célula madre, ocurriendo la división del material genético (mitosis), la síntesis de la pared celular y por último la separación celular; y la reproducción sexual, donde se tienen dos tipos sexuales haploides: a y  $\alpha$ , donde al estar en un mismo cultivo se fusionan formando células diploides a/ $\alpha$  desarrollándose la recombinación genética nuclear (meiosis), dando como resultado 4 células con núcleo haploide (2 a y 2  $\alpha$ ) conocidas también como células hijas o yemas, las cuales están en un saco conocido como asca, el cual se rompe y libera las células, este tipo de reproducción se da siempre y cuando existan ambos tipos celulares en el medio donde crece (Walker, 2009). Estos microorganismos crecen en aerobiosis en agar Sabouraud dextrosa a 37°C en un rango de pH entre 3.5 a 5.0, posiblemente debido a que la actividad de las proteínas plasmáticas de las levaduras en los límites de su membrana se da durante estos valores de pH (Díaz-Plascencia *et al.*, 2013). Las colonias de levadura por lo general tienen una textura húmeda y cremosa, su morfología es similar a las colonias bacterianas de mayor tamaño. Las levaduras pueden estar en diferentes ambientes, viven en las plantas, son parte de la microflora de los animales, comensales en la piel y mucosas de revestimiento en los diversos órganos y sistemas corporales (Quinn, 2011).

**Cuadro 2.3. Clasificación Taxonómica de *Saccharomyces cerevisiae*.**

<b>Categoría Taxonómica</b>	
Reino	Fungi
División	Ascomycota
Subdivisión	Ascomycotina
Clase	Hemiascomycete
Orden	Endomycetales
Familia	Saccharomycetaceae
Subfamilia	Saccharomietoideae
Género	<i>Saccharomyces</i>
Especie	<i>cerevisiae</i>

(Walker, 2009)



**Figura 2.1. Levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Morales, 2007).**

*Saccharomyces cerevisiae* contiene múltiples organelos celulares característicos de las células eucariontes. Cuenta con un núcleo ovalado con su respectiva envoltura nuclear, retículo endoplásmico liso y rugoso, aparato de Golgi, mitocondria y vacuolas. El citoplasma también posee diversas enzimas encargadas del metabolismo de la levadura, resaltando las encargadas de llevar a cabo la fermentación alcohólica (Arya *et al.*, 2011). La pared celular de la levadura representa del 15-30% del peso seco de la misma, teniendo como propiedades ser una estructura altamente dinámica y adaptable al medio que lo rodea. Las principales funciones de la pared celular están encaminadas a garantizar la supervivencia de la célula, incluyendo las siguientes: mantener las condiciones de osmolaridad dentro de la célula, brinda protección ante condiciones de estrés físico, mantiene la integridad y la forma celular durante los procesos de crecimiento y división; limita la permeabilidad de moléculas y protege a la levadura de proteínas y otras moléculas externas, creando microambientes internos adecuados para la membrana celular en las fases de estancamiento de los cultivos y colonias (Arya *et al.*, 2011; Klis *et al.*, 2006).

La pared celular está compuesta primariamente por 2 capas (Pérez, 2009):

i. Capa externa. Está formada por un complejo de manoproteínas (aproximadamente 25-50 %) que corresponde a una asociación de polisacáridos de  $\alpha$ -D-manosa con proteínas (manano-oligosacáridos, MOS). Éstas se unen a través de extremos no reductores en forma directa con los 1-3  $\beta$ -glucanos o, indirectamente, con los 1-6  $\beta$ -glucanos. Los MOS contienen abundantes polipéptidos glucosados (50-95 %) que salen como fimbrias fuera de la pared celular.

ii. La capa interna, constituida por un complejo de glucomananos (aproximadamente 25-30 %) que son  $\beta$ -glucanos asociados a una pequeña cantidad de quitina. Dicho complejo lo forman: a) 1-3  $\beta$ -glucanos: moléculas helicoidales de aproximadamente 1500 glucosas, que representan el 30-35 % de la masa celular. Su función es mantener la estructura mecánica de la pared celular; b) 1-6  $\beta$ -glucanos: moléculas lineales de aproximadamente 150 glucosas, que representan el 10 % de la masa celular. Dicha masa está muy ramificada, y es la fracción responsable de organizar la pared celular, ya que se interconecta simultáneamente con los glucanos y manoproteínas de la capa externa (básicamente glucomananos) y quitina (Figura 2.2; Pérez, 2009).

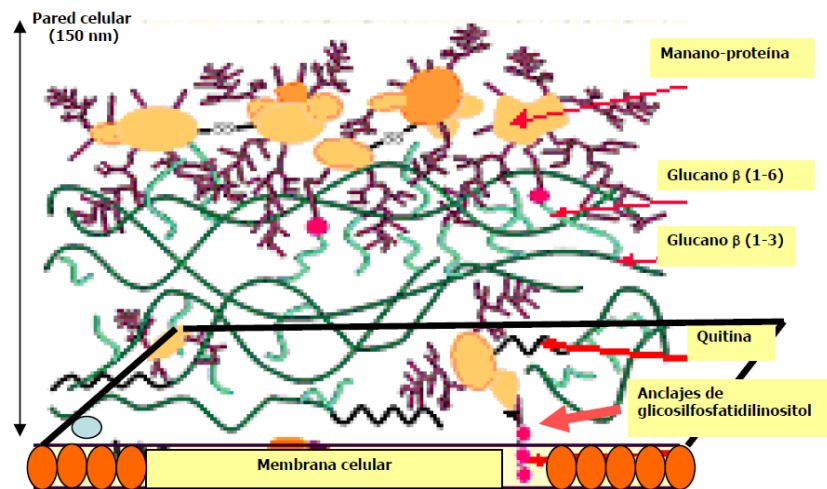


Figura 2.2. Estructura de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* (Morales, 2007).

### 2.3.2. Mecanismo de acción de *Saccharomyces cerevisiae* en animales de producción monogástricos sobre enteropatógenos.

El mecanismo de acción de los productos obtenidos de las levaduras tienen un efecto benéfico en la ecología microbiana del conducto gastrointestinal en no ruminantes; debido a que disminuyen la población de enteropatógenos como es el caso de *Escherichia coli*. Pues se ha aceptado que la adherencia de estas bacterias en el epitelio es importante en la infección temprana de la mucosa intestinal (Auclair, 2001). Esto es posible gracias a que poseen una adhesina fimbrial (lectinas) que se une a receptores de D-manosa en las células epiteliales. Por lo tanto, el modo de acción de la levadura en monogástricos se enfoca

principalmente a la capacidad de aglutinar bacterias patógenas en el conducto gastrointestinal, debido a que las bacterias se unen a las paredes celulares de las levaduras (que contienen manano-oligoglucanos), permitiendo así tener un efecto de modulación en la concentración microbiana principalmente en el intestino de cerdos destetados (Haldar *et al.*, 2011). White *et al.* (2002) reportaron que la adición en dieta de *Saccharomyces cerevisiae* en lechones de 11 días de edad redujeron la colonización de coliformes en yeyuno, ciego y colon, con aumento significativo de inmunoglobulina (Ig) G y uno no significativo de IgA, sugiriendo que las paredes celulares de la levadura pudieran tener efectos sobre la respuesta inmune intestinal; sin descartar una respuesta antigénica contra la levadura. Las respuestas inmunes a los hongos incluyen la activación del sistema del complemento, lo que resulta en un aumento en la respuesta de los neutrófilos y los mecanismos de respuesta mediada por células T, incluyendo la activación de macrófagos y de células T citotóxicas (Abbas *et al.*, 2008).

Estos efectos se han revisado también *in vivo* e *in vitro* en pollos de engorda (Guida *et al.*, 2015; Haldar *et al.*, 2011), donde al inocularse *Salmonella* enterica en conjunto con *Saccharomyces boulardii* y *S. cerevisiae* disminuye la excreción en heces: observándose al microscopio, una aglutinación de las formas levaduriformes de bacilos gram negativas. Por otro lado, la suplementación dietética de manosa reduce la cantidad total de *Salmonella* en el ciego de pollos desafiados con *Salmonella typhimurium* (Spring *et al.*, 2000).

Brufau *et al.* (2015) establecieron que al suplementarse *Saccharomyces cerevisiae* en lechones aumenta la producción de moco, un efecto que puede ser asociado con la observación de más células caliciformes por los efectos beneficiosos de la levadura sobre la morfología intestinal. Los efectos de estos probióticos incluyen cambios graduales en la estructura de la comunidad bacteriana en general, la reducción de patógenos potenciales, aumento cuantitativo de los lactobacilos y modulación cualitativa de las bifidobacterias.

### **2.3.3. Mecanismo de acción y efectos reportados de *Saccharomyces cerevisiae* al usarse como probiótico en rumiantes.**

El uso de levaduras vivas o liofilizadas se ha ido incrementando, pues tiene efectos benéficos en la producción animal (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008). En el caso de los rumiantes, se usa como aditivo en las dietas. El principal motivo por el que se recurre a la suplementación de estos organismos es para prevenir desórdenes en la microbiota ruminal de los animales causado por el consumo de concentrados con alto contenido energético (carbohidratos solubles) (Sales, 2011). Este tipo de productos se caracterizan por tener alta concentración de células viables (>10 billones de UFC/g), siendo la especie más usada *Saccharomyces cerevisiae*.

Desde el punto de vista regulador, Algunos productos de levaduras han sido registrados como aditivos en alimentos en Europa (EU Regulación 1831/2003); mientras que en los Estados Unidos de Norte América se han registrado en la lista de aditivos alimentarios generalmente reconocidos como seguros (GRAS). En los años recientes, el número de consumidores, conscientes de la seguridad, calidad y de que se elaboren de forma sustentable productos de origen animal, han encausado al uso de estos aditivos; aunque se ha demostrado que algunas veces no ayudan a la productividad, pero si disminuyen el riesgo de transmitir microorganismos zoonóticos. Disminuyendo así el uso de antibióticos la resistencia de las poblaciones bacterianas a los mismos antibióticos, limitando además la excreción y diseminación hacia otros animales (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008; Tripathi y Karim, 2011).

#### **2.3.3.1. Regulación del pH ruminal**

El efecto de las levaduras suplementadas en la dieta de los rumiantes parece estar estrechamente relacionada con el tipo de dieta suplementada (Auclair, 2001). El rumiante al consumir dietas altas en carbohidratos solubles, tiene una marcada disminución del pH ruminal, debido a que incrementa el número de bacterias productoras de ácido láctico (como *Streptococcus bovis*), la cantidad de ácido láctico y de ácidos grasos volátiles, que contribuyen al bajo nivel del pH

ruminal; disminuyendo la cantidad de bacterias utilizadoras de ácido láctico como *Selenomonas ruminantium* (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008). Para que el pH ruminal sea estabilizado, los niveles de ácido láctico tienen que disminuir. Se han realizado trabajos para verificar si *Saccharomyces cerevisiae* influye en el control de pH ruminal, teniendo resultados diversos. Bach *et al.* (2007) encontraron una diferencia en los niveles de pH ruminal en vacas en lactancia canuladas suplementadas con la levadura con respecto a las no suplementadas ( $P < 0.01$ ); teniendo los valores del pH bajos en las vacas control que las vacas suplementadas con levaduras (5.49 vs 6.05 respectivamente). Thrune *et al.* (2009) administraron *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077 (Lallemy Animal Nutrition, Milwaukee, WI, USA) en vacas lecheras Holstein canuladas detectando que el pH en las vacas suplementadas se mantuvo estable con respecto a las vacas no suplementadas (6.23 vs 6.53,  $P < 0.05$ ). Sin embargo, Pinos-Rodríguez *et al.* (2007) al suplementar en becerros Holstein *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077 (Lallemy Animal Nutrition, Milwaukee, WI, EUA) y *Saccharomyces boulardii* CNCM I-1079 no encontraron diferencias significativas con respecto al pH ruminal de los becerros del grupo control (5.6 grupo control; 5.4 *S. cerevisiae* y 5.3 *S. boulardii*). La ausencia de efecto en el pH ruminal también lo reportan Desnoyers *et al.* (2009), quienes analizaron el efecto de *Saccharomyces cerevisiae* CBS 493.94 (Alltech, UK) en cabras lecheras saanen y alpino, teniendo similares promedios de pH en el grupo control y en los grupos suplementados con la levadura, concluyendo que el efecto de la disminución del pH es más posible verlo en animales con dietas altas en concentrado, con respecto a los alimentados con dietas con fibra, pues las raciones proporcionadas a las cabras tenían 80 y 50% de forraje. Diferentes autores (Auclair, 2001; Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008) mencionan que la levadura en el medio ruminal compite en conjunto con las bacterias productoras de ácido láctico disminuyendo la concentración de ácido láctico.

### **2.3.3.2. Mejoramiento de la digestibilidad ruminal y estimulación del crecimiento de microbiota benéfica ruminal**

Dentro de los mecanismos de acción principal propuestos es que las levaduras vivas en el medio ruminal a través de su respiración aerobia permiten eliminar el pequeño porcentaje de oxígeno (1%) que entra al rumen cuyo el animal ingiere los alimentos junto con el bolo alimentario y en la saliva, facilitando así el crecimiento de los microorganismos anaerobios más estrictos como bacterias celulolíticas y hongos (Newbold *et al.*, 1996). Sin embargo, también se ha propuesto que su efecto se debe a la estimulación de la población microbiana ruminal por la liberación al medio de sustancias que favorecen su crecimiento conocidos como “factores de crecimiento”, entre los que destacan el ácido málico, vitaminas (específicamente tiamina) y péptidos. Al estimular el crecimiento de las bacterias ruminales celulíticas (*Fibrobacter spp.* y *Ruminococcus spp.*) y utilizadoras del ácido láctico (como *Megasphaera elsdenii* y *Selenomonas ruminantium*), las levaduras pueden provocar un aumento del flujo duodenal de proteína microbiana y con ello una mayor disponibilidad de aminoácidos para el animal hospedador (Carro, 2014; Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008; Díaz-Plascencia *et al.*, 2013).

Pinloche *et al.* (2013) a partir de vacas lecheras Holstein canuladas analizaron si la suplementación de *Saccharomyces cerevisiae* Sc47 (Marquette-Lez-Lille, Francia) afecta la microbiota ruminal, confirmando que las poblaciones bacterianas celulolíticas (*Megasphaera spp.*; *Selenomonas spp.*) y las utilizadoras de ácido láctico (*Fibrobacter spp.* y *Ruminococcus spp.*) aumentaron en las vacas suplementadas, con respecto a las vacas control. Sin embargo, sorpresivamente se detectaron cantidades bajas de *Prevotella spp.* y de *Mitsuokella spp.*; géneros bacterianos encargados de la degradación del almidón, por lo que sus poblaciones están aumentadas en los animales cursan con acidosis clínica y subclínica, concluyendo que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es útil al revertir la acidosis ruminal. Sin embargo, Mosoni *et al.* (2007) al determinar el efecto de *Saccharomyces cerevisiae* sobre poblaciones celulolíticas en corderos canulados, no detectó efecto alguno sobre la población total de bacterias degradadoras de celulosa, específicamente en los tres géneros que detectó por medio de técnicas

moleculares: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens*.

Beauchemin *et al.* (2003) al analizar en líquido ruminal de novillos canulados el efecto de *Saccharomyces cerevisiae* sobre las poblaciones microbianas intestinales, observaron que la levadura no ejerció efecto en el número de UFC de bacterias generales, utilizadoras de lactato y de bacterias amilolíticas ( $P > 0.05$ ). Kumagai *et al.* (2004) en ovejas Suffolk canuladas analizó el efecto de *Saccharomyces cerevisiae* sobre las poblaciones microbianas en heces y con una dieta alta en concentrados y otra baja en concentrado, en donde detectaron que en los corderos suplementados con la levadura la población de bacilos aumentó significativamente ( $P < 0.05$ ) en la dieta alta en concentrado, mientras que en las enterobacterias no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los grupos de tratamientos, pero si entre dietas ( $P < 0.05$ ), explicando que este efecto puede deberse a que el ambiente con los dos tipos de dietas varía entre la dieta alta en heno y la alta en concentrado, lo cual favorece o disminuye la variabilidad de desarrollo de esta familia bacteriana en el intestino (ya que determinaron que el pH intestinal es mayor en animales con concentrado con respecto a los alimentados con forraje).

Chaucheyras-Durand y Fonty (2002) en corderos evaluaron el efecto de *Saccharomyces cerevisiae* sobre el desarrollo de la microbiota ruminal, y observaron que en los corderos suplementados con la levadura se establecieron en mayor cantidad las poblaciones celulolíticas a partir del segundo y tercer día en comparación con los corderos no suplementados, sin embargo, a partir del cuarto día, se encontraron similares cantidades de bacterias celulolíticas en ambos grupos, por lo que concluyen que la suplementación de la levadura en los corderos tienden a aumentar la colonización de las bacterias celulolíticas en el nacimiento. Ghazanfar *et al.* (2015) Establecen que la suplementación de *Saccharomyces cerevisiae* en la dieta de vaquillas aumentó en la flora fecal el número de UFC de lactobacilos, mientras que en el caso de coliformes totales (en los cuales se incluyen géneros de enterobacterias) no se detectó diferencias significativas de UFC con respecto a las vaquillas control, solamente se detectó un aumento



significativo en los primeros días de experimentación en animales no tratados debido a que éstas cursaron con cuadros fuertes de diarrea por cambios bruscos de dietas, mientras que las suplementadas no mostraron este signo clínico, aun así, en los días posteriores a la presentación de diarrea la cantidad de UFC de coliformes en ambos grupos no fue significativamente diferente, concluyendo que la levadura regula la cantidad de estos microorganismos en el tracto intestinal, evitando su excesiva replicación.

### **2.3.3.3. Exclusión de patógenos en el tracto gastrointestinal**

*Saccharomyces cerevisiae* reduce el crecimiento de microorganismos patógenos, preserva la función de la barrera gastrointestinal y la disminución de la colonización con alteración de algunos microorganismos patógenos como *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolítica*, *Shigella flexnerii*, *Clostridium* spp. y *Vibrio cholerae* en monogástricos (Pérez, 2008).

Por otro lado, en animales adultos se ha demostrado que un cambio drástico en la proporción de forraje: concentrado en los rumiantes afecta la microbiota gastrointestinal, pudiendo ocasionar un incremento de bacterias productoras de lactato (*Streptococcus bovis*) y una disminución de bacterias celulolíticas (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, y *R. flavefaciens*) cuando se dan dietas altas en concentrados (Callaway y Martin, 1997). Por lo que, la inclusión de *Saccharomyces cerevisiae* se lleva a cabo para estabilizar el pH ruminal y minimizar la producción de ácido láctico (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 1991). Además de que aumenta tanto la degradación de la fibra, como el número total de bacterias (Newbold *et al.*, 1996) (Cuadro 2.3). La posible acción reductora de *Saccharomyces cerevisiae* sobre enteropatógenos puede deberse a su metabolismo, pues en ensayos *in vitro* en contenido ruminal se ha detectado cantidades altas de etanol, dando como resultado la disminución de las cantidades de *E. coli* que pudieran estar en las partículas de alimento, y este efecto puede mejorar en condiciones de pH bajo. Sin embargo, las concentraciones de etanol en contenido ruminal *in vivo* pueden ser distintas por su absorción por el epitelio ruminal (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010, 2008). No obstante, aún no se sabe si *Saccharomyces* spp. ejerce una acción similar de

reducción de bacterias en el intestino de rumiantes como en monogástricos. La cual, se debe a la conformación de la pared celular, formada por un complejo de mananoproteínas (aproximadamente 25-50 %) que corresponde a una asociación de polisacáridos de  $\alpha$ -D-manosa con proteínas (manano-oligosacáridos, MOS). Éstas se unen a través de extremos no reductores en forma directa con los 1-3  $\beta$ -glucanos o, indirectamente, con los 1-6  $\beta$ -glucanos. Los MOS contienen abundantes polipéptidos glucosados (50-95 %) que salen como fimbrias fuera de la pared celular, que tienen la capacidad de aglutinar las micotoxinas presentes en el tracto intestinal animal; aunque se ha comprobado *in vivo* que después de 11 días de inoculación de *E. coli* 0:157H7 en vaquillas charoláis disminuye su excreción en heces (Liou *et al.*, 2009); mientras que Stella *et al.* (2007) detectaron un aumento de UFC de *Saccharomyces cerevisiae* en las muestras de heces en cabras saanen inoculadas con la levadura, en cambio, las cabras no suplementadas mantuvieron cantidades bajas de levadura durante todo el experimento, confirmando en este ensayo que la levadura podría atravesar todo el tracto digestivo; esto concuerda con la disminución del enteropatógeno desafiado (*Salmonella typhimurium*) en las cabras tratadas.

Las levaduras, al contrario de otros microorganismos con potencial probiótico, tienen una limitada capacidad para colonizar el tracto gastrointestinal del animal que las recibe, pues se han realizado experimentos en ovejas, las cuales recibieron levaduras, el número de células viables de estos microorganismos declinó 30 horas después de finalizado el tratamiento; En otros experimentos realizados con corderos, entre 17 y 34% de las células de las levaduras permanecieron vivas durante su tránsito a través del tracto digestivo (Castro y Rodríguez, 2005).

**Cuadro 2.4. Efectos reportados de *Saccharomyces cerevisiae* en Géneros de la Familia *Enterobacteriaceae* en experimentos *in vitro* e *in vivo* en rumiantes**

Autor(es) y años	Especie y técnicas usadas	Resultados
Bach <i>et al.</i> (2003)	<i>In vitro</i> : Líquido ruminal de ovino; sometido a medio ruminal simulado; Colonias de <i>Saccharomyces cerevisiae subsp. bouardii</i> (20×10 <sup>9</sup> UFC; 5 dosis: 0, 5, 10, 15 y 20 mg/ml de fluido ruminal) vs colonias <i>E. coli</i> O157:H7 en cultivos bacteriológicos	24 hrs <i>post</i> incubación sin efecto (4.00 log <sub>10</sub> /ml). A las 48h disminución de UFC de <i>E. coli</i> (P < 0.05) en los inóculos de 10, 15 y 20 mg/ml (<2.0 log <sub>10</sub> UFC/ml) Inhibición de crecimiento de <i>E. coli</i> en las zonas de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> con 19 ± 0.4, 18 ± 0.8, 15 ± 0.9 y 13.5 ± 0.4 mm, respectivamente
Stella <i>et al.</i> (2007)	<i>In vivo</i> : Cabras lecheras Saanen (n=72). 90 días: grupo control (n=36) y suplemento de levadura (n=36) muestras fecales día 01, 30,60 y 90. 0.2 g/día suplemento de levadura (4×10 <sup>9</sup> UFC <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CNCM I-1077 Levucell SC20), detección de UFC por medio de cultivos bacteriológicos	No se detectó efecto de la levadura sobre la microbiota general (P< 0.05). No se encontraron diferencias estadísticas entre ambos grupos en el conteo de UFC enterobacterias (P>0.05); El Conteo UFC Log <sub>10</sub> <i>E. coli</i> fue disminuyendo durante el experimento (P< 0.05)
Chaucheyras-Durand <i>et al.</i> (2010)	<i>In vivo</i> : tres ovinos canulados en rumen suplementados con levadura (4x 10 <sup>9</sup> UFC/día <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CNCM I-1077 Lallemy Animal Nutrition, Francia) y tres ovinos canulados del rumen sin probiótico por 4 semanas. <i>In vitro</i> : Desafío con <i>E. coli</i> O: 157:H7 cepa EDL933 Ácido resistente y ácido sensible, colección de muestras semanalmente y al día del sacrificio, desafío en cultivos bacteriológicos.	Disminución de la tasa de crecimiento a partir de las 16 h de incubación (1.48 a 0%) (P<0.05) de <i>E.coli</i> O: 157H7 el fluido ruminal; en los contenidos yeyunal y cecal, no se afectó el crecimiento del enteropatógeno.
Liou <i>et al.</i> , (2009)	<i>In vivo</i> : 8 vaquillas raza Charolais con cánulas ruminales (4 animales control y 4 con tratamiento); con suplementación previa del probiótico (fermentado de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> XP; Diamond V Mills Inc., Cedar Rapids, IA) 56g/día 30 días antes del desafío; el cual duró 33 días e inoculación de <i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895; crecimiento y conteos de UFC en medios bacteriológicos	A las 24 hrs <i>post</i> inoculación se observó una disminución de UFC de O157:H7 en contenido ruminal en los animales suplementados con levadura con respecto a los controles (P<0.05) En las muestras se vio un comportamiento similar al rumen (P<0.05); al día 11 después de la inoculación 2 de las 4 becerras con el tratamiento fueron O157:H7 negativas, las becerras control fueron positivas hasta el día 25 <i>post</i> inoculación
Brewer <i>et al.</i> (2014)	<i>In vivo</i> : Becerras Holstein–Jersey Dos grupos: Lactancia control (n=10) y Lactancia con Productos de fermentación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (SCFP; 1 g/ cabeza/d SmartCare) y 3.5 g/head/d Original XPC (Diamond V, Cedar Rapids, Iowa) (n=10) inoculadas con <i>Salmonella enterica</i> serotipo <i>typhimurium</i> SL1344 2 (106 CFU/kg LR)	Se reportó significancia en el conteo de UFC de <i>S. typhimurium</i> (P<0.05) en ambos grupos, 4.0 log <sub>10</sub> UFC en el grupo control y 3.0 log <sub>10</sub> en las becerras suplementadas con los productos de la levadura en los primeros días <i>post</i> infección (1 al 7).

## **2.4. Técnicas moleculares de diagnóstico clínico.**

### **2.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La invención de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por K. Mullis y sus colaboradores en 1985 ha revolucionado la biología molecular y la medicina molecular (Saiki *et al.*, 1985). La PCR es una técnica *in vitro* utilizada para amplificar enzimáticamente una región determinada de ADN situada entre dos regiones de ADN cuya secuencia se conoce. Mientras que antes solo podían obtenerse cantidades mínimas de un gen específico, ahora incluso un único ejemplar de un gen puede amplificarse con la PCR hasta un millón de ejemplares en tan solo unas pocas horas (Somma y Querci, 2007).

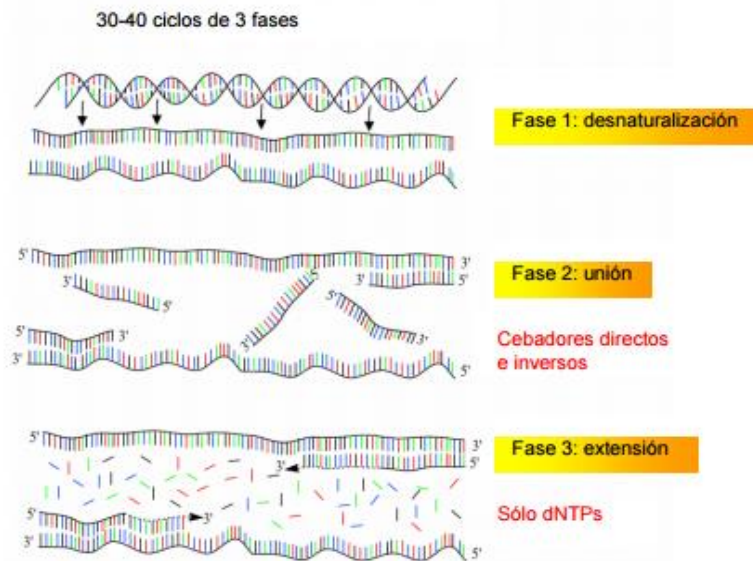
#### **2.4.1.1. Principios de la PCR**

La PCR se basa en el mecanismo de la replicación celular del ADN. El ADN bicatenario se desenrolla y pasa a ADN monocatenario, se duplica y posteriormente se vuelve a enrollar en células eucariotas. Para desenrollar y duplicar la molécula del ADN se necesitan enzimas, la topoisomerasa y helicasa, que se encargan de desenrollar y de separar la doble cadena de ADN. Posteriormente, la enzima primasa se encarga de unir a las cadenas de ADN los cebadores (secuencias de ARN y ADN que se unen al origen de replicación y funcionan para que la ADN polimerasa comience la elongación) en el extremo 3' para así la ADN polimerasa iniciar la síntesis de la nueva cadena, tomando dinucleótidos libres (dNTP's). Como la DNA polimerasa sintetiza de 5' a 3' sobre la cadena 3'-5', crea la cadena complementaria 5'-3' a fragmentos (fragmentos de Okazaki). La enzima ligasa se encarga de unir los enlaces fosfodiéster de las bases nitrogenadas (Somma y Querci, 2007).

La técnica de PCR consiste en los siguientes pasos (Figura 2.3): i) desnaturalización del ADN por fusión a temperatura elevada, a fin de convertir el ADN bicatenario en ADN monocatenario; ii) unión (anillamiento) de dos oligonucleótidos, utilizados como cebadores, al ADN diana a una temperatura menor que la de desnaturalización; iii) extensión de la cadena de ADN por adición

de nucleótidos a partir de los cebadores utilizando ADN polimerasa como catalizador, en presencia de iones  $Mg^{2+}$ .

Dicho ciclo es entonces repetido un número determinado de veces (de 25 a 35), duplicándose cada vez el número de moléculas de producto. Esta amplificación exponencial tiene como resultado un gran número de copias de la secuencia de ADN flanqueada por el par de oligonucleótidos. De esta manera, la reacción permite obtener una gran sensibilidad al detectar muy bajas cantidades de ADN molde y especificidad al detectar únicamente la secuencia de ácido nucleico para la que han sido diseñados los oligonucleótidos o cebadores (Méndez y Pérez, 2005; Somma y Querci, 2007).



**Figura 2.3. Fases de la amplificación de la PCR (Somma y Querci, 2007).**

#### **2.4.1.2. Aplicaciones en la microbiología de la PCR**

En el ámbito de la microbiología clínica, la PCR se ha aplicado en tres grandes campos (Costa, 2005): i. Diagnóstico etiológico. La PCR es sobre todo útil en ausencia de métodos de diagnóstico alternativos o cuyo éstos son muy complejos, para mejorar la eficacia diagnóstica complementando métodos convencionales o si se requiere un diagnóstico rápido y precoz del agente etiológico para poder iniciar el tratamiento específico lo antes posible. ii. Control del tratamiento con

antimicrobianos. La PCR se utiliza tanto para la selección de los pacientes que deben ser tratados como para, una vez iniciado el tratamiento, comprobar su eficacia, siendo importante para ello disponer de métodos cuantitativos y iii. Caracterización genética de agentes infecciosos. La PCR se utiliza ya sea para genotipificación o identificación de mutaciones determinantes de resistencias a fármacos o de virulencia; epidemiología molecular; etc.

#### **2.4.2. PCR tiempo real (qPCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) detecta el desarrollo de la reacción de la amplificación a medida que esta ocurre. Para esto el qPCR utiliza un marcador fluorescente para monitorear la amplificación de productos en cada ciclo de reacción, el cual puede actuar en la fase de elongación, ya sea al inicio, si es que el Fluoróforo está en los oligonucleótidos específicos (sondas), o si es de afinidad al material genético al momento de tener la nueva cadena de ADN, el cual al ser excitada con luz a cierta longitud de onda emite fluorescencia y así realizar la cuantificación (Rodríguez y Rodríguez, 2006).

Los termocicladores para llevar a cabo la qPCR incorporan entonces un lector de fluorescencia, los cuales están diseñados para medir la fluorescencia emitida en el proceso de la amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en los termocicladores de qPCR son de dos tipos: i) agentes intercalantes, y ii) sondas específicas marcadas por fluorocromos, diseñadas de manera especial (Costa, 2005).

##### **2.4.2.1. Equipos para realizar la PCR en tiempo real**

Los equipos para llevar a cabo la PCR en tiempo real incluyen un termociclador y una unidad capaz de detectar señales fluorescentes (fluorómetro) para monitorear el progreso de la reacción de amplificación, así como un Hardware y un Software para la captura y el análisis de los datos, respectivamente (Costa, 2005).

El termociclador del equipo tiene que tener la capacidad de mantener una temperatura uniforme para todas las muestras y ser lo suficientemente rápido en la transición de temperaturas de una etapa a otra (desnaturalización del ADN molde, alineamiento de los oligonucleótidos y síntesis) (Rodríguez y Rodríguez, 2006). El

sistema fluorométrico consiste en una fuente de energía para excitar a los fluoróforos (a una determinada longitud de onda de excitación) y un sistema de detección, que permita monitorear la señal emitida (a una longitud de onda de emisión). La fuente de energía que proporciona la luz de excitación para los fluoróforos puede provenir de una lámpara (tungsteno), una resistencia (diodo emisor de luz) o un láser. Las diferentes longitudes de onda de emisión se detectan con dispositivos que incluyen filtros, multiplicadores y fotodetectores (Aguilera *et al.*, 2014).

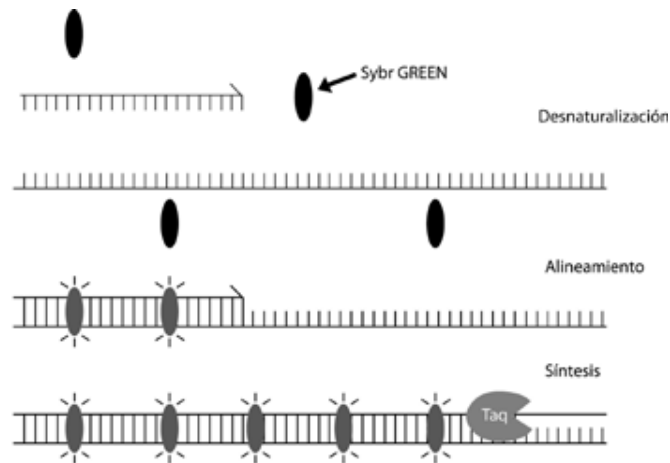
#### **2.4.2.2. Fluoróforos utilizados para la cuantificación en la PCR tiempo real**

Los fluoróforos utilizados para seguir la amplificación del ADN durante la PCR en tiempo real pueden ser de dos tipos: i) fluoróforos con afinidad por el ADN y ii) sondas específicas para fragmentos del ADN, es decir, que sólo emiten fluorescencia cuyo se ha amplificado un fragmento del ADN de interés (blanco) (Aguilera *et al.*, 2014).

Los fluoróforos por afinidad al ADN son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuyo se unen a ADN de doble hélice. La intensidad de la fluorescencia se incrementa proporcionalmente a la concentración del ADN de doble cadena. Los fluoróforos más empleados en PCR a tiempo real son el SYBR Green I el cual se une al surco menor del ADN de doble cadena. Mientras más ADN de doble cadena haya en el tubo de reacción, mayores serán la unión y la señal de fluorescencia del SYBR Green (Figura 2.4); sin embargo, también se utilizan otros marcadores como BEBO, YOYO-1 y TOTO-1, y el rojo Texas (Aguilera *et al.*, 2014).

Este sistema de detección tiene la ventaja de que la optimización de las condiciones de la reacción es muy fácil y además, es más barato que las sondas específicas. Sin embargo, tiene como desventaja que los agentes intercalantes tienen baja especificidad, debido a que se unen de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores, frecuentes en la PCR. Para hacer frente a esta situación se debe realizar un análisis de los resultados en la curva de fusión (Melt Curve). Este análisis permite que los productos no

específicos puedan ser discriminados de los amplicones específicos (Costa, 2005; Rodríguez y Rodríguez, 2006).



**Figura 2.4. Fluoróforo por afinidad al ADN: SYBR GREEN (Aguilera *et al.*, 2014).**

Las sondas de hibridación específica son sondas marcadas por dos tipos de fluorocromos, un donador y un receptor. Este proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas (Costa, 2005). Se pueden clasificar en 3 tipos (Aguilera *et al.*, 2014; Costa, 2005):

- Sondas de hidrólisis.** Son oligonucleótidos con la secuencia del gen de interés marcados por un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser estimulado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia que libera el receptor, los cuales deben estar cerca, la ADN polimerasa en su actividad sobre el ADN diana, libera el extremo 3' el cual emite la fluorescencia absorbida del fluorocromo donador la cual es identificada por el lector. La sonda más usada es Taqman
- Sondas de hibridación.** Son dos sondas específicas, las cuales se unen al ADN diana; una de ellas lleva un fluorocromo donador en el extremo 3' y la otra uno aceptor en el extremo 5'. Al estar hibridadas, los dos fluorocromos están próximos, el donador al ser excitado, transfiere su energía al aceptor, que emite la fluorescencia que el detector detecta,
- Sondas de horquillas.** Son sondas que contienen un fluorocromo reportero en el extremo 5' y un apagador en el extremo 3' los cuales forman una horquilla, fomentando así la cercanía y la transferencia de

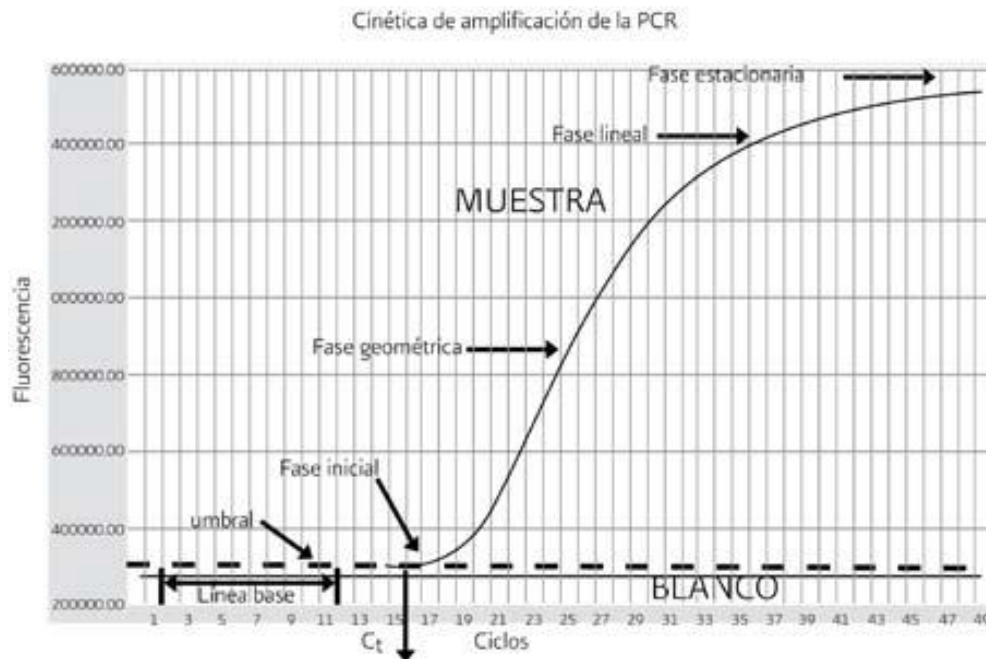


energía. Al unirse a la horquilla de interés, la horquilla se extiende, aumentando la distancia entre el fluorocromo donador y el aceptor, este último emitiendo la fluorescencia detectada por el lector. Las sondas que usan este principio son los molecular beacons, los scorpions, los sunrise primers y los lux primers.

#### **2.4.2.3. Umbral y valores umbral del ciclo (Ct)**

Los resultados de la qPCR se basan en la detección y cuantificación de los marcadores fluorescentes a lo largo de la reacción de la PCR, permitiendo así conocer la cantidad de fluorescencia emitida durante la fase exponencial de la reacción. Donde, un aumento significativo del producto de la PCR se correlaciona con la cantidad inicial de ADN o ADNc en estudio (Vinueza, 2009).

La cinética de amplificación por la PCR se puede dividir en cuatro fases (Figura 2.5; Aguilera *et al.*, 2014): i. Fase inicial. Se da entre los primeros 10-15 ciclos, la fluorescencia es insuficiente para lograr discriminar el ruido basal. Sin embargo, esta fase sirve para delimitar la línea base. ii. Fase geométrica. Los reactivos de la reacción se encuentran de forma abundante por lo que la amplificación por la PCR tiene una eficiencia cercana al 100%. En esta fase de la cinética de amplificación, el comportamiento del ADN es  $2^n$ , es decir, a partir de cada molécula del ADN se generan dos, por lo que el producto de la PCR se duplica después de cada uno de los ciclos. iii. Fase lineal. Esta comprende el momento en que los reactivos empiezan a ser limitantes en la reacción y se presenta un decaimiento de la actividad enzimática. La eficiencia de la amplificación es inconstante durante esta fase. iv) Fase estacionaria, esta fase muestra una señal saturada, la amplificación se detiene debido a que los componentes de la reacción se agotaron. En ésta, la cantidad de producto obtenida es constante aunque se incremente el número de ciclos.

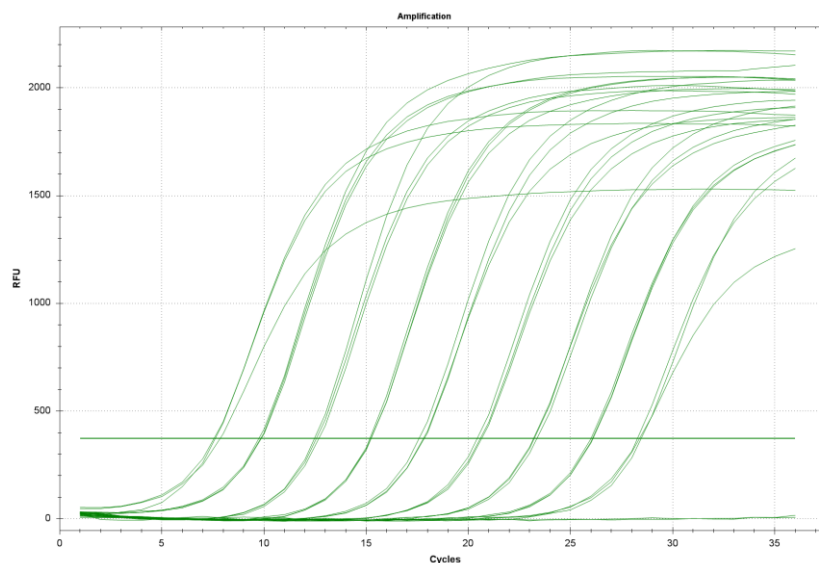


**Figura 2.5. Cinética de amplificación de la PCR (Aguilera *et al.*, 2014).**

Hay dos tipos de cuantificación en la qPCR (Aguilera *et al.*, 2014; Vinuesa, 2009):

- i. **Cuantificación Absoluta.** Este tipo de ensayo permite determinar el número exacto de moléculas del ADN o ARN en una muestra para determinar cargas virales, la presencia de agentes patógenos; Para llevarla a cabo, se requiere una muestra con una cantidad exacta en ng/ $\mu$ L,  $\mu$ mol/ $\mu$ L, número de copias o equivalentes genómicos, como estándar absoluto externo. Este estándar puede ser un fragmento del ADN de doble cadena o de cadena sencilla, la cadena de ADN complementaria, un producto amplificado por la PCR de la secuencia del ADN de interés clonado en un plásmido, un producto de la PCR convencional o la síntesis directa de la secuencia del ADN blanco.
- ii. **Cuantificación relativa.** Este tipo de cuantificación mide los cambios en el estado basal de un gen de interés versus un gen de expresión constante que actúa como control. Se utiliza en ensayos de expresión génica, principalmente. Es necesario realizar la transcripción reversa (RT) y los ensayos se conocen como RT-PCR en tiempo real.

La diferencia entre ambas cuantificaciones es que la cuantificación absoluta no se parte de una cantidad conocida del ADN, sino de un control endógeno o gen constitutivo. Debido a que no se conoce la cantidad absoluta del estándar interno, sólo se pueden determinar los cambios relativos del gen de interés con referencia al gen endógeno. En cambio en la cuantificación absoluta, se puede detectar la concentración inicial de ADN diana, añadiendo simplemente unos controles externos con concentraciones conocidas y crecientes de ADN diana (curva patrón) en los ciclos de amplificación. En el termociclador de la qPCR el programa informático va registrando el incremento de fluorescencia en cada ciclo, el cual es proporcional al aumento del ADN. Esta información se refleja gráficamente en curvas de cinética de la reacción para cada una de las muestras y controles (Figura 2.6; Costa, 2005). Para obtener los resultados de la amplificación, se debe obtener los valores del ciclo umbral (Ct por sus siglas en inglés), que son determinados por la identificación del ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente se eleva por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción de la PCR. En otras palabras, el valor Ct está representado por el ciclo en el cual la producción de fluorescencia cruza el umbral establecido (Rodríguez y Rodríguez, 2006).



**Figura 2.6. Curva de estandarización a partir de diluciones seriadas de ADN conocidas para la cuantificación absoluta de la qPCR (Olvera-Ramírez, sin publicar).**

Es importante considerar que un valor Ct superior a 40 ciclos indica que no hay amplificación y por consiguiente no deben incluirse en los cálculos. En la actualidad hay software que puede determinar valores Ct mediante un análisis matemático de la curva de crecimiento pudiendo tener así una mejor reproducibilidad en las pruebas de PCR en tiempo real (Dorak, 2008). Las curvas de desnaturalización representan la relación que existe entre la fluorescencia y la temperatura. Se realizan para corroborar la identidad del amplicón luego del ensayo de PCR. La medida de la fluorescencia dependiente de la temperatura se realiza mientras la temperatura en el termociclador aumenta de alrededor de 50°C a 95°C, siendo la fluorescencia detectada dependiente de la presencia de secuencias de doble cadena de ADN o ADN monocatenario (Costa, 2005; Rodríguez y Rodríguez, 2006).

Las dobles cadenas de ADN o ADN monocatenario se separan por efectos de la temperatura, la fluorescencia disminuye porque el colorante deja de estar unido al producto de la PCR. La mayoría de los instrumentos proporcionan un análisis de estos datos teniendo en cuenta el punto en donde aparece el primer diferencial negativo de la señal de fluorescencia con respecto a la temperatura y la temperatura de fusión. Este punto aparece como uno o más picos que representan las temperaturas a las que los máximos niveles de cambio de la fluorescencia se producen (Lee *et al.*, 2002). Por lo tanto, para discriminar los productos específicos de la PCR es necesario saber que estos se disocian a una temperatura más alta que los artefactos como primers dimers (Figura 2.7; Costa, 2005).



**Figura 2.7. Análisis de la curva de fusión (obsérvese la diferencia entre un pico elevado a partir del control negativo que indica la formación de primer-dimers; mientras que el segundo indica la disociación del amplicón de la PCR (Costa, 2005).**

#### **2.4.2.4. Uso de la qPCR en el diagnóstico molecular.**

Las ventajas de la qPCR son las siguientes:

- i. La qPCR es rápida, ya que no se necesita ningún proceso adicional de detección.
- ii. Utiliza sistemas cerrados, disminuyendo así el riesgo de contaminación.
- iii. El análisis de qPCR se realiza a partir de una amplia variedad de muestras clínicas, tales como tejidos frescos y fijados en parafina, secreciones corporales, líquido cefalorraquídeo, sangre total, plasma, leucocitos, material fecal, exudados de garganta, vaginales o anales, etc.
- iv. Se pueden detectar diversos microorganismos como virus y bacterias a nivel cualitativo (presencia o ausencia) y cuantitativo (carga viral) (Aguilera *et al.*, 2014).

#### **2.4.2.5. Cuantificación de enterobacterias mediante la técnica de qPCR**

La qPCR también se ha utilizado para detección o identificación de algunas especies patógenas de la familia *Enterobacteriaceae*. Guy *et al.* (2014) por medio de la qPCR múltiple detectaron y cuantificaron en muestras fecales de animales de vacas lecheras la cepa O157 de *E. coli* usando diversos oligonucleótidos específicos para los genes codificantes de la toxina shiga (uno de los principales factores de virulencia para los géneros patógenos de enterobacterias), utilizando como un límite mínimo de referencia  $10^1$  copias del gen equivalentes a  $10^1$  bacterias. Los resultados encontrados fueron un total de  $10^3$  amplicones

generados en el qPCR por un gramo de muestras fecales, por lo que concluyeron que es una herramienta muy fundamental en el diagnóstico cuyo los animales cursen con enfermedades de este microorganismo, y como herramienta útil en la salud pública.

Por su parte, Castillo *et al.* (2006) cuantificaron poblaciones de bacterias, enterobacterias y lactobacilos en muestras de yeyuno de cerdos por qPCR comparando con técnicas tradicionales de conteo como el conteo por epifluorescencia directa en medio de cultivo Agar Mac Conkey. Los resultados arrojaron variaciones mínimas en el conteo total de bacterias por ambas técnicas, pues en el qPCR se obtuvieron alrededor de  $11.1 \pm 0.88 \log_{10}$  copias de genes/g de muestra, mientras que en el conteo tradicional obtuvieron  $7.8 \pm 0.88 \log_{10}$  de bacterias/g de muestra en el conteo total de bacterias. Sin embargo, en el caso de enterobacterias, con la primera técnica se obtuvieron  $8.4 \pm 0.56 \log_{10}$  de copias del gen y en la segunda  $4.8 \pm 1.68 \log_{10}$  de bacterias por g de muestra, confirmando la presencia de la familia *Enterobacteriaceae* en esta porción del tracto gastrointestinal de estos animales. Sekse *et al.* (2005) utilizaron los genes stx1 y stx2 de la toxina shiga de *E. coli* para identificar por qPCR este enteropatógeno en heces de ovinos en mediciones equivalentes a  $10^2$ - $10^3$  UFC/g de heces, detectando niveles de stx1 de  $10^3$ - $10^4$  UFC/g de heces, mientras que usando el gen stx2 se detectaron niveles bajos de UFC en todas las muestras, afirmando que este ensayo puede ser útil al detectar animales que sean portadores de bacterias productoras de toxina shiga.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El uso de antibióticos en las dietas de los animales domésticos ha ocasionado que se desarrollen problemas de resistencia en enteropatógenos (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008), por lo que su uso en la producción animal está prohibido. No obstante, el implementar aditivos de origen natural que ayuden a disminuir la colonización de enteropatógenos en el tracto gastrointestinal es una de las principales razones para el uso de probióticos. Además de mejorar los parámetros productivos en la producción animal, lo cual se relaciona con la eficiencia del metabolismo intestinal, al aumentar el aprovechamiento de nutrientes (Carro, 2014; Gaggia *et al.*, 2010).

En el caso específico de las levaduras, se ha reportado que su uso en rumiantes, principalmente en vacas lecheras y bovinos de carne, es para prevenir y contrarrestar desórdenes en la microbiota ruminal de los animales causado por el consumo de concentrados con alto contenido energético (Sales, 2011), lo cual disminuye el pH ruminal, aumenta las poblaciones productoras de ácido láctico y ocasiona así desórdenes metabólicos como la acidosis ruminal (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010). Sin embargo, existen trabajos que reportan resultados inconsistentes, desde aquellos que afirman que existe un efecto probiótico en el rumen, hasta aquellos que concluyen que la implementación de la levadura en las dietas no tiene efecto alguno (Carro, 2014; Tripathi y Karim, 2011), debido a que existe muchos factores que pueden influir en la ausencia o presencia de efecto, tal como las propiedades del producto usado, su viabilidad, la cantidad usada y la duración del tratamiento. Mientras que en los factores debidos a los animales, puede considerarse su edad, las condiciones de manejo en las unidades y las condiciones higiénico- sanitarias en las que se encuentran (Carro, 2014).

En cuanto a los trabajos que hablan del efecto reductor de colonización de enteropatógenos en el tracto gastrointestinal de los animales, se han realizado en su mayoría con géneros específicos de carácter patógeno y zoonótico – *Escherichia* spp., *Salmonella* spp.- de la familia *Enterobacteriaceae*, tanto *in vitro* como *in vivo*, donde confirman que la administración de *Saccharomyces cerevisiae* y *S. boullardii* disminuye la cantidad de UFC y la presencia de signos

clínicos de las enfermedades que desencadenan (Bach *et al.*, 2003; Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010; Haldar *et al.*, 2011).

En pequeños rumiantes los estudios se enfocan principalmente a evaluar efectos en el medio ruminal y en los parámetros productivos. Sin embargo, Stella *et al.* (2007) reportan que la levadura no tiene efecto significativo sobre la familia en general en cabras lecheras, pero no se establece claramente la causa. De la misma manera Kumagai *et al.* (2004) no encontraron cambios en la misma familia, sin embargo, los mismo autores mencionan que la levadura en lugar de ejercer un efecto reductor, tiene un efecto modulador de esta familia en el tracto gastrointestinal de ovinos adultos por lo que puede evitar el aumento de UFC, y puede ser benéfica la implementación de la levadura en la dieta de los animales en desarrollo y así reducir la incidencia y prevalencia de enfermedades gastrointestinales causadas por algunos microorganismos pertenecientes a esta familia bacteriana. El presente trabajo pretende evaluar el efecto de la levadura viva sobre la familia *Enterobacteriaceae* en corderos de engorda.



#### **4. HIPÓTESIS**

La suplementación de la levadura viva (*Saccharomyces cerevisiae*) en la dieta disminuirá la cantidad de UFC de la familia *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal de corderos de raza Blackbelly.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto que tiene la adición en la ingesta diaria de la levadura concentrada (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre la supervivencia de las enterobacterias que se ubican en diversas porciones del tracto digestivo de los corderos de engorda.

#### **6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Estandarizar las técnicas moleculares: PCR punto final y qPCR, para la identificación y cuantificación de la familia *Enterobacteriaceae*.
2. Determinar el efecto de *Saccharomyces cerevisiae* sobre las enterobacterias mediante la cuantificación de las UFC detectadas por medio de la qPCR.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1. Lugar experimental, animales experimentales y manejo**

Se utilizaron muestras de un experimento experimental de bloques al azar, el cual fue llevado a cabo en la Nave de Infectómica Animal (NINFA) de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, la cual está ubicada en Amazcala, Municipio del Marqués, a los 20° 42' 40.8 N y 100° 15' 24.7" O con altura de 1930 msnm; con clima de tipo templado semi seco con precipitación con precipitación anual promedio de 400 a 500 mm<sup>3</sup> (INAFED, 2014). Por cada bloque se utilizaron 20 animales de raza Blackbelly recién destetados, con un peso inicial promedio de 17 kg; desparasitados con closantil y vacunados (BOBACT 8) previamente de acuerdo al calendario de inmunizaciones de la posta ovina universitaria dos semanas antes de iniciar los experimentos.

Los animales fueron estabulados en corraletas individuales de cemento (3 x 2 m); con piso ranurado de concreto, con divisiones móviles a base de malla borreguera (1.5 a 2 m<sup>2</sup> por animal). Los corderos fueron alimentados con una dieta de engorda a libre acceso.

### **7.2. Tratamientos**

Durante los experimentos, se evaluaron 4 tratamientos, de los cuales en este trabajo solo se evaluaron 2: a) animales control, suplementados con la dieta experimental y; b) animales suplementados con dieta diaria más la inclusión de 2.5g equivalente a 6.1X10<sup>7</sup> UFC de levadura *Saccharomyces cerevisiae* cepa PY (Safmex, S.A. de C.V.). La cepa de levadura fue esparcida sobre el alimento (top dressing) durante 29 días contó con 7 días previos al inicio de cada bloque para la adaptación de los animales a la dieta.

### **7.3. Dieta experimental**

La dieta experimental proporcionada a los corderos a lo largo de cada experimento fue de engorda con una proporción de concentrado y forraje de 86:14 conformada de los siguientes ingredientes: maíz molido (65%), pasta de soya (10%), melaza (8%) y pre mezcla de minerales (3%) y heno de alfalfa (14%).

#### **7.4. Toma de muestras evaluadas de heces**

El muestreo de heces se realizó en los días 01, 21 y 28 de ambos bloques de acuerdo al Department of Primary Industries NSW (2015) bajo el siguiente protocolo:

- Inmovilización del animal mediante contención física, dejando expuesta la porción caudal a la persona encargada de tomar la muestra.
- Se pasó suavemente un dedo enguantado y lubricado en la región recto-anal donde masajeando suavemente la pared rectal se estimuló la evacuación fecal.
- Las heces se depositaron en una bolsa transparente limpia libre de DNAasas y RNAasas, rotuló en la misma la fecha de muestreo y el número de identificación del animal.

Después de ser obtenidas se mantuvieron en refrigeración, posteriormente en congelación a temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **7.5. Toma de muestras evaluadas de rumen.**

Después de la matanza de los animales, se extrajo el rumen para tomar muestras del contenido ruminal, el cual fue de la siguiente manera:

- Se realizó una incisión a la altura del saco dorsal, dejando expuesto el lumen, de donde se extrajo en un tubo de 1.5 ml, y un tubo falcon de 15 ml de contenido ruminal.
- Los tubos se conservaron en nitrógeno líquido para en un lapso no mayor de 6 horas posterior al muestreo se conservaron a temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

#### **7.6. Técnicas moleculares.**

##### **7.6.1. Extracción de ADN de los contenidos de rumen y heces.**

Para la extracción de ADN de las muestras obtenidas se utilizó el kit de extracción Mo Bio® powersoil® (USA) llevándose a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante, el cual se describe en el Anexo 1 del presente trabajo.

### 7.6.2. Estandarización del gradiente y detección de las enterobacterias por PCR punto final.

Para la Estandarización del gradiente de amplificación del ADN de enterobacterias en las muestras de los corderos se realizó primeramente un PCR con 1 gradiente de temperaturas de alineaciones con ADN extraído a partir de colonias conservadas en glicerol de *Salmonella entérica* subesp. *montevideo* se usó una mezcla de reacción preparado a partir del kit para PCR punto final Takara (Premix Taq DNA Polymerase, Takara, USA), obteniendo una muestra con volumen final de 15 µl (Cuadro 7.1), usó el termociclador para punto final Bio Rad C1000 (Singapore). La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para el PCR (Nava, sin publicar) se describe en el Cuadro 7.2.

**Cuadro 7.1. Reactivos para la mezcla de PCR.**

Reactivos para la PCR mix: 15 µl	Volumen (µl)
Taq polimerasa	0.075
Buffer 10x	1.96
dNTP's	1
Oligo entero Antisentido	0.5
Oligo entero sentido	0.5
H2O Estéril uso molecular	8.97
DNA	2

**Cuadro 7.2. Oligonucleótidos utilizados para la Amplificación del DNA de las enterobacterias en la mezcla de reacción.**

Oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido	Orientación
Oligo Entero sentido: 5'	GCAGTCGGGAATATTGCA	Sentido
Oligo Entero Anti Sentido: 3'	AAGGGCACAACCTCCAA	Antisentido

Las diversas temperaturas del gradiente de amplificación fueron (Nava, sin publicar): 65, 64.5, 63.3, 61.4, 61, -59, 57, 56.7, y 55°C. El ciclo de amplificación se describe en el Cuadro 7.3.

**Cuadro 7.3. Ciclo de amplificación para la detección de enterobacterias en población control y muestras de rumen y heces.**

<b>Proceso del ciclo</b>	<b>Número de ciclos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo (minutos)</b>
Desnaturalización inicial del DNA	1	95°C	3:00
Desnaturalización del DNA	32	94°C	0:30
Alineación de los oligonucleótidos	32	1 gradiente (55°C-65°C)	0:30
Extensión	32	72°C	0:30
Extensión final	1	72°C	7:00
Conservación del producto obtenido		4°C	Tiempo indefinido

### **7.6.3. Determinación de la cinética bacteriana para la extracción de ADN de la población bacteriana control**

Para determinar la cinética bacteriana de *Salmonella typhimurium* se siguió el siguiente procedimiento:

#### **7.6.3.1. Activación de la Bacteria**

Se activó a *S. typhimurium* a partir de colonias preservadas en glicerol tomó 100 µl y -se depositaron en tubos con 3 ml de caldo Soya tripticaseína (TS) incubándose a 35°C por 18 horas.

#### **7.6.3.2. Realización de la cinética bacteriana**

Se creció y determinó la cinética bacteriana por espectrofotometría del control positivo de la siguiente manera:

- 1) Se tomaron 100 µl del caldo incubado para depositarlos en un tubo con 25 ml de caldo ST; realizó una réplica y contó con un control negativo para la comparación del crecimiento y verificación de la inocuidad del caldo por la esterilización.
- 2) Al momento de la inoculación se sometió a lectura de una muestra de 1 ml de cada uno de los tubos en un espectrofotómetro, donde se tomó como dato la densidad óptica.

- 3) Posterior a la inoculación, a cada hora se tomó la lectura de la densidad óptica para obtener el de la bacteria hasta la fase estacionaria y así obtener la etapa logarítmica de crecimiento.
- 4) Los datos al terminar fueron graficados para determinar el tiempo de incubación de la bacteria para la extracción de ADN.

#### **7.6.4. Crecimiento y conteo de Unidades Formadoras de Colonias de la población control para obtención de ADN.**

Se desarrolló el crecimiento y la cuantificación de UFC de *S. typhimurium* en dos experimentos, el primero para trabajar en la estandarización de las curvas estándar del qPCR y el segundo para el análisis de las muestras experimentales. Ambos experimentos se desarrollaron de la siguiente manera:

- 1) Se activó la cepa de *S. typhimurium* conservada en glicerol tomó 100  $\mu$ l y se activó en dos tubos con 3 ml de caldo TS dejándose incubar 12 horas a 35°C.
- 2) Transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron 100  $\mu$ l de uno de los dos tubos de 3 ml para depositarlos en los tubos de 50 ml con 25 ml de caldo TS.
- 3) Se incubaron por 6 horas (de acuerdo con la cinética bacteriana calculada) a 35°C.
- 4) Se tomó 1 ml de cada tubo de 50 ml para hacer diluciones seriadas, que fueron de la  $10^1$  a la  $10^8$  (depositó en 8 tubos falcon de 15ml, 9 ml de PBS, tomó 1 ml de caldo depositó en el primer tubo, mezcló en el vórtex brevemente, repitiendo este paso en los 7 tubos restantes).
- 5) La siembra de las diluciones se hizo por vaciado en placa, en una campana de flujo laminar de la siguiente manera:
  - Se agregó en cajas de petri (100x15mm) 1ml de cada una de las siguientes diluciones:  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  y  $10^8$ .
  - Posteriormente se agregó 15 ml aproximadamente de medio sólido TS atemperado a 45°C en cada una de las cajas petri, se homogenizó suavemente en dirección a las manecillas del reloj y viceversa.
  - Se dejaron solidificar los medios por 30 minutos aproximadamente, se incubaron a 35°C por 12 hrs.

- Se realizó el conteo de colonias de cada una de los medios de cultivos, con ayuda de un contador de colonias.
- Se registraron los datos obtenidos en una hoja de cálculo para su posterior análisis.

#### **7.6.5. Extracción de DNA de la población bacteriana control**

Para la extracción de DNA de las alícuotas del caldo en crecimiento se utilizó el kit de extracción Mo Bio® power lizer® (USA), siguiendo las indicaciones de los fabricantes (Anexo 1) con las siguientes modificaciones:

- 1) Para la realización del pellet de las bacterias crecidas en el caldo TS, se centrifugó a 8000 RPM por un lapso de 5 minutos, desechándose el sobrenadante trató de conservar el pellet formado.
- 2) Se adicionaron 750 µl de Bread solution al tubo con el pellet mezcló en el vórtex las muestras brevemente, administró 60 µl de la solución C1 (verificó previamente que esta no estuviera precipitada, en caso de estarlo se calentó a una temperatura de 61°C). Inmediatamente se mezcló en vórtex varias veces para homogenizar.
- 3) Se pasó la mezcla realizada al tubo glass bread y se introdujo al homogenizador Bead Bating por 45 segundos a 2,500 RPM. Los productos de las extracciones se conservaron a temperatura de -20°C para su posterior análisis.

#### **7.6.6. Estandarización de la curva estándar y análisis de pool's de los grupos de muestras con SYBER Green Takara**

Para la estandarización de la curva estándar se realizaron 3 ensayos, elaborando diluciones 1:10 seriadas a partir del ADN extraído de *S. typhimurium* de la siguiente manera: i) se hicieron alícuotas de 90 µl de agua de uso molecular en 5 tubos de 1.5 ml; -ii) del tubo con el ADN de la bacteria (identificado como tubo 0) se tomaron 10 µl y se depositaron en el tubo 1 con los 90 µl de agua de uso molecular. iii) el paso i se repitió en los otros 4 tubos; obteniendo estas concentraciones de ADN (Cuadro 7.4):

**Cuadro 7.4. Concentraciones de ADN de las diluciones quíntuples seriadas para la Estandarización de la curva de PCR tiempo real.**

<b>Tubos</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Concentración De DNA (ng/μl)	39.3	9.93	0.393	0.0393	0.00393	0.000393

Para el PCR tiempo real se utilizó la enzima SYBER Green Takara (SYBER premix ex taq II, Shiga, Japan), se realizó la mezcla para el PCR con los reactivos que describen en ~~el la~~ cuadro 7.5 para obtener así un volumen total de producto de PCR de 17 μl:

**Cuadro 7.5. Reactivos para la mezcla de amplificación para el PCR tiempo real.**

<b>Reactivos para la PCR mix cbp: 17 μl</b>	<b>Volumen (μl)</b>
SYBER premix ex taq II	8.15
Oligo entero R	0.65
Oligo entero F	0.65
H2O Estéril uso molecular	5.54
DNA	2

La estandarización de la curva en los tres ensayos se realizaron por triplicado, dando como resultado tres curvas de estandarización, el ciclo del PCR tiempo real fue el usado en el punto final, modificándose el número de ciclos a 35; el cual es especificado en el cuadro 7.1 del punto 7.6.2.

Los datos obtenidos de la cuantificación se analizaron automáticamente por medio del software Bio-Rad CFX manager, que es compatible con el termociclador C1000 y el cabezal para qPCR CFX 96 Real Time System (Bio-Rad, USA), donde arroja la curva estándar de las diluciones de DNA preparadas, la curva de disociación (para evaluar si la corrida tuvo problemas de contaminación) y el valor del Ct.

El cuarto ensayo consistió en analizar cuantitativamente los tratamientos de las muestras mediante la preparación de pool's a partir del DNA de cada una de las muestras y de todas las porciones experimentales de la siguiente manera: i) se rotularon tubos de 1.5 ml de acuerdo a los grupos experimentales: A= grupo



control y B= grupo con la adición de levadura en la dieta. ii) de cada uno de los tubos con el DNA diluido a 5 ng/μl (utilizados en el PCR punto final) de las muestras de heces y ruminales de los animales, se tomó 1 μl y se depositó en el tubo marcado según el grupo al que pertenecía el individuo. La mezcla resultante se utilizó como DNA para la cuantificación de los amplicones.

Se realizó la curva estándar por duplicado, al igual que la mezcla del DNA por grupos. El volumen de las reacciones para qPCR se realizó en base a cuadro 7.5; los datos obtenidos de la cuantificación se analizaron automáticamente por medio del software Bio-Rad CFX manager, (Bio-Rad, USA).

#### **7.6.7. Estandarización de la curva estándar y análisis de pool de las muestras por qPCR con kit Thermo scientific**

Se realizaron 4 experimentos para la Estandarización de la curva estándar del qPCR con el kit Thermo scientific Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific, USA), los primeros tres ensayos se realizaron para la estandarización de la curva estándar, elaborándose diluciones 1:5 seriadas a partir del DNA extraído de *S. typhimurium*, de la siguiente manera: i) se hicieron alícuotas de 80 μl de agua de uso molecular en 6 tubos de 500 μl; ii) del tubo con el DNA de la bacteria (identificado como tubo 0) se tomaron 20 μl y se depositaron en el tubo 1 con los 80 μl de agua de uso molecular. iii) el paso i se repitió en los otros 7 tubos; obteniendo estas concentraciones de DNA (Cuadro 7.6):

**Cuadro 7.6. Concentraciones de DNA de las diluciones quintuples seriadas para la Estandarización de la curva de PCR tiempo real.**

<b>Tubos</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Concentración de DNA (ng/μl)	62.25	12.45	2.49	0.498	0.096	0.01992

Para el PCR en tiempo real se utilizó como marcador el SYBR GREEN #0259 (Thermo scientific, USA), se realizó la mezcla para el PCR con los reactivos que describen en el cuadro 7.7 para obtener así un volumen total de producto de PCR de 17 μl:

**Cuadro 7.7. Reactivos para la mezcla de amplificación para el PCR tiempo real.**

<b>Reactivos para la PCR mix cbp: 17 µl</b>	<b>Volumen (µl)</b>
SYBR Green #0259	8.15
Oligo Enterobacterias Antisentido	0.65
Oligo Enterobacterias Sentido	0.65
H2O Estéril uso molecular	5.54
DNA	2

La estandarización de la curva en los 3 experimentos se realizó por duplicado, dando como resultado dos curvas de estandarización. El ciclo del PCR tiempo real se realizó en base a las recomendaciones dadas por los fabricantes en el punto final, conservándose la temperatura de alineación usada en el punto final, el cual es especificado en el cuadro 7.8. Los datos obtenidos de la cuantificación se analizaron automáticamente por medio del software Bio-Rad CFX manager, que es compatible con el termociclador C1000 y el cabezal para qPCR CFX 96 Real Time System (Bio-Rad, USA), donde arroja la curva estándar de las diluciones de DNA preparadas, la curva de disociación (para evaluar si la corrida tuvo problemas de contaminación) y el valor del Ct.

**Cuadro 7.8. Ciclo de amplificación qPCR SYBR Green Thermo Scientific.**

<b>Proceso del ciclo</b>	<b>Número de ciclos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo (minutos)</b>
Precalentamiento	1	50°C	2:00
Desnaturalización inicial del DNA	1	95°C	10:00
Desnaturalización del DNA	40	95°C	0:15
Alineación de los oligonucleótidos	40	1 gradiente (55°C-65°C)	0:30
Extensión	40	72°C	0:30
Conservación del producto obtenido	1	4°C	Tiempo indefinido

El cuarto ensayo, consistió en el análisis representativo de los grupos experimentales, donde se utilizaron las mezclas del DNA de las muestras por grupos. La curva estándar y las muestras se analizaron por duplicado, con el volumen de las reacciones descritas en el cuadro 7.7. Los datos obtenidos de la cuantificación se analizaron automáticamente por medio del software Bio-Rad CFX manager, (Bio-Rad, USA), mientras que los datos del número de amplicones se procesaron en una hoja de cálculo de Excel para su posterior análisis estadístico.

#### 7.6.8. Análisis individual de las muestras experimentales

Se realizó el análisis individual del DNA de las muestras de contenido ruminal y heces, usó SYBER Green #0259 (Thermo Scientific, USA), con volumen final de las reacciones de 17 µl y el ciclo de la PCR conforme al cuadro 7.8. La curva estándar y las muestras se realizaron por duplicado, siendo automáticamente analizados los datos obtenidos por el software Bio-Rad CFX manager (Bio-Rad, USA).

#### 7.7. Análisis estadístico

Los datos de las amplificaciones de las muestras en el qPCR se procesaron en una hoja de cálculo de Excel (Microsoft, USA) para su respectivo análisis estadístico, donde se ordenaron por experimento y grupo experimental, transformándose a Log<sub>10</sub> para la distribución normal. Posteriormente, en el

Software SPSS statistics v22 (IBM, USA), se analizaron estadísticamente las muestras de contenido ruminal se realizó un análisis de varianza entre dos grupos (Prueba de t de student); mientras que las muestras de heces por el análisis de varianza para muestras repetidas con el siguiente modelo estadístico de medidas repetidas por bloques al azar:

$$Y_{ijkln} = \mu + B_i + T_j + A_{(j)k} + D_l + TD_{jl} + \epsilon_{(ijkl)n}$$

Donde:

$Y_{ijkln}$  = efecto de la levadura sobre la cantidad de UFC de enterobacterias fecales de los corderos en el experimento

$\mu$  = Media poblacional

$B_i$  = Efecto de la levadura por bloque experimental

$T_j$  = Efecto de la levadura por tratamiento

$A_{(j)k}$  = efecto de la levadura en los animales entre tratamientos

$D_l$  = Efecto de la levadura por día experimental (01, 21 y 28)

$TD_{jl}$  = interacción del efecto entre tratamiento y día experimental

$\epsilon_{(ijkl)n}$  = error aleatorio.

Considerando diferencia estadística con valores de  $P < 0.05$ .

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Estandarización de las técnicas moleculares.

Los resultados de —la cinética bacteriana del control positivo (*Salmonella typhimurium*) nos muestra que el crecimiento de la bacteria llega al final de la fase logarítmica alrededor de las 6 horas de incubación (Anexo 2, Figura 11.1). La cuantificación de UFC de *S. typhimurium* fue de  $9.1 \times 10^8$  UFC/ml de caldo de cultivo, este dato se utilizó para la curva estándar en la qPCR.

Para la estandarización de la amplificación del gen para identificar la familia *Enterobacteriaceae* se llevó a cabo un gradiente de temperaturas (Anexo 2, Figura 11.2); observándose que los oligonucleótidos amplificaron en todas las temperaturas del gradiente, pero la mejor intensidad de banda se observó a una temperatura de alineación de 61°C Para la estandarización de la PCR en tiempo real y el análisis de las muestras experimentales se utilizaron dos enzimas, SYBR GREEN Takara y SYBR GREEN Thermo Scientific. En las curvas estándar, de amplificación y de disociación de los tres primeros ensayos con la enzima SYBR Green takara, se obtuvieron eficiencias de 63.8, 57.6 y 51.3%, con valor de la pendiente de -4.67, -5.09 y -5.56; y valor de  $R_2$  de 0.98, 0.995 y 0.990 respectivamente. Se llevó a cabo un cuarto ensayo donde se realizaron pools del ADN extraído de las muestras de los contenidos por grupo experimental, obteniéndose una eficiencia de 84.2%, con valor de  $R=$  0.999 y valor de la pendiente de -3.768, (Anexo 2, Figuras 11.3, 11.4 y 11.5).

Con respecto a la estandarización con la enzima SYBR GREEN Thermo scientific, se realizaron 3 ensayos. En las curvas estándar, de amplificación y de disociación se obtuvieron eficiencias de 57.2, 70.8 y 49.2%; con valor de la pendiente de -5.088, -4.300 y -5.757; —y valor de  $R_2$  de 0.984, 0.974 y 0.978. Por lo tanto, se realizó el cuarto ensayo sometiendo los pools por grupos experimentales, obteniéndose una eficiencia de 95.1%, con valor de  $R_2=$  0.987 y el valor de la pendiente fue de -3.445 (Anexo 2, Figuras 11.6, 11.7 y 11.8).

## **8.2. Análisis de las muestras experimentales.**

Las muestras de contenido ruminal y heces del día 21 y 28 del primer experimento fueron analizadas mediante PCR punto final (Figura 8.1, 8.2 y 8.3), utilizando una temperatura de alineación de 61°C, –obteniéndose bandas con peso molecular alrededor de 500 pares de bases.

El análisis de la cuantificación por medio de qPCR de las muestras del contenido ruminal y las heces a los días 01, 21 y 28 de ambos experimentos se obtuvieron eficiencias de 84.6 y 83.3%, valor de R<sup>2</sup> de 0.995 y 0.999 y valor de la pendiente de -3.756 y -3.789.

Los resultados de la cuantificación de las muestras de heces no mostraron diferencia significativa entre tratamientos (P>0.05) (Cuadro 8.1; Figura 8.4), sin embargo, se observó una diferencia de excreción por días, encontrándose una notable disminución de UFC al día 28 con respecto a los dos muestreos del día 01 y día 21 (P<0.05; Cuadro 8.2).

Respecto al contenido ruminal, se encontró similar cantidad de UFC de enterobacterias en ambos grupos, mostró nulo efecto de la levadura suplementada (P>0.05) (Figura 8.5).

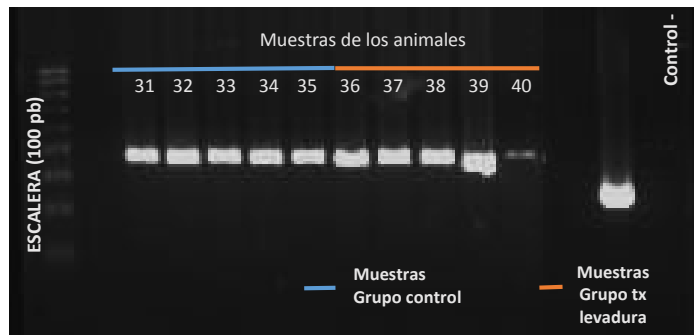


Figura 8.1. PCR punto final de muestras de contenido ruminal al día de matanza del bloque experimental 1, gel de agarosa al 1.5%; tinción con bromuro de etidio. Grupo con la dieta diaria (control negativo animales 31 al 35) y grupo suplementado con la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) en la dieta (animales 36 al 40).

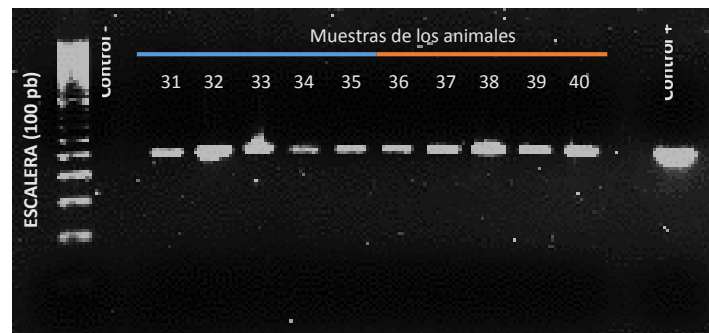


Figura 8.2. PCR punto final de muestras de heces al día 21 bloque experimental 1, gel de agarosa al 1.5%; tinción con bromuro de etidio. Grupo alimentado solo con la dieta diaria (control negativo, animales 31 al 35) y grupo suplementado con la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) en la dieta (animales 36 al 40).

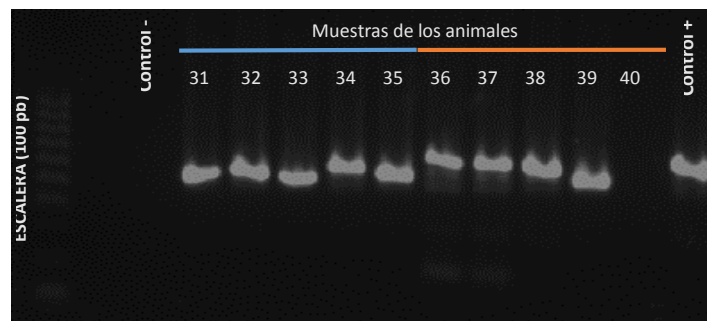


Figura 8.3. PCR punto final de muestras de heces al día 28 bloque experimental 1, gel de agarosa al 1.5%; tinción con Red gel. Grupo alimentado solo con la dieta diaria (control negativo, animales 31 al 35) y grupo suplementado con la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) en la dieta (animales 36 al 40).

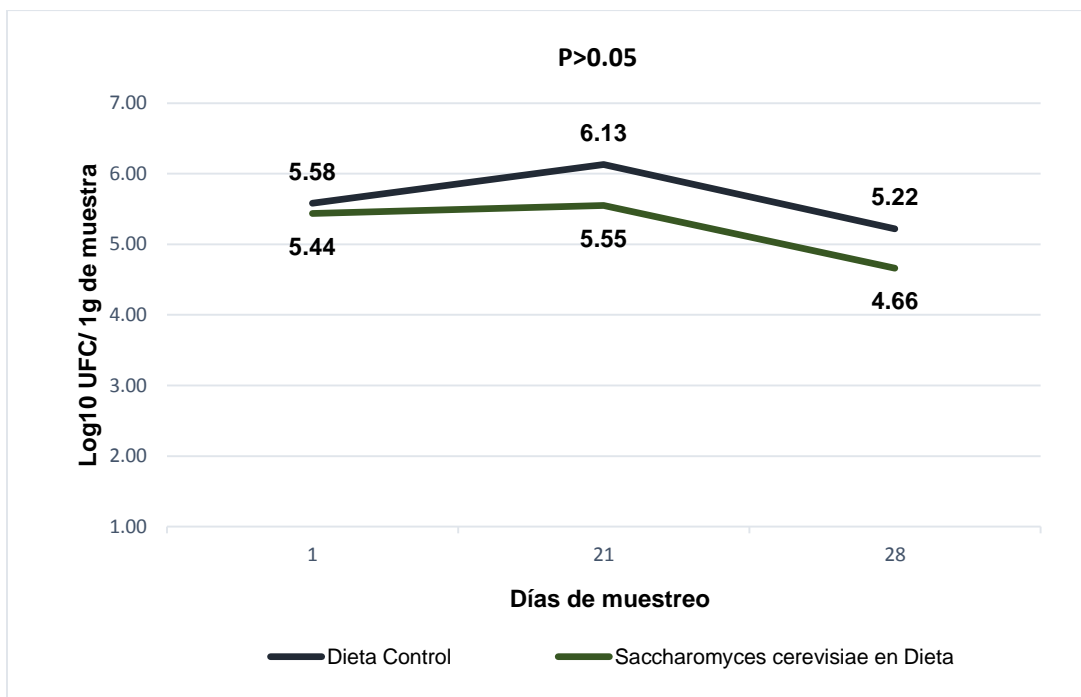


Figura 8.4. Cantidad promedio de UFC de enterobacterias en las muestras de heces al día 01, 21 y 28 experimental

Cuadro 8.1. Efecto de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la cantidad de UFC de enterobacterias en las muestras fecales de los corderos de Engorde.

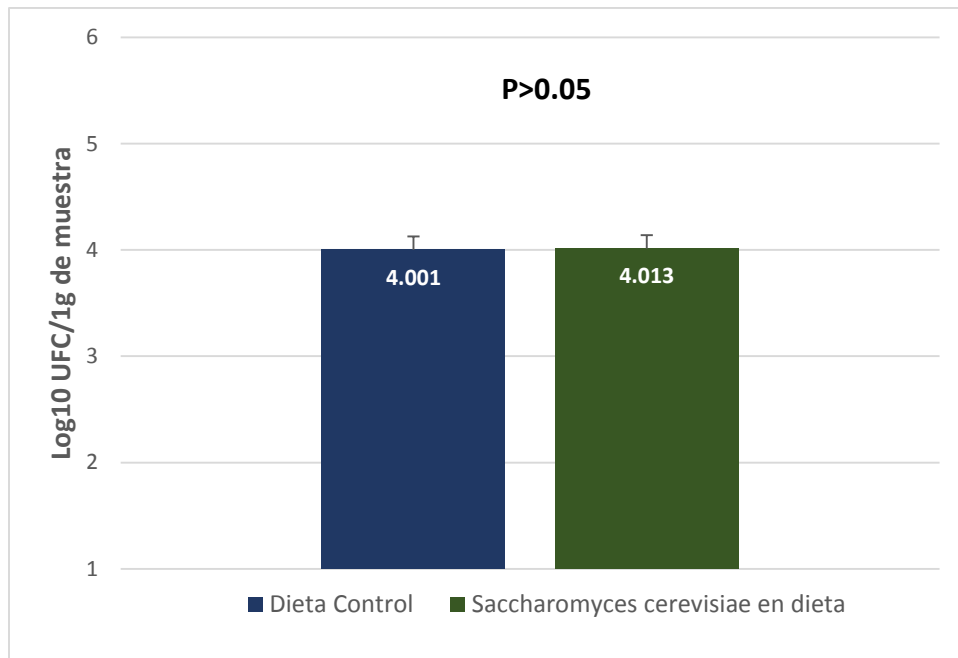
Origen de la variación	Gl	Cuadrados medios	P
Modelo	24	2.74	<.0001
Experimento	1	0.09	
Tratamiento (trt)	1	4.91	0.1667
Animal(trt)	18	2.36	
Día	2	7.21	0.0005
trt*día	2	0.56	0.5319
Error	87	0.88	
Total	111		



**Cuadro 8.2. Cantidad de UFC de enterobacterias en heces por día experimental**

Día de muestreo	Promedio Log <sub>10</sub> UFC /g Heces	Error Estándar
1	5.508 <sup>a</sup>	0.153
21	5.840 <sup>a</sup>	0.162
28	4.942 <sup>b</sup>	0.154

<sup>ab</sup> Letras distintas indican diferencia significativa (P<0.05).



**Figura 8.5. Cantidad promedio de UFC de enterobacterias en contenido ruminal de los corderos al día del sacrificio.**

## 9. DISCUSIÓN

La suplementación de levadura viva en la dieta de corderos de engorda no tuvo efecto sobre las UFC de la familia *Enterobacteriaceae* tanto en rumen como en heces; sin embargo, la excreción de UFC de enterobacterias disminuyó significativamente, al día 28. Similarmente, Stella *et al.* (2007) no encontraron diferencias de UFC de enterobacterias en heces en cabras Saanen suplementadas con levadura, pero si observaron una disminución significativa de enterobacterias en los últimos días de experimento. De la misma manera otros estudios no encontraron efecto de la levadura sobre enterobacterias totales en ovejas (Kumagai *et al.*, 2004) y en vaquillas (Ghazanfar *et al.* 2015). Sin embargo, algunos estudios establecen que *Saccharomyces cerevisiae* disminuye el riesgo de transmitir microorganismos patógenos, limitando la excreción y diseminación hacia otros animales (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008; Galvão *et al.*, 2005). Además de que reduce la incidencia de diarreas en becerros (Brewer *et al.*, 2014; Galvão *et al.*, 2005). En corderos se ha reportado que la inclusión de levadura madura el ecosistema ruminal, ya que se incrementa el establecimiento de las bacterias celulolíticas y protozoarios ciliados (Chaucheyras-Durand y Fonty, 2002, 2001). Por otro lado, en animales adultos se ha demostrado que un cambio drástico en la proporción de forraje: concentrado en los rumiantes afecta la microbiota gastrointestinal, pudiendo ocasionar un incremento de bacterias productoras de lactato (*Streptococcus bovis*) y una disminución de bacterias celulolíticas (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, y *R. flavefaciens*) cuando se dan dietas altas en concentrados (Callaway y Martin, 1997). Por lo que, la inclusión de *Saccharomyces cerevisiae* se lleva a cabo para estabilizar el pH ruminal y minimizar la producción de ácido láctico (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 1991). Además de que aumenta tanto la degradación de la fibra, como el número total de bacterias (Newbold *et al.*, 1996).

El modo de acción principal de la levadura es la disminución del oxígeno en el medio ruminal, estimulando así proliferación de bacterias celulolíticas y utilizadoras de ácido láctico (Newbold *et al.*, 1996); pero también se ha mencionado otros modos de acción como competencia de sustrato (glucosa) con

bacterias productoras del mismo así como la producción de metabolitos que pueden disminuir el crecimiento de ciertas bacterias (Callaway y Martin, 1997; Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008). En este trabajo no se evaluó la incidencia de diarreas en los corderos durante el proceso experimental, ni la maduración del rumen; no obstante no hubo cambio en el número de enterobacterias tanto en rumen, como en heces con la inclusión de levadura. Sin embargo, se ha reportado que en contenidos ruminales de animales suplementados con levadura, altos niveles de etanol disminuyen la cantidad de enteropatógenos como *Escherichia coli*; aunque pudiera ser diferente en experimentos *in vivo*, por la rápida absorción del etanol a través del epitelio ruminal (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010). Además, se han realizado estudios *in vitro* e *in vivo* donde se ha reportado un efecto reductor de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Salmonella enterica* subespecie *typhimurium* (Brewer *et al.*, 2014) y *E. coli* O157:H7, (Bach *et al.*, 2003; Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010; Liou *et al.*, 2009). Dichos estudios plantean el efecto reductor de la levadura sobre los enteropatógenos en el intestino es similar que en monogástricos. El cual se debe a un bloqueo competitivo de las lectinas bacterianas, ya que las fimbrias tipo 1 de la superficie de las bacterias patógenas reconocen específicamente las glucoproteínas de la pared celular de la levadura y las aglutinan. Evitando así la adhesión de las bacterias en la membrana celular de las vellosidades intestinales (Haldar *et al.*, 2011; Pérez, 2009). De la misma manera, en un experimento *in vitro* con heces de pollo de engorda se observó una aglutinación de *E. coli* alrededor del *Saccharomyces cerevisiae* (Guida *et al.*, 2015).

Por otro lado, en este experimento se observó un cambio significativo en la excreción de enterobacterias por día. Kumagai *et al.* (2004) reportan que dietas altas en concentrados pueden modificar las condiciones ambientales para la microbiota intestinal, ya sea por el aumento del pH, por la baja cantidad de AGV's y por la concentración de amoníaco, disminuyendo así la cantidad de UFC en la microbiota intestinal. Tales condiciones pueden estar relacionadas con disminución de UFC de enterobacterias en la última semana experimental del

presente trabajo, sin embargo no se midieron ni el pH, ni los AGV's en el intestino grueso.

Diferentes factores pudieron inferir en la ausencia de efecto de la levadura sobre el crecimiento de la familia *Enterobacteriaceae*, primeramente, la dosis. En este trabajo la dosis utilizada fue de  $6.3 \times 10^7$  UFC/día la cual es menor que lo reportado por Bach *et al.* (2003) con dosis desde 1 a  $5 \times 10^8$  UFC y Stella *et al.* (2007) con  $4 \times 10^9$  UFC/ día en el grupo tratamiento. Lo cual podría haber afectado la respuesta de la levadura con respecto al efecto reductor de las enterobacterias. Por otro lado el tipo de cepa, no todas las cepas de levadura son capaces de estimular la digestión en el rumen. Estas diferencias aparentemente no están relacionadas con el número de células de levadura viables en las preparaciones, si no con su actividad metabólica (capacidad de consumir  $O_2$  y factores de crecimiento bacteriano) (Newbold *et al.*, 1995). Otro factor fue el tiempo de duración del experimento (28 días), lapso relativamente corto con respecto a otros trabajos que se adaptan a los ciclos o etapas de producción según la especie doméstica a evaluar; tal es el caso de Stella *et al.* (2007) quienes realizaron el experimento en cabras lecheras durante la etapa de lactancia con duración de 90 días. En cambio, Brewer *et al.* (2014) suplementaron los productos de fermentación un en un lapso total de 6 semanas, antes y durante el desafío de *S. typhimurium* en las becerras lactantes. Por último, en este estudio no se monitoreó ni determinó la cantidad de UFC de *Saccharomyces cerevisiae* en el contenido ruminal ni en las muestras de heces, quedando la interrogante si la levadura suplementada en los experimentos realmente pasó del rumen al intestino. Se ha comprobado que las colonias de *Saccharomyces cerevisiae* disminuyen paulatinamente después de ser inoculadas en los animales y que la levadura no crece en el medio ruminal, pero si mantiene su actividad metabólica y su viabilidad (Castro y Rodríguez, 2005; Newbold *et al.*, 1996).

Por lo tanto, se recomienda realizar futuros experimentos en los cuales se aumente la dosis de la levadura y/o se tenga un mayor número de CFU de levadura viable, ampliar el desafío al ciclo de engorda, evaluar la presentación de diarreas y de ser posible someter a uno de los géneros patógenos de esta familia

bacteriana (*Escherichia spp.*; *Salmonella spp.*), además de revisar el efecto que la levadura ejerce sobre la familia *Enterobacteriaceae*.

## **10. CONCLUSIONES**

La administración diaria de una dosis de levadura liofilizada de *Saccharomyces cerevisiae* no tuvo influencia en la supervivencia de la familia *Enterobacteriaceae* tanto en rumen como en heces en corderos de raza blackbelly.

La excreción de UFC de enterobacterias disminuyó significativamente entre muestreos, observándose menor cantidad de excreción en el día 28.

Las técnicas de PCR y qPCR para la identificación y cuantificación de enterobacterias se lograron estandarizar, por lo que se podrán utilizar en trabajos posteriores de identificación y cuantificación de esta familia bacteriana.

## 11. ANEXOS

### Anexo 1. Protocolo de Extracción del ADN

- 1) Se pesaron 0.25 g de cada una de las muestras y se depositaron en el tubo “glass bread tube”.
- 2) Se adicionaron 750 µl de la solución de lisis (Bread solution) a tubo con micro perlas (glass bread tube) y se mezclaron en el vortex las muestras brevemente (en el caso de heces demasiado sólidas se recurrió a una primera homogenización manual con pistilos previamente esterilizados al momento de agregar esta solución).
- 3) Se añadieron 60 µl de la solución C1 (verificó previamente que esta no estuviera precipitada, en caso de estarlo se calentó a una temperatura de 61°C). Inmediatamente se mezcló varias veces para homogenizar.
- 4) Posteriormente los tubos con microperlas (glass bread) se sometieron al homogenizador (PowerLyzer Bead Bating homogenizer; Mo Bio, USA) por 45 segundos a 4,000 RPM.
- 5) Los tubos se centrifugaron a 10,000 G por 1 minuto (en el caso de las heces el tiempo se extendió a 2 minutos).
- 6) Del sobrenadante, se tomaron entre 400 a 500 µl y se depositaron en tubos nuevos de 2 ml.
- 7) Se adicionaron 250 µl de la solución C2 mezcló en el vórtex por 5 segundos, incubándose posteriormente a 4°C por 5 minutos.
- 8) Se centrifugó a 10,000 G por 1 minuto, tomó no más de 600 µl del sobrenadante para verter en un tubo nuevo de 2 ml.
- 9) Se añadieron 200 µl de solución C3 mezcló en el vórtex brevemente, incubándose a 4°C por 5 minutos.
- 10) El tubo se centrifugó a 10,000 G por un lapso de 1 minuto, tomó no más de 750 µl del sobrenadante para depositarlo en un tubo nuevo de 2 ml.
- 11) Se adicionaron 1200 µl de solución C4 (agitándola previamente) al sobrenadante mezcló por 5 segundos.

- 12) Se tomaron 675  $\mu$ l de la mezcla colocándolos en la columna con filtro (spin filter) y se centrifugaron a 10,000 g, repitiendo esto 3 veces retiró lo acumulado en el fondo del tubo posterior a la centrifugación.
- 13) Se agregaron 500  $\mu$ l de solución C5, centrifugó por 30 segundos a 10,000 G.
- 14) Se retiró lo acumulado en el fondo del tubo, volviendo a centrifugar a 10,000 G por 1 minuto.
- 15) Se removi6 con cuidado la columna con filtro y se pas6 a un tubo nuevo de 2 ml.
- 16) Se adicionaron 100  $\mu$ l de soluci6n de eluci6n (C6) a la columna con filtro, y se incub6 por 1 minuto a temperatura ambiente.
- 17) Se centrifug6 a 10,000 G por 30 segundos, se desech6 la columna con filtro, y se obtuvo el ADN.
- 18) La cantidad y calidad del ADN se determin6 mediante un espectrof6metro (Nanodrop 2000c; Thermo Scientific, USA).
- 19) El ADN de las muestras se conserv6 a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior an6lisis.

## Anexo 2. Resultados de estandarización PCR y qPCR

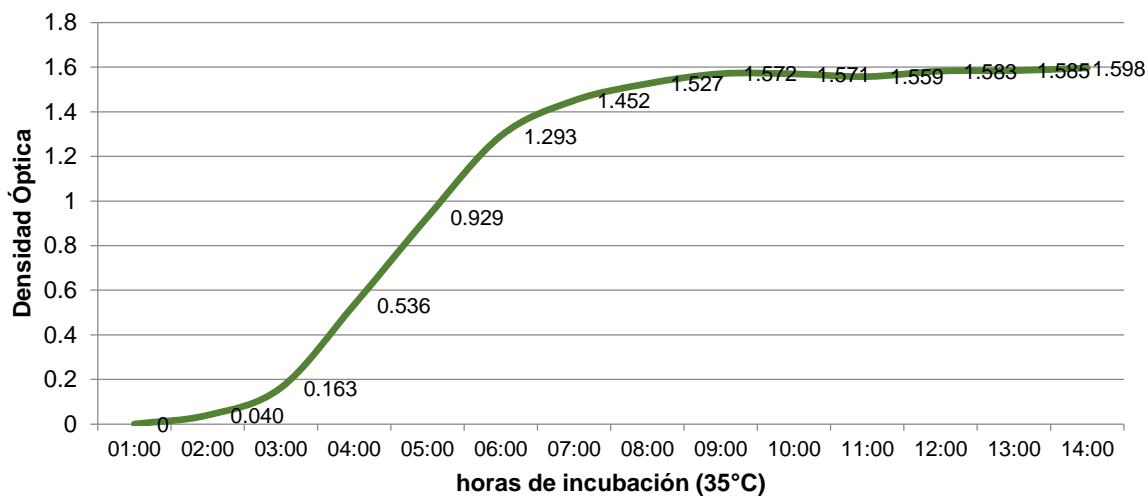
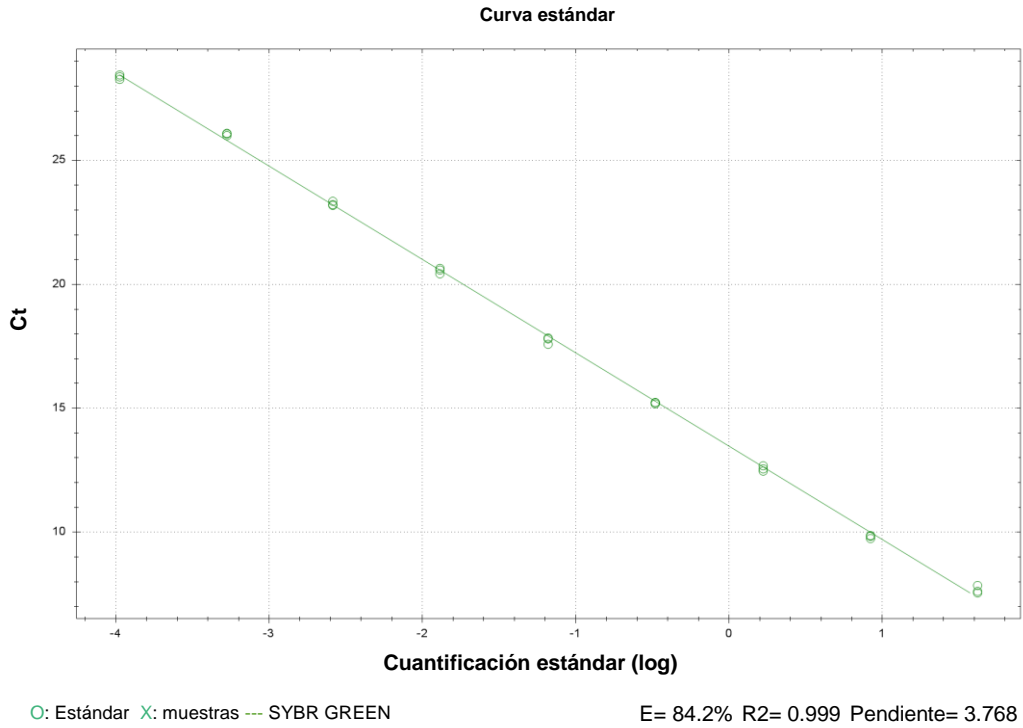


Figura 11.1 Cinética bacteriana *Salmonella typhimurium*

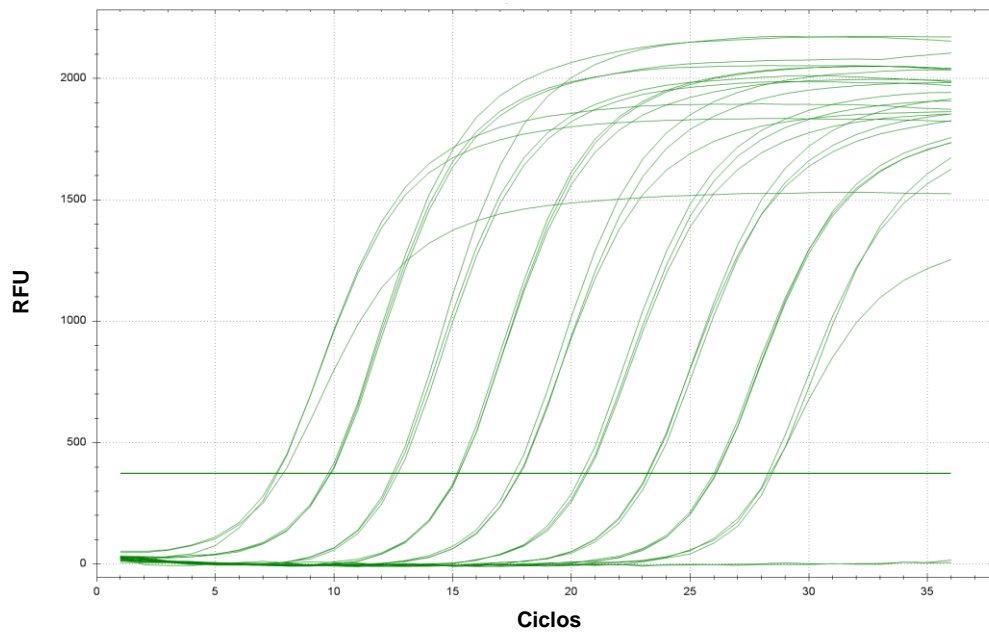


Figura 11.2 Gradiente de estandarización de PCR para amplificación de DNA de enterobacterias a partir de DNA de *S. typhimurium* (gel de agarosa al 2%; tinción con red gel).

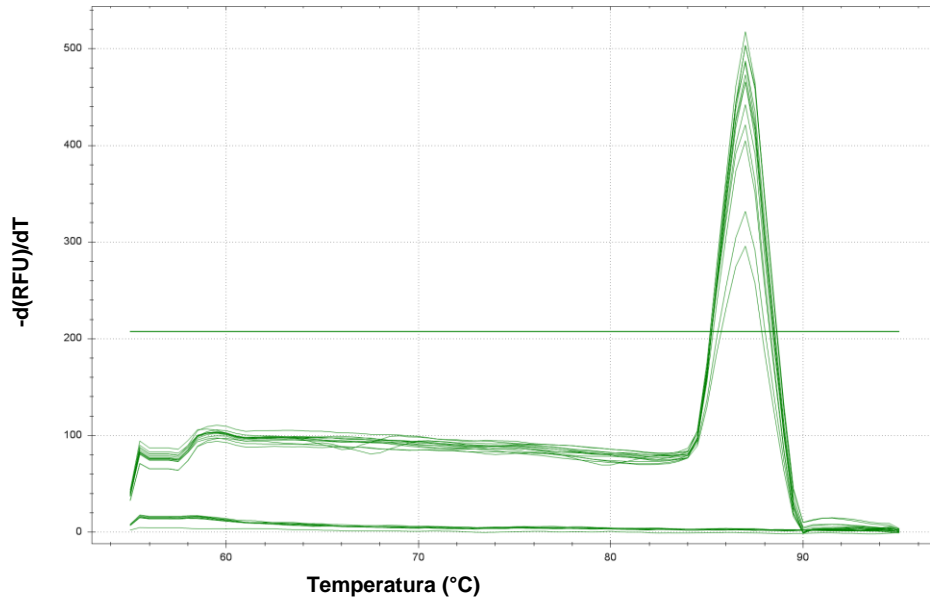




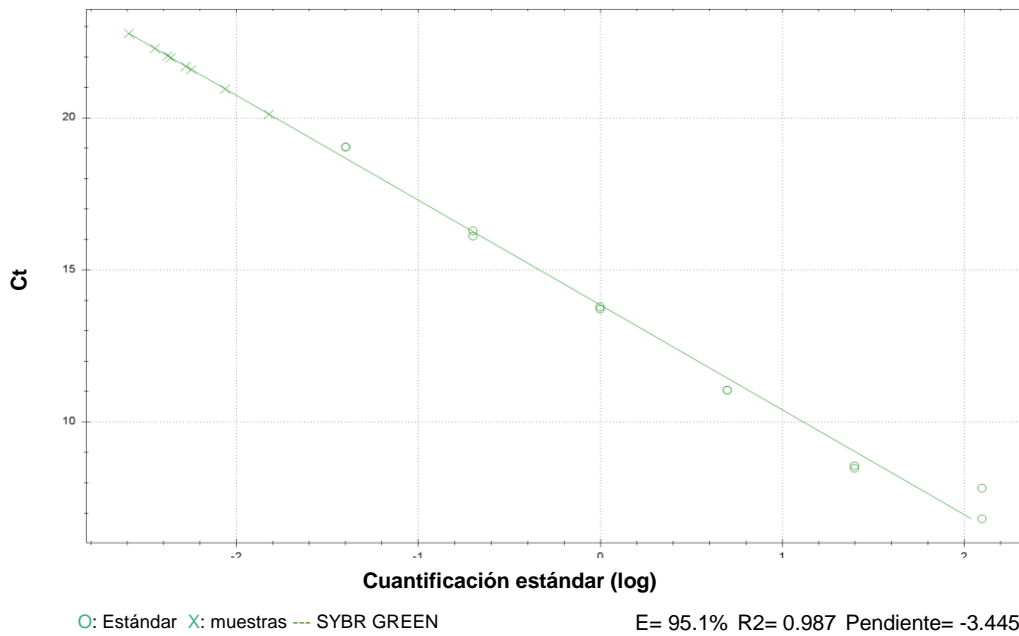
**Figura 11.3. Curva estándar qPCR cuantificación de enterobacterias con SYBR Green Takara ensayo 4.**



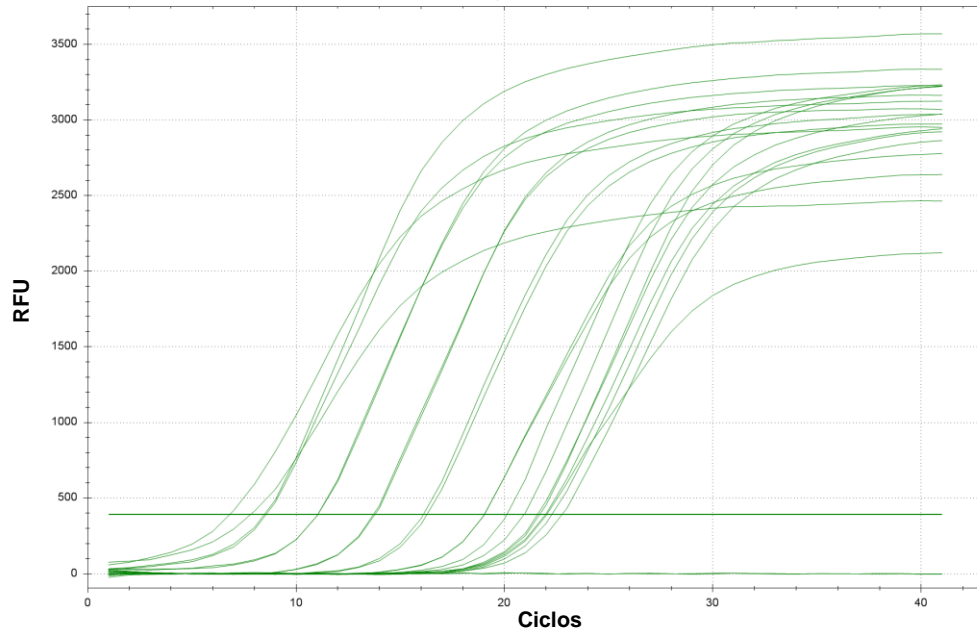
**Figura 11.4. Amplificación diluciones ADN *S. typhimurium* SYBR Green Takara ensayo 4.**



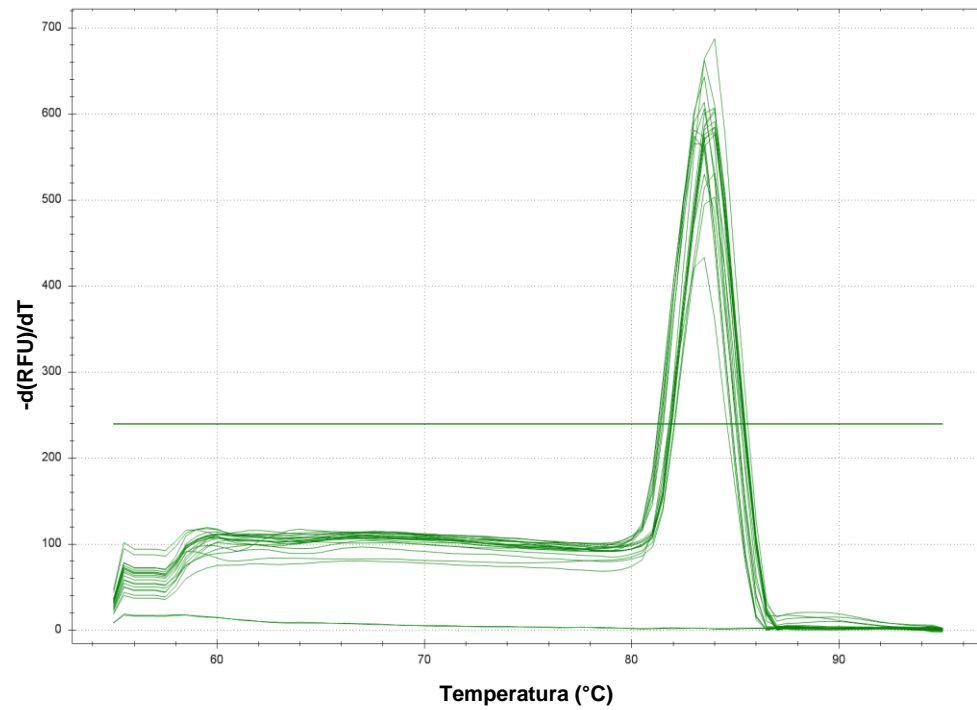
**Figura 11.5. Curva de disociación diluciones ADN *S. typhimurium* SYBR Green Takara ensayo 4**



**Figura 11.6. Curva estándar qPCR diluciones DNA *S. typhimurium* SYBR Green Thermo Scientific ensayo 4.**



**Figura 11.7 Amplificación de las diluciones DNA *S. typhimurium* SYBR Green Thermo Scientific ensayo 4**



**Figura 11.8 Amplificación de las diluciones DNA *S. typhimurium* SYBR Green Thermo Scientific ensayo 4**

## 12. LITERATURA CITADA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S., 2008. *Inmunología Celular y Molecular*, 6th ed. Elsevier Saunders, Madrid, España. 362.
- Aguilera, P., Ruiz, M., Rocha, M., Pineda, B., Chánez, M., 2014. PCR en Tiempo Real, in: *Herramientas Moleculares Aplicadas En Ecología: Aspectos Teóricos Y Prácticos*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México, pp. 175–200.
- Aranda, A., Matallana, E., Olmo, M. del, 2011. Chapter 1 - *Saccharomyces* Yeasts I: Primary Fermentation, in: Carrascosa, A.V., González, R.M. (Eds.), *Molecular Wine Microbiology*. Academic Press, San Diego, pp. 1–31.
- Auclair, E., 2001. Yeast as an example of the mode of action of probiotics in monogastric and ruminant species. *Cahiers Options Méditerranéennes* 45–53.
- Bach, A., Iglesias, C., Devant, M., 2007. Daily rumen pH pattern of loose-housed dairy cattle as affected by feeding pattern and live yeast supplementation. *Animal Feed Science and Technology* 136, 146–153.
- Bach, S., McAllister, T., Veira, D., Gannon, V.P., Holley, R., 2003. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* feed supplement on *Escherichia coli* O157:H7 in ruminal fluid in vitro. *Animal Feed Science and Technology* 104, 179–189.
- Beauchemin, K.A., Yang, W.Z., Morgavi, D.P., Ghorbani, G.R., Kautz, W., Leedle, J.A.Z., 2003. Effects of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. *Journal of Animal Science* 81, 1628–1640. doi:/2003.8161628x
- Brewer, M.T., Anderson, K.L., Yoon, I., Scott, M.F., Carlson, S.A., 2014. Amelioration of salmonellosis in pre-weaned dairy calves fed *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products in feed and milk replacer. *Veterinary Microbiology* 172, 248–255.
- Brufau, M., Martín-Venegas, R., Guerrero-Zamora, A.M., Pérez-Vendrell, A.M., Vilà, B., Brufau, J., Ferrer, R., 2015. Dietary  $\beta$ -galactomannans have beneficial effects on the intestinal morphology of chickens challenged with *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*. *Journal Animal Science* 93, 238–243.
- Callaway, E.S., Martin, S.A., 1997. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* Culture on Ruminal Bacteria that Utilize Lactate and Digest Cellulose. *Journal of Dairy Science* 80, 2035–2044.
- Carro, M.D., 2014. Presente y perspectivas de futuro en la UE: Empleo de probióticos en la Alimentación de Rumiantes. *Ganadería* 44–51.
- Castillo, M., Martín-Orúe, S.M., Manzanilla, E.G., Badiola, I., Martín, M., Gasa, J., 2006. Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR. *Veterinary Microbiology* 114, 165–170.
- Castro, M., Rodríguez, F., 2005. Levaduras: probióticos y prebióticos que mejoran la producción animal. *Revista Corpoica* 6, 26–38.

- Chaucheyras-Durand, F., Faqir, F., Ameilbonne, A., Rozand, C., Martin, C., 2010. Fates of Acid-Resistant and Non-Acid-Resistant Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains in Ruminant Digestive Contents in the Absence and Presence of Probiotics. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 640–647.
- Chaucheyras-Durand, F., Fonty, G., 2002. Influence of a probiotic yeast (*Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077) on microbial colonization and fermentations in the rumen of newborn lambs. *Microbial ecology in health and disease* 14, 30–36.
- Chaucheyras-Durand, F., Fonty, G., 2001. Establishment of cellulolytic bacteria and development of fermentative activities in the rumen of gnotobiotically-reared lambs receiving the microbial additive *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077. *Reproduction Nutrition Development* 41, 12.
- Chaucheyras-Durand, F., Walker, N.D., Bach, A., 2008. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Animal Feed Science and Technology* 145, 5–26.
- Costa, J., 2005. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real, in: Puesta al día en métodos microbiológicos para el Diagnóstico Clínico. Elsevier de España, S.L., España, pp. 89–93.
- Department of Primary Industries NSW, 2015. Standard Operating Procedures-cattle [WWW Document]. URL <http://www.dpi.nsw.gov.au/agriculture/livestock/animal-welfare/general/livestock/sop/cattle/faeces-collection> (accessed 8.8.15).
- Desnoyers, M., Giger-Reverdin, S., Sauvant, D., Bertin, G., Duvaux-Ponter, C., 2009. The influence of acidosis and live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementation on time-budget and feeding behaviour of dairy goats receiving two diets of differing concentrate proportion. *Applied Animal Behaviour Science* 121, 108–119.
- Díaz-Plascencia, D., Rodríguez-Muela, C., Mancillas-Flores, P.F., 2013. Aditivo de Levaduras de manzana para Alimentación Animal. Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Zootecnia y Ecología, Chihuahua, México.17-37.
- Dorak, M.T., 2008. Real Time PCR [WWW Document]. Genetics. URL <http://dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html> (accessed 3.31.15).
- Gaggia, F., Mattarelli, P., Biavati, B., 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology* 141, Supplement, S15–S28.
- Galí, Z.C., 2010. Enterobacterias. Antibioterapia. [WWW Document] Aliance for the prudent use of the antibiotics. URL [www.sld.cu/.../enterobacterias\\_y\\_antibioticoterapia.\\_dra\\_zuleica.doc](http://www.sld.cu/.../enterobacterias_y_antibioticoterapia._dra_zuleica.doc) (accessed 09.24.14).
- Galvão, K.N., Santos, J.E.P., Coscioni, A., Villaseñor, M., Sicho, W.M., Anna Catharina B. Berge, 2005. Effect of feeding live yeast products to calves with failure of passive transfer on performance and patterns of antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli*. *Reproduction Nutrition Development* 45, 427–440.
- Ghazanfar, S., Anjum, M., Azim, A., Ahmed, I., 2015. Effects of dietary supplementation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture on growth performance, blood

- parameters, nutrient digestibility and fecal flora of dairy heifers. *Journal of Animal and Plant Sciences* 25, 53–59.
- Guevara, J., 2011. Probióticos en la Nutrición Animal. Sistema de Revisiones en Investigación Veterinaria de San Marcos 1–9.
- Guida, N., Mesplet, M., Kotsias, F., Gonzalez, S., 2015. Evaluación del efecto de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *E coli* en la cría de pollos. *Revista electrónica de Veterinaria* 16, 1–8.
- Guy, R., Tremblay, R., Beausoleil, L., Harel, J., Champagne, M., 2014. Quantification of *E. coli* O157 and STEC in feces of farm animals using direct multiplex real time PCR (qPCR) and a modified most probable number assay comprised of immunomagnetic bead separation and qPCR detection. *Journal of Microbiological Methods* 44–53.
- Haldar, S., Ghosh, T.K., Toshiwati, Bedford, M.R., 2011. Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and yeast protein concentrate on production performance of broiler chickens exposed to heat stress and challenged with *Salmonella enteritidis*. *Animal Feed Science and Technology* 61–71.
- INAFED, 2014. El Marqués [WWW Document]. Enciclopedia de los municipios y Delegaciones de México (accessed 01.15.15).
- Klis, F.M., Boorsma, A., De Groot, P.W.J., 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23, 185–202.
- Kumagai, H., Kumagae, S., Mitani, K., Endo, T., 2004. Effects of supplementary probiotics to two different diets on dry matter intake, daily gain, digestibility, ruminal pH, and fecal microbial populations and metabolites in ewes. *Animal Science Journal* 75, 219–224.
- Lee, P.D., Sladek, R., Greenwood, C.M., Hudson, T.J., 2002. Control Genes and Variability: Absence of Ubiquitous Reference Transcripts in Diverse Mammalian Expression Studies. *Genome Research* 12, 292–297.
- Liou, L., Sheng, H., Ferends, W., Schneider, C., Hristov, A.N., Yoon, I., Hovde, C.J., 2009. Reduced Carriage of *Escherichia coli* O157:H7 in Cattle Fed Yeast Culture Supplement. *The Professional Animal Scientist* 553–558.
- Méndez, S., Pérez, E., 2005. La PCR múltiple en microbiología clínica, in: Puesta al día en métodos microbiológicos para el Diagnóstico Clínico. Elsevier de España, S.L., España, pp. 72–80.
- Merino, L.A., Losch, L.A., 2009. Familia *Enterobacteriaceae*, in: Microbiología e Inmunología. Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Medicina, España. 12-34.
- Mosoni, P., Chaucheyras-Durand, F., Béra-Maillet, C., Forano, E., 2007. Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. *Journal of Applied Microbiology* 103, 2676–2685.

- Newbold, C.J., Wallace, R.J., Chen, X.B., McIntosh, F.M., 1995. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers in vitro and in sheep. *Journal of animal science* 73, 1811–1818.
- Newbold, C.J., Wallace, R.J., Mcintosh, F.M., 1996. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *British Journal of Nutrition* 76, 249–261.
- Pérez, C., 2009. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* en alimentación animal. *Aplicaciones Biológicas a la Nutrición*. 1-7.
- Pinloche, E., McEwan, N., Marden, J. P., Bayourthe, C., Auclair, E., Newbold, C.J., 2013. The Effects of a Probiotic Yeast on the Bacterial Diversity and Population Structure in the Rumen of Cattle. *Plus One* 824-867.
- Pinos-Rodríguez, J.M., Robinson, P.H., Ortega, M.E., Berry, S.L., Mendoza, G., Bárcena, R., 2007. Performance and rumen fermentation of dairy calves supplemented with *Saccharomyces cerevisiae* 1077 or *Saccharomyces boulardii* 1079. *Animal Feed Science and Technology* 140, 223–232.
- Puerta-García, A., Mateos-Rodríguez, F., 2010. Enterobacterias. *Medicine* 10, 3426–3431.
- Quinn, P.M.P., 2011. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, Second Edition. ed. Willey-Blackwell., Iowa, USA. 209-236
- Rivas, J., Díaz, T., Hahn, M., Bastidas, P., 2008. Efecto de la suplementación con *Saccharomyces cerevisiae* sobre la producción de leche al inicio de la lactancia en vacas lecheras. *Zootecnia Tropical* 26, 421–428.
- Rodríguez, M., Rodríguez, L.W., 2006. PCR en Tiempo Real. in: *Métodos físicoquímicos en Biotecnología*. IBT-Universidad Nacional Autónoma de México, México. 7-31.
- Saiki, R.K., Scharf, S.J., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, H., 1985. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1350.
- Sales, J., 2011. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters, nutrient digestibility and growth in sheep: A meta-analysis. *Small Ruminant Research* 100, 19–29.
- Sekse, C., Solberg, A., Petersen, A., Rudi, K., Wasteson, Y., 2005. Detection and quantification of Shiga toxin-encoding genes in sheep faeces by real-time PCR. *Molecular and Cellular Probes* 19, 363–370.
- Singh, J., Sharma, S., Nara, S., 2014. Evaluation of gold nanoparticle based lateral flow assays for diagnosis of *Enterobacteriaceae* members in food and water. *Food Chemistry* 170, 470–483.
- Somma, M., Querci, M., 2007. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), in: *Curso de Formación Sobre: Análisis de La Presencia de Organismos Genéticamente Modificados En Muestras de Alimentos*. Organización mundial de la Salud, Oficina Regional para Europa, Italia, pp. 1–34.
- Spring, P., Wenk, C., Dawson, K., Newman, K., 2000. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric

- bacteria in the ceca of *salmonella*-challenged broiler chicks. *Poultry Science* 205–211.
- Stanchi, N., 2007. *Microbiología Veterinaria*, 1st ed. Inter-médica Editorial, Buenos Aires, Argentina. 195-196.
- Stella, A.V., Paratte, R., Valnegri, L., Cigalino, G., Soncini, G., Chevaux, E., Dell’Orto, V., Savoini, G., 2007. Effect of administration of live *Saccharomyces cerevisiae* on milk production, milk composition, blood metabolites, and faecal flora in early lactating dairy goats. *Small Ruminant Research* 67, 7–13.
- Throne, M., Bach, A., Ruiz-Moreno, M., Stern, M.D., Linn, J.G., 2009. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal pH and microbial fermentation in dairy cows: Yeast supplementation on rumen fermentation. *Livestock Science* 124, 261–265.
- Trepat-Quiléz, M., 2002. Incidencia y comportamiento de *Salmonella* y *Listeria* en pechugas de pavo curadas. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España. 7-31.
- Tripathi, M.K., Karim, S.A., 2011. Effect of yeast cultures supplementation on live weight change, rumen fermentation, ciliate protozoa population, microbial hydrolytic enzymes status and slaughtering performance of growing lamb. *Livestock Science* 135, 17–25.
- Vinueza, C., 2009. PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. *Revista electrónica de Veterinaria*. 10, 1–13.
- Walker, G.M., 2009. Yeasts, in: Schaechter, M. (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology* (Third Edition). Academic Press, Oxford, pp. 478–491.
- Williams, P.E., Tait, C.A., Innes, G.M., Newbold, C.J., 1991. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. *Journal of Animal Science* 69, 3016–3026.