



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
MAESTRÍA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL  
SUSTENTABLE

Efecto de la suplementación de un probiótico (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre enteropatógenos ambientales en cabritos con crianza artificial

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta

M.V.Z. José Ricardo García Trejo

Codirigido por:

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez  
Dr. David Rafael Yáñez Ruiz

Asesores:

Dr. Héctor Mario Andrade Montemayor  
Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón  
Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

Santiago de Querétaro, Qro. Diciembre 2017.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
MAESTRÍA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL SUSTENTABLE

“Efecto de la suplementación de un probiótico (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre enteropatógenos ambientales en cabritos con crianza artificial”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Salud y  
Producción Animal Sustentable

Presenta

M.V.Z. José Ricardo García Trejo

Codirigido por:

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez  
Dr. David Rafael Yáñez Ruiz

Asesores:

Dr. Héctor Mario Andrade Montemayor  
Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón  
Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

Centro Universitario  
Santiago de Querétaro, Qro.  
Diciembre 2017.  
México



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable

Efecto de la suplementación de un probiótico (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre enteropatógenos ambientales en cabritos con crianza artificial

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestro en Salud y Producción Animal Sustentable

**Presenta**

M.V.Z. José Ricardo García Trejo

Codirigido por

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez  
Dr. David Rafael Yáñez Ruiz

**SINODALES**

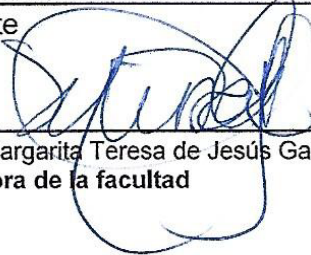
Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez  
Presidente

Dr. David Rafael Yáñez Ruiz  
Secretario

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón  
Vocal

Dr. Héctor Mario Andrade Montemayor  
Suplente

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales  
Suplente

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca  
Directora de la facultad

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Firma

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de investigación y posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Diciembre 2017  
México

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la suplementación de un probiótico (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre la excreción de enteropatógenos ambientales y la respuesta productiva en cabritos durante la etapa de crianza. Dicho estudio se realizó en la unidad de producción caprina “Granja del Carmen”, Municipio de Tequisquiapan, Qro. En el experimento se utilizaron 24 cabritos raza Alpino Francés y Toggenburg, de tres a cuatro días de edad, previamente calostrados, los cuales fueron separados en 2 tratamientos alojados en corrales grupales: Dieta basal (n=12), y ii. Dieta basal+levadura liofilizada (0.5 g/día equivalente a  $1.25 \times 10^{12}$  UFC; n=12) por un lapso de 70 días, administrado a los animales mediante dosificadores individuales. Durante el experimento, la variable productiva evaluada fue la ganancia diaria de peso. Para determinar el efecto de la levadura sobre enteropatógenos ambientales (familia *Enterobacteriaceae*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, coccidias), se tomaron muestras semanales de heces al día 01, 07, 35 y 70 experimental, mientras que la duración, prevalencia y severidad de diarreas fue evaluada por semana. La extracción de DNA de las muestras se realizó por medio de kit comercial, y el número de copias de gen para enterobacterias y *E. coli* se cuantificaron mediante PCR en tiempo real. La detección de *Salmonella enterica* y coccidias se realizó por PCR punto final. El efecto del probiótico sobre el pH ruminal fue evaluado mediante la toma de muestras de líquido ruminal por sondeo esofágico a los días 56 y 70. Para la evaluación del efecto probiótico sobre las excreciones de oocistos de *Eimeria* spp., se tomaron muestras de heces grupales, se identificaron especies y cuantificó la excreción de oocistos por pruebas de parasitología (Técnica de flotación, Técnica de McMaster). Los resultados indican que la suplementación de la levadura no tuvo efecto sobre la GDP, el pH ruminal, y el peso vivo al final del experimento, las excreciones de enterobacterias, *E. coli*, la prevalencia de *Salmonella* spp., y la severidad y duración de las diarreas ( $P > 0.05$ ); sin embargo, se observó una disminución de las poblaciones cuantificadas hacia el día 70 de muestreo en ambos grupos y de *E. coli* al día 07 en el grupo suplementado con el probiotico ( $P < 0.05$ ). Respecto a la excreción de oocistos de *Eimeria* spp., hubo una disminución significativa sobre la excreción en diferentes semanas de la lactancia ( $P < 0.05$ ) en los cabritos con probiótico. Sin embargo, no se observó efecto sobre la prevalencia de coccidias ( $P > 0.05$ ). En conclusión, la suplementación de la levadura no modificó la ganancia diaria de peso, el pH ruminal en los cabritos, ni influyó en la duración, en la severidad y la prevalencia de diarreas, así como enteropatógenos durante la lactancia. No obstante, se observaron efectos variables sobre la carga bacteriana y parasitaria, al reducir la excreción de oocistos por corral de *Eimeria* spp., y de *E. coli* en diversos días del experimento.

**Palabras clave:** Enteropatógenos, *Saccharoyces cerevisiae*, cabritos, crianza artificial.

## SUMMARY

The aim of this work was to evaluate the effect of the supplementation of a probiotic (*Saccharomyces cerevisiae*) on the excretion of environmental enteropathogens and productive parameters in kid goats during the breeding stage. This study was realized in the caprine production unit "Granja del Carmen", Tequisquiapan, Qro. 24 Alpine and Toggenburg kid goats breeds were used, with an average of  $3\pm 1$  days old, they were previously supplemented with maternal colostrum; separated in 2 treatments: Basal diet (n = 12), and ii. Diet / lyophilized yeast (0.5 g / day equivalent to  $1.25 \times 10^{12}$  CFU, n = 12) for a period of 70 days, administered by individual doses. The animals were housed in group pens. During the experiment, the performance variable evaluated was the daily gain weight. To determine the effect of the yeast on environmental enteropathogens (*Enterobacteriaceae* family, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* and coccidia), weekly stool samples were taken at different experimental days (01, 07, 35 and 70). The duration, prevalence and diarrhea severity was evaluated per week and a DNA extraction from the faecal samples was done by a commercial kit. The copies obtained from the gene of enterobacterias and *E. coli* were quantified by real-time PCR, whereas for the detection of *Salmonella enterica* and coccidia, endpoint PCR was performed. Ruminal fluid samples were taken by esophageal probe on days 56 and 70 to evaluate the effect of the probiotic over the ruminal pH. For the evaluation of the probiotic effect on the excretions of oocysts of *Eimeria* spp., faecal samples were taken from each group of animals. *Eimeria* species were identified and excreted oocyst were quantify by parasitology tests (Flotation Technique, McMaster Technique). The results indicate that yeast supplementation had no effect on daily gain weight, ruminal pH, body weight at the end of experiment, Enterobacterias and *E. coli* excretions, *Salmonella* spp. prevalence nor severity and duration of diarrhea ( $P > 0.05$ ). However, there was a decrease in quantified populations by day 70 in both treatments; *E. coli* population decrease as well by day 07 in animals supplemented with probiotic ( $P < 0.05$ ). There was a significant decrease of oocysts of *Eimeria* spp., excreted during the lactating period in kid goats treated with probiotics ( $P < 0.05$ ). However, no effect was observed on the prevalence of coccidia ( $P > 0.05$ ). In conclusion, yeast supplementation did not modify the daily weight gain, ruminal pH in kid goats, nor did it influence duration, severity or prevalence of diarrhea, as well as enteropathogens during lactation. However, variable effects on bacterial and parasitic load were observed by reducing the excretion of oocysts of *Eimeria* spp., and *E. coli* in each pen on different days of the experiment.

**Key words:** Enteropathogens, *Saccharomyces cerevisiae*, kid goats, artificial breeding.

## DEDICATORIAS

A todos mis seres queridos, cada uno sabe lo especiales que son para mí, por la forma en que han estado siempre durante las experiencias que han compartido conmigo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez, por financiar, dirigir y hacer posible el desarrollo de mi proyecto de Maestría.

Al comité tutorial de este proyecto de posgrado: Dr. David Rafael Yáñez Ruiz, Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón, Dr. Héctor Mario Andrade Montemayor y el Dr. Gerardo Manuel Nava Morales, por su apoyo en el desarrollo y finalización de la tesis, y ser parte de mi crecimiento académico y profesional.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por permitirme ser parte de ella al estudiar la licenciatura y maestría en la Facultad de Ciencias Naturales (FCN).

A los propietarios de la unidad de producción caprina “Granja del Carmen”, el Dr. Abel Trujillo y su esposa, la Dra. Adriana Alarcón, por facilitar la realización de la fase experimental; y a sus trabajadores, por el apoyo y buena voluntad.

A la técnico del laboratorio de Microbiología Veterinaria de la FCN, QFB. Susana Lucía Sosa Gallegos, y la técnico del laboratorio de Biología Molecular de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Isabel Jiménez Romero, por compartir conmigo sus conocimientos.

Al equipo de trabajo de nutrición en pequeños rumiantes, Estación Experimental del Zaidín del CSIC (España), por permitir integrarme y apoyarme durante la estancia académica en la etapa final de mi posgrado, y regalarme una experiencia más en mi formación profesional.

A la empresa Lesaffre, Animal Care, México, por proporcionar el probiótico utilizado en este trabajo de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por financiar la beca de posgrado de la cual fui beneficiario.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	i
SUMMARY .....	ii
DEDICATORIAS .....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
ÍNDICE DE CUADROS .....	ix
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Situación actual de la producción caprina.....	4
2.1.1. Contexto internacional de la Producción caprina .....	4
2.1.2. Contexto nacional de la producción caprina.....	5
2.2. La mortalidad neonatal en pequeños rumiantes .....	6
2.2.1. Síndrome diarreico neonatal en los pequeños rumiantes.....	7
2.2.2. Agentes causales bacterianos y parasitarios del Síndrome Diarreico Neonatal en pequeños rumiantes .....	8
2.2.3. Tratamiento del SDN en pequeños rumiantes.....	20
2.3. Uso de probióticos en la salud y producción en pequeños rumiantes .....	21
2.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	24
2.4.1. Efectos de <i>S. cerevisiae</i> sobre la producción en pequeños rumiantes. 25	
2.4.2. Modo de acción de <i>S. cerevisiae</i> en rumiantes .....	27
III. JUSTIFICACIÓN .....	34
IV. HIPÓTESIS.....	36
V. OBJETIVOS.....	36
5.1. Objetivo General.....	36



5.2. Objetivos particulares .....	36
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
6.1. Lugar experimental .....	37
6.2. Diseño experimental y tamaño de muestra.....	37
6.3. Tratamientos experimentales.....	37
6.4. Dieta experimental.....	38
6.5. Animales experimentales, corrales y manejo.....	40
6.6. Toma de muestras.....	40
6.6.1. Toma de muestras fecales y evaluación de diarreas por duración y severidad.....	40
6.6.2. Toma de contenido ruminal y medida de pH.....	41
6.6.3. Toma de muestras sanguíneas .....	42
6.6.4. Identificación de especies de <i>Eimeria</i> spp.....	42
6.6.5. Toma de muestra de calostro .....	43
6.7. Variables productivas .....	43
6.8. Análisis de las muestras .....	43
6.8.1. Determinación de proteínas totales a partir de las muestras de suero a las 24 horas de nacimiento de los animales.....	43
6.8.2. Análisis de la calidad de calostro por medio del calostro densímetro. .	43
6.8.3. Detección de oocistos de <i>Eimeria</i> spp., en muestras de heces. ....	44
6.9. Técnicas moleculares .....	44
6.9.1. Extracción del DNA de las muestras .....	44
6.9.2. Cuantificación de enterobacterias en muestras de heces por qPCR....	45
6.9.3. Detección de <i>Salmonella</i> spp. PCR punto final. ....	47
6.9.4. Cuantificación de <i>E. coli</i> por qPCR.....	49
6.9.5. Detección de coccidias en las muestras de heces por PCR punto final	50

6.10.	Manejo, desecho de las muestras y material de muestreo .....	53
6.11.	Análisis estadístico de las muestras .....	54
VII.	RESULTADOS .....	55
7.1.	Parámetros productivos .....	55
7.2.	Proteínas totales a las 24 horas y efecto del probiótico durante el proceso experimental .....	55
7.3.	Identificación y cuantificación de <i>Eimeria</i> spp.....	56
7.4.	Prevalencias de <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> spp., y coccidias, y cuantificación de Enterobacterias y <i>E. coli</i> .....	58
7.5.	Evaluación de la prevalencia, duración y severidad de diarreas durante el experimento.....	62
VIII.	DISCUSIÓN .....	65
IX.	CONCLUSIONES .....	73
X.	RECOMENDACIONES .....	73
XI.	APENDICES .....	74
	Apendice 1. Carta de aprobación del proyecto de investigación por el comité de Bioética de la FCN.....	74
	Apéndice 2. Curva estándar, de amplificación y de disociación qPCR enterobacterias y <i>E. coli</i> .....	75
	Apéndice 3. Abreviaturas Utilizadas .....	78
XII.	LITERATURA CITADA.....	79

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Especies identificadas de <i>Eimeria spp.</i> en las muestras de heces experimentales por microscopía	57
2.	PCR punto final coccidia universal por grupo experimental y día de muestreo	59
3.	PCR punto final de <i>Salmonella spp.</i> , por grupo experimental y día de muestreo	60
4.	Duración de las diarreas durante la fase experimental por semanas	63
5.	Severidad de las diarreas durante la fase experimental por semanas	63
6.	Prevalencia de las diarreas durante el experimento por semanas	64
7.	Curva estándar qPCR Enterobacterias	75
8.	Curva estándar qPCR <i>E. coli</i>	75
9.	Amplificación qPCR Enterobacterias	76
10.	Amplificación qPCR <i>E. coli</i>	76
11.	Curva de disociación qPCR Enterobacterias	77
12.	Curva de disociación qPCR <i>E. coli</i>	77

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Composición química del alimento preiniciador utilizado en la lactancia	39
2. Composición química de la leche de cabra	39
3. Análisis químico de la alfalfa henificada	39
4. Oligonucleótidos utilizados para la Amplificación del DNA de las enterobacterias en la mezcla de reacción	47
5. Ciclo de amplificación qPCR para la cuantificación de enterobacterias	47
6. Reactivos utilizados qPCR mix para la cuantificación de enterobacterias	47
7. Oligonucleótidos utilizados para la Amplificación del DNA de <i>Salmonella</i> spp. en la mezcla de reacción	48
8. Reactivos para la elaboración de la PCR mix para la detección de <i>Salmonella</i> spp	48
9. Ciclo de amplificación PCR para la detección de <i>Salmonella</i> spp	49
10. Oligonucleótidos utilizados para la cuantificación de <i>E.coli</i> en la mezcla de reacción	50
11. Reactivos para la elaboración de la PCR mix para la detección de <i>E.coli</i>	50
12. Ciclo de amplificación qPCR para la cuantificación de <i>E. coli</i>	50
13. Oligonucleótidos utilizados para la Amplificación del DNA para la identificación de coccidia universal en la mezcla de reacción	52
14. Reactivos para la elaboración de la PCR mix para la detección de coccidia universal	52
15. Ciclo de amplificación PCR para la detección de coccidias Reactivos para la elaboración de la PCR mix para la detección de coccidia universal	53
16. Parámetros productivos y pH ruminal de los cabritos suplementados con el probiótico de levadura	55
17. Proteínas totales a las 24 horas de nacimiento de los cabritos	56
18. Efecto del probiótico de levadura sobre la cantidad de oocistos de <i>Eimeria</i> spp., en las muestras fecales por corral durante la etapa de crianza	56

19.	Especies identificadas de <i>Eimeria</i> spp., por microscopía	57
20.	Prevalencia de los enteropatógenos durante el experimento	61
21.	Efecto de la levadura sobre las prevalencias de enteropatógenos	61
22.	Efecto de la suplementación de levadura sobre el conteo de poblaciones bacterianas ( $\text{Log}_{10}$ ) en las muestras de heces de cabritos.	62

## I. INTRODUCCIÓN

La mortalidad neonatal es uno de los problemas más importantes en la producción de pequeños rumiantes en México. La mayor parte de las muertes en los cabritos ocurren durante las primeras semanas de vida (Cruz-López, 2015), ocasionando pérdidas económicas por la disminución de animales tanto para venta como cabrito como para pie de cría (Gómez, 2001; Méndez et al., 2015). Entre las principales causas de mortalidad neonatal se encuentran las asociadas al estado nutrimental de las madres al momento del parto, la desnutrición del cabrito, falta de manejo durante el parto de las cabras y enfermedades infecciosas que afectan al cabrito (Palacios-Toro, 2008).

En México, alrededor de 15 a 20% de las pérdidas neonatales en cabritos en la crianza son debido a enfermedades infecciosas; siendo las entéricas y neumónicas las que causan mayor mortalidad (Macedo et al., 2010; Ramírez-Bribiesca et al., 2001). Las enfermedades infecciosas entéricas en la etapa de crianza en los pequeños rumiantes ocasionan tasas de morbilidad y mortalidad del 10 hasta el 50% dependiendo de la gravedad de la enfermedad, causando un retraso en el desarrollo corporal tanto en cabritos como en corderos (hasta un 40%) (Espinosa, 2004; Méndez et al., 2015). Las diarreas neonatales pueden ser causadas por más de un agente patógeno, convirtiéndose en un síndrome diarreico neonatal (SDN) (Correal et al., 1994). Los microorganismos involucrados pueden ser de tipo bacteriano (*Clostridium* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia* spp.), virales (rotavirus y coronavirus) y parasitarios (*Criptosporidium* spp, *Eimeria* spp.) (Méndez et al., 2015).

Diferentes antibióticos han sido utilizados para la prevención y tratamiento del síndrome diarreico neonatal (SDN); los cuales pueden ser adicionados al alimento del animal incluyéndose como medida preventiva, sin que se tenga identificado el agente causal (Cid et al., 1996). Sin embargo, se ha demostrado que el uso prolongado de antibióticos puede incrementar la resistencia bacteriana (Heuer, et al., 2011). Por este motivo el empleo de antibióticos en la alimentación animal como promotores del crecimiento ha sido prohibido en la Unión Europea

desde el año 2006 (Briz, 2006), y su uso ha sido limitado solo por médicos veterinarios en animales enfermos con fines terapéuticos tanto en Europa como Estados Unidos (Schneider, 2015). Como una alternativa para la sustitución de los antibióticos como aditivos en la dieta de los animales, se ha propuesto el uso de los prebióticos y probióticos. Los cuales pueden beneficiar la salud en los animales (Hill et al., 2014) y mejorar el rendimiento productivo de los animales (Jung et al., 2008). Los prebióticos más utilizados son los fructooligosacáridos, debido a que previenen la adhesión de enterobacterias patógenas en el epitelio intestinal y minimizan los desordenes intestinales causadas por dichas bacterias (Benyacoub et al., 2008; Hartemink et al., 1997).

Los probióticos pueden ser de tipo bacteriano o levaduras. Dentro de los organismos bacterianos más utilizados como probióticos en la producción animal se encuentran *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp., en animales monogástricos y prerumiantes (Gaggia et al., 2010), mientras que en rumiantes adultos, se ha reportado el uso de *Megasphaera eldesnii* y *Propionibacterium* spp., para la prevención de desordenes en el rumen por el uso de dietas altas en concentrados (Krehbiel et al., 2002). Respecto al uso de levaduras, está *Saccharomyces cerevisiae* variedad *boulardii* y *cerevisiae* (Guevara, 2011). *Saccharomyces cerevisiae* variedad *cerevisiae* se utiliza en la producción de rumiantes principalmente por el efecto directo que tiene sobre la microbiota y fermentación ruminal, teniendo un efecto positivo sobre los parámetros productivos en animales adultos alimentados con dietas que promueven un pH del rumen bajo (Lesmeister et al., 2004). En animales jóvenes, la mayoría de los estudios con levadura se ha realizado principalmente en becerros neonatos y jóvenes. Los cuales reportan que la inclusión de levadura disminuye la prevalencia de enfermedades diarreicas durante la etapa de crianza y los días posteriores al destete (Galvão et al., 2005), así como disminuye la incidencia de cuadros neumónicos (Campos-Granados y Augusto, 2015). Además se ha demostrado que disminuye la excreción de ciertas bacterias enteropatógenas como *Salmonella* spp. (Brewer et al., 2014). Respecto a la estimulación inmune, se ha reportado que la administración de *S. cerevisiae* aumenta las concentraciones de inmunoglobulinas

en sangre de corderos y becerros suplementados con la levadura (Mallaczevska et al., 2010; Tao et al., 2015). Sin embargo, hasta el momento no se han realizado trabajos que evalúen los mismos efectos de *S. cerevisiae* durante la etapa de crianza de los cabritos.

Este trabajo tiene como finalidad evaluar el efecto de la suplementación de un probiótico a base de levadura (*S. cerevisiae*) sobre la excreción de enteropatógenos ambientales y el desempeño productivo en cabritos bajo un sistema de crianza artificial.



## **II. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1. Situación actual de la producción caprina**

#### **2.1.1. Contexto internacional de la Producción caprina**

La cabra fue uno de los primeros animales en domesticarse, según evidencia arqueológica, la relación simbiótica entre esta especie y los seres humanos datan de los 10,000 años, cuando se domesticó en la Antigua Mesopotamia (Aziz, 2010). Después del perro, la cabra es el animal doméstico mayormente distribuido en el mundo, debido a que tiene una gran adaptabilidad a las diversas condiciones ambientales y nutrimentales a las cuales son sometidas. Demostrando así su utilidad a la humanidad debido a su productividad, pequeño tamaño y por la falta de competencia por la comida con el humano (Aréchiga et al., 2008).

Aunque en los últimos años dicha especie ha sido relegada, la cabra es una especie doméstica con un gran potencial productivo y reproductivo. Además, la producción caprina tiene las siguientes ventajas: las cabras requieren menos espacio en instalaciones comparado con los bovinos, son animales fáciles de manejar y eficientes en la utilización de forrajes de bajo contenido nutricional, tienen una mayor adaptabilidad en zonas áridas y semiáridas en comparación a los ovinos y bovinos. Por otro lado, las propiedades de la leche de cabra, es más digerible que la leche de vaca y causa menor porcentaje de alergias (Boza-López et al., 2006). Aunado a esto, en el mercado se tiene una alta demanda de carne de caprino (birria, barbacoa y cabrito), la cual hace sea una especie productiva de interés (Aréchiga et al., 2008; Aziz, 2010).

La población caprina a nivel mundial es de 1011,251,833 animales (FAO, 2014f), de los cuales África tiene una población de 374,380,445 animales; Asia tiene 580,703,222 cabras, América concentra 35,640,927 cabezas, Europa 16,534,309 caprinos, y Oceanía 3,992,930 animales. De la población total de la población caprina panamericana, los países con mayor población caprina en el continente son Brasil (8,851,879 cabezas), México (8,724,946 cabezas) y Argentina (4,400,000 cabezas) (CNPC, 2014; FAO, 2014).

En la producción de leche de cabra a nivel mundial, los países con mayor producción de leche, son principalmente europeos, asiáticos y africanos, algunos de los cuales se ubican en la zona del mediterráneo (India con 4, 831,477.5 Ton; Bangladesh con 2, 578,000 Ton; Sudán con 1, 524,500 Ton; Pakistán con 769,500 Ton y Malí con 706,712.75 Ton (FAO, 2014), mientras que México se ubica en el lugar 21 de producción lechera caprina (187,869 Ton). En cuanto a la producción de carne, a nivel mundial se producen 5, 372, 407 Ton, sin embargo, nuestro país está en el sitio 20 de producción, con 39, 656 Ton al año (CNPC, 2014; FAO, 2014).

### **2.1.2. Contexto nacional de la producción caprina.**

Los sistemas productivos de leche y carne caprinos en México se caracterizan por ser referentes en el uso de recursos naturales de baja productividad, como son los agostaderos de las zonas áridas y semiáridas (Guerrero-Cruz, 2010). De acuerdo a lo reportado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), en el año 2015 la población caprina en México fue alrededor de 8,724,946 cabezas. Los sistemas de producción caprina del país se caracterizan por ser en su mayoría de tipo extensivo (pastoreo en las zonas áridas). Estos sistemas se presentan principalmente en las comunidades rurales, donde prevalece la marginación y la pobreza, siendo la producción de carne, con cabrito lechal, chivo castrado y cabras adultas la fuente de subsistencia para muchas familias (Gómez et al., 2009; SPC, 2014). Sin embargo, en las últimas décadas, se ha visto un incremento en los sistemas de tipo semi-intensivo, donde los productores van emigrando de la ganadería social a formas semi-tecnificadas con el objetivo principal de la venta de leche y subproductos, ya sean quesos o dulces. Las cabras se mantienen estabuladas o semi-estabuladas y hay prácticas de manejo tendientes a mejorar la producción. Esta ganadería se aprecia en unidades de producción encaminadas a la producción de leche (Gómez, et al., 2009). Los sistemas intensivos se caracterizan por ser mucho más organizados, con objetivos claros de producción, más eficientes, negocios rentables y están encaminados principalmente a la producción de leche (Rojas, 2014). Entre las características más sobresalientes de los sistemas intensivos son: los rebaños son grandes de razas bien definidas (Toggenburg,

Saanen, Anglonubia y ocasionalmente animales negros criollos de origen Murciano-Granadino), tienen muchas aplicaciones tecnológicas en la nutrición, la sanidad, la genética, la reproducción e instalaciones. En la producción de carne se utiliza el morfotipo pastoreño criollo blanco de la región de la Mixteca, aunque en los años recientes, se han introducido cruzamientos con otras razas cárnicas, principalmente la raza Bóer (Rojas, 2014). En cambio, en la producción de leche se utilizan equipos de ordeña y la refrigeración para la conservación de la leche y sus derivados. Los sistemas intensivos de la producción lechera principalmente se encuentran en la región del Bajío y La Comarca Lagunera (SPC, 2014).

## **2.2. La mortalidad neonatal en pequeños rumiantes**

La mortalidad neonatal es uno de los problemas más importantes en la producción de pequeños rumiantes tanto a nivel mundial y como en México (Gómez, 2001; Méndez et al., 2015). La muerte de un cabrito o cordero implica pérdida de dinero, ya sea por pérdida de un animal para venta como cabrito destetado o engordado, o por pérdida de animales de pie de cría (Palacios-Toro, 2008). Las muertes peri-natales en cabritos varían desde 15 hasta el 95%, las cuales ocurren durante las primeras 72 horas de vida, o durante la primera semana de vida (Cruz-López, 2015). Entre las principales causas de mortalidad neonatal se encuentran las asociadas al estado nutricional de las madres al momento del parto, la desnutrición del cabrito, la falta de manejo durante el parto de las cabras y las enfermedades infecciosas que afectan al cabrito (Fernández, et al., 2001).

El estado nutricional de las madres puede ocasionar problemas como el síndrome de inanición-exposición, debido a que el recién nacido no logra realizar el vínculo con la madre durante los primeros 30 minutos posteriores al nacimiento (Macedo et al., 2010). También existen problemas relacionados con la deficiencia de minerales en la dieta de la madre durante la gestación (Ramírez-Bribiesca et al., 2004). Por ejemplo, la deficiencia de yodo en la dieta en la madre ocasiona el bocio en los neonatos, mientras que la deficiencia de cobre provoca el nacimiento de los corderos o cabritos con lesiones en sistema nervioso central, presentando parálisis parcial o total de los miembros posteriores dificultando su movimiento y su repentina muerte por inanición. En cambio la deficiencia de selenio se presenta entre la

tercera y octava semana de edad y presentan signos clínicos similares a los de la deficiencia por cobre, pero a la necropsia se encuentran lesiones de distrofia muscular (Palacios-Toro, 2008; Ramírez-Bribiesca et al., 2001). La desnutrición del cabrito es ocasionada por la insuficiente producción de leche de la madre y/o ingestión de calostro, en aquellos cabritos que nacen débiles por bajo peso (Nowak y Poindron, 2006), lo cual está fuertemente relacionado con la falta de manejo durante el parto (Cruz-López, 2015; Salcedo et al., 1994).

Las enfermedades infecciosas son otra causa principal de mortalidad neonatal. En los sistemas productivos de cabras en México, se reporta que alrededor del 15 al 20% de las pérdidas neonatales son debidas a enfermedades infecciosas; siendo las entéricas y neumónicas las que causan mayor mortalidad en cabritos en crianza entre 8 a 30 días de edad (Macedo et al., 2010; Ramírez-Bribiesca et al., 2001). Las enfermedades infecciosas entéricas en la etapa de crianza en los pequeños rumiantes ejercen una repercusión económica preocupante, no sólo por las tasas de morbilidad y mortalidad que ocasionan (del 10 a 50% dependiendo la gravedad de la enfermedad), sino por el retraso en el desarrollo corporal tanto en cabritos como en los corderos (que puede ser hasta de un 40%), así como los gastos en los tratamientos veterinarios (Espinosa, 2004; Méndez et al., 2015).

### **2.2.1. Síndrome diarreico neonatal en los pequeños rumiantes**

Las enfermedades infecciosas del sistema digestivo en los neonatos rumiantes se pueden agrupar dentro de un complejo denominado síndrome diarreico neonatal (SDN) (Méndez et al., 2015). Los factores asociados a la aparición, difusión y evolución de los procesos diarreicos son las condiciones medio ambientales adversas y las deficiencias en el manejo de los animales (Vázquez y Dolores, 2002). Además, la fisiología intestinal del neonato (factores endógenos) como son: la hipomotilidad intestinal (debilidad peristáltica), la falta de acidez gástrica, el escaso poder enzimático (enzimas pancreáticas), y la escasa competencia de la microbiota intestinal (Gómez et al., 2009), permiten que los agentes patógenos crezcan y permanezcan en el tracto digestivo del neonato. En estas circunstancias, al presentarse en conjunto con factores exógenos, como la

sobrecarga de indigestión, el frío, el hacinamiento, la mezcla de animales de diferentes edades, fallos en la lactancia artificial, un calostrado de baja cantidad de inmunoglobulinas y mala higiene en la unidad de producción, predisponen a la presentación del SDN (Gómez et al., 2009; Méndez et al., 2015). Los agentes infecciosos involucrados en el SDN en pequeños rumiantes pueden ser de tipo bacteriano (*Clostridium* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia* spp.), virales (rotavirus y coronavirus) y parasitarios (*Criptosporidium* spp., *Eimeria* spp.) (Méndez et al., 2015).

En México, los indicadores de mortalidad asociada al SDN en cabritos y corderos de 0 a 5 días de nacidos oscilan entre 33 al 50% de las muertes en esta etapa productiva, representando del 70 al 80% de las pérdidas económicas, ya sea por la muerte de los animales o por la disminución de peso o ganancia nula (Cruz-López, 2015). Los agentes bacterianos que se han relacionado con el SDN son *Escherichia coli* enterotóxicas, que han sido aisladas a partir de heces de corderos (Zamora et al., 1997), *Salmonella enterica*, principalmente el serotipo *tiphimurium* y *S. dublin* (Ja et al., 1981) y *Clostridium perfringens* (Méndez et al., 2015).

## **2.2.2. Agentes causales bacterianos y parasitarios del Síndrome Diarreico Neonatal en pequeños rumiantes**

### **2.2.2.1. *Escherichia coli***

*Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae (Rodríguez-Ángeles, 2002) colonizador habitual del intestino de mamíferos y aves, de la población de este género bacteriano, solamente una pequeña fracción son poseedores de factores de virulencia que causan patogenicidad, y causan tres síndromes clínicos generales: i. infección de vías urinarias; ii. Sepsis y meningitis, y iii. Infecciones enterodiarreicas (Kolenda et al., 2015). La serotipificación de *E. coli* se basa en la clasificación de Kauffman-White, basado en los perfiles de los antígenos de superficie somáticos (O), flagelar (H) y capsulares (Edwards y Ewing, 1962; Lior, 1994). Un total de 170 antígenos O, cada uno conocido como serogrupos, son reconocidos actualmente (Nataro y Kaper, 1998). *Escherichia coli* cepas diarreogénicas se clasifican en seis serotipos (Croxen et al., 2013): i. *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC); ii. *E. coli*

enteropatógenas (EPEC); iii. *E. coli* productora de toxina shiga (STEC), que incluye a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC); vi. *E. coli* enteroagregativa (EAEC); v. *E. coli* difuso adherente (DAEC); y vi. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) (Kolenda et al., 2015). Muñoz et al. (1996), mencionan que las cepas de *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC) son los principales agentes causales al detectarlas en el 23% de cabritos con diarreas, las cuales contaban con al menos un factor de virulencia, el antígeno fimbrial F5 (K99), mientras que Cid et al. (1996) reporta una baja prevalencia de *E. coli* cepas F5 y F41. Sin embargo, Duhamel et al. (1992) en un cabrito de dos meses de edad con diarrea severa de duración de dos meses, reportaron el aislamiento de la cepa O103:H2, productora de toxina similar a la toxina Shiga (SLT) y de verotoxina. La enfermedad causada por este agente suele afectar a cabritos en las primeras semanas de vida.

Los factores de virulencia que *E. coli* ETEC utiliza para la colonización y sobrevivencia en el TGI son las adhesinas y la producción de enterotoxinas (Nagy y Fekete, 2005). Las adhesinas son lectinas (proteínas con afinidad a carbohidratos) que conforman un apéndice en forma de pili o fimbria, y su función es la adherencia a receptores de membrana de las mucosas (Paton y Paton, 1998). Estas fimbrias se han identificado como antígenos K, los más importantes en las cepas ETEC en rumiantes son los antígenos K88 y K99, se sabe que estos receptores tienen una alta afinidad por receptores específicos del epitelio intestinal. K99 tiene afinidad hacia el gangliósido glicolípido (NeuGc-GM3) del intestino delgado en los neonatos, mientras que K88 tiene afinidad hacia los receptores de sialoglicoproteína tipo mucina en las vellocidades intestinales (Smit et al., 1984).

Las enterotoxinas son péptidos o proteínas secretadas reguladas por plásmidos secretadas por las bacterias ETEC que actúan en el epitelio intestinal (O'brien y Holmes, 1996). Las principales enterotoxinas producidas por las cepas ETEC son: i. Enterotoxina termolábil de gran peso molecular (88 kDa) (LT); y ii. Enterotoxina termoestable de peso molecular pequeño (ST) (Hirst et al., 1998). La enzima LT tiene un mecanismo de acción similar a la enterotoxina LT de *V. cholerae*, la cual activa la enzima adenilato ciclasa y eleva los niveles intracelulares de AMPc por medio de un proceso de ADP ribosilación; ocasionando el aumento de la

secreción de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  y  $\text{H}_2\text{O}$  hacia el lumen intestinal, provocando así disminución en la absorción de líquidos, deshidratación y acidosis (O'Brien y Holmes, 1996). Existen 2 grupos de LT, 1) LT-I, que es expresado por cepas de *E. coli* que son patógenas para humanos y animales; y 2) LT-II que ha sido identificada principalmente en cepas que son patógenas en animales, raramente en las cepas patógenas de humanos, pero que no ha sido asociada con el desarrollo de la enfermedad (Nataro y Kaper, 1998). La enterotoxina ST son producidas por *E. coli* ETEC, así como otras bacterias gram negativas incluidas *Yersinia enterocolitica* y *Vibrio cholerae* (Savarino et al., 1996). La actividad biológica de la enterotoxina ST comprende la estimulación del sistema guanilato ciclasa, disminuyendo la acumulación intracelular de GMPc y la reducción de agua y electrolitos ( $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ) en la zona apical de las vellosidades (Forte et al., 1992). La toxina ST incluye dos clases: STa, asociada a las enfermedades en humanos; y STb, que se ha relacionado con los cuadros clínicos en animales. Ambas enterotoxinas se diferencian en su estructura molecular y modo de acción (Kaper et al., 2004).

La patogenicidad de *E. coli* ETEC se caracteriza por la ausencia de la producción de lesiones patológicas y de alteraciones morfológicas en la mucosa. Una vez que ingresa al organismo vía oro-fecal, comienza a colonizar las últimas porciones del intestino delgado, a nivel de la válvula íleo-cecal y de aquí se propaga hacia las porciones anteriores en forma muy rápida. La bacteria se adhiere al enterocito por medio de los factores de colonización fibrilar (FCs) y comienza a producir enterotoxinas, ya sea la producción solamente de ST, de LT o la producción simultánea de ambas (Spangler, 1992). La toxina LT, conformada por una subunidad A y cinco subunidades B, éstas últimas se unen a los receptores de los gangliósidos de superficie celular GM1 y GD1b, mientras que la subunidad A es la responsable de la actividad enzimática de la toxina (Nataro y Kaper, 1998). La toxina LT tiene actividad ADP ribosil transferasa, transfiere un radical AP-ribosil del NAD a la subunidad  $\alpha$  de la proteína G estimulante, encargada de regular la Adenilato ciclasa. El resultado permanente de la activación de la Adenilato ciclasa es el aumento de los niveles de cAMP intracelular, la activación de cinasas cAMP dependientes, y la activación del canal principal canal de cloruro de las células

epiteliales: el regulador de conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR). El resultado de la fosforilación del CFTR es el aumento de la secreción de  $\text{Cl}^-$  de las células secretoras de la cripta (Spangler, 1992). LT tiene también la capacidad de estimular la síntesis de prostaglandina y del sistema nervioso entérico, que conduce a la estimulación de la secreción y la inhibición de la absorción del lumen intestinal (Kaper et al., 2004). La toxina STb, asociada a la enfermedad en animales, contiene dos puentes disulfuro. Esta toxina estimula la secreción a nivel citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$ , estimula la liberación de prostaglandina E2 y estimular la liberación de serotonina. (Fujii et al., 1986; Hitotsubashi et al., 1992). Dichos mecanismos producen un aumento de la secreción intestinal, repercutiendo así en una disminución de la absorción de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , pérdida de  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ; ocasionado deshidratación, acidosis, shock hipovolémico y muerte del animal (Arevalo, 1995).

Los signos clínicos que presentan los animales son debilidad, diarrea acuosa color blanco a amarillo profusa, caquexia y deshidratación. A la necropsia, el animal puede presentar congestión de intestino, con hemorragias de tipo petequiral, con contenido amarillo espeso acompañado de coágulos de sangre (Moxley y Smith, 2010). A nivel histológico, las secciones de intestino delgado presentan severa depleción linfocítica difusa de placas de Peyer con necrosis multifocal y una marcada hiperplasia del epitelio de las criptas con fusión y atrofia de vellosidades; con un gran número de bacilos gramnegativos adheridos al epitelio del intestino, ciego y del colon (Duhamel et al., 1992). Las tasas de mortalidad son próximas al 50%; si los animales no son sometidos a un tratamiento adecuado y precoz, pueden morir a las 12 horas de iniciado el proceso (Méndez et al., 2015).

#### **2.2.2.2. *Salmonella* spp.**

*Salmonella* spp. es un bacilo Gram negativo, no esporulado, no capsulado, anaerobio facultativo clasificado en la familia *Enterobacteriaceae* (Gene, 2002). Se clasifican de acuerdo al esquema clásico de Kauffman-White, el cual es basado en antígenos somáticos, flagelares y ocasionalmente capsular (Vi). las salmonelas se clasifican en más de 2,500 serotipos, que pueden ser móviles o inmóviles (Ochoa y Rodríguez, 2005).



Los principales serotipos que ocasionan la enfermedad en cabritos y corderos son *S. enterica* serovariedad *typhimurium* y *S. enteritidis*, aunque en algunos casos se han aislado otros serovares atípicos (Díaz-Aparicio et al., 1987). Se ha reportado una prevalencia que va desde el 2 al 16% en los cabritos enfermos de diarrea (Saha et al., 2013).

*Salmonella enterica* cuenta con cinco islas de patogenicidad: SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4 y SPI-5. Las cuales contienen varios genes involucrados en la invasión, apoptosis de macrófagos y activación de cascadas de fosforilación. Así como los que regulan la supervivencia, replicación bacteriana en los compartimientos intracelulares de fagocitos y células epiteliales, y los que provocan la secreción fluida y reacción inflamatoria en la mucosa intestinal. Por lo que su mecanismo de patogenicidad esta muy bien descrito (Ochoa y Rodríguez, 2005).

La patogenia de *Salmonella enterica* es la siguiente: una vez ingerida la *Salmonella* por el huésped se inicia el ciclo de infección a través del tejido linfoide asociado al intestino (GALT), incluyendo las placas de Peyer. Ahí, la bacteria se adhiere a las células epiteliales del intestino delgado y a las células M (Kernéis et al., 1997). La unión a las células M esta medida por las fibrinas específicas de especie. En la adhesión a las células M, *Salmonella* spp. logra inducir la reorganización del citoesqueleto en la superficie apical de las células M que resulta en la internalización de las bacterias (Salcedo et al., 1994). Posteriormente, la enterobacteria invade las células del hospedador mediante un mecanismo conocido como de disparo y envía señalizaciones a las células epiteliales que inducen modificaciones del citoesqueleto, formando ondulaciones para el contacto (Galán, 1996).

*Salmonella* spp., cuenta con dos sistemas de secreción de tipo III. Los cuales son un grupo de organelos especializados de bacterias Gram negativas que introducen proteínas efectoras al citosol de las células eucariotas, desequilibrando la función celular (Herrera y Jarib, 2015). Estos sistemas intervienen en la invasión inicial de la mucosa intestinal (isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* SPI-1) y la enfermedad sistémica posterior (SPI-2). El sistema de secreción SPI-1 introduce las

proteínas de invasión secretadas por las bacterias (Sips o Ssps) en las células M, lo que da lugar a una reorganización de la actina de la célula hospedadora con la consiguiente formación de ondulaciones en la membrana (Groisman y Ochman, 1997). La bacteria se encuentra dentro de las células M después de la infección a los 5 min. Su internalización es seguido por el transporte de las bacterias a las células linfocítica subyacente, que son los macrófagos (Murray et al., 2015).

*Salmonella* spp., puede entrar en los macrófagos mediante fagocitosis mediada por la célula huésped, o por invasión SPI-1 dependientes. Después de un periodo de adaptación de 3-4 horas, *Salmonella* spp., tiene la capacidad de replicarse dentro de las células fagocíticas y no fagocíticas (SCV), que se caracterizan por tener concentraciones limitadas de  $Mg^{2+}$  y  $Fe^{2+}$  y un pH ácido, la acidificación dentro del fagosoma es necesaria para la supervivencia y replicación intracelular. Las SCV son espaciosas, lo cual permite que los productos antibacterianos se diluyan, se expresen genes que aumentan la supervivencia intracelular y sus productos neutralicen péptidos catiónicos (Ochoa y Rodríguez, 2005). Una proporción significativa de macrófagos sufre apoptosis después de la invasión, situación contraria se observa en células epiteliales (Finlay y Falkow, 1997; Sirard et al., 1999). La biogénesis de las SCV se caracteriza por una pérdida rápida de marcadores endocíticos tempranos EEA1 y receptor de transferrina (TfR), enriquecimiento progresivo de ATPasa vacuolar (involucrada en la acidificación del fagosoma) y de algunas glicoproteínas lisosomales (Lgps) de manera Rab7 dependiente, sin interactuar directamente con lisosomas. Las SCV adquieren marcadores lisosomales LAMP1 y LAMP2 (proteínas membranales asociadas a lisosomas) y fosfatasa ácida lisosomal (LAP), aunque carecen de marcadores lisosomales cuyo blanco depende de señales de manosa 6-fosfato (la mayoría de las enzimas lisosomales), así como del propio receptor M6PR, lo cual sugiere que no existe relación entre las SCV y los compartimentos endosomales tardíos (Gorvel y Méresse, 2001). Los marcadores lisosomales se localizan en extensiones filamentosas, microtúbulo- dependiente, que se conectan a las SCV; una función potencial de estas estructuras es proveer de nutrimentos a las bacterias intracelulares (Ochoa y Rodríguez, 2005). Al no ser degradada *Salmonella* spp., en los macrófagos, se inhibe el procesamiento y presentación de sus antígenos.

*Salmonella* spp. expresa enzimas que inactivan directamente radicales reactivos de oxígeno y nitrógeno; como la homocisteína (gen *metL*), que antagoniza al óxido nítrico y superóxido dismutasa (*sadCII*) (Ohl y Miller, 2001). Otras proteínas que son necesarias para sobrevivir bajo estrés oxidativo son la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, codificada por *zwf*. *Dps*, agente quelante del  $Fe^{2+}$ , evitando su participación en la formación de los radicales reactivos del oxígeno. Finalmente proteínas efectoras codificadas en la SPI-2 se consideran involucra en la protección al estallido respiratorio al prevenir la unión de las vesículas que contienen NADPH-oxidasa con las SCV (Vazquez-Torres y Fang, 2001).

Las células M no se recuperan de estos reordenamientos y son destruidas, dando lugar a la diseminación de *Salmonella* spp. a los enterocitos adyacentes (Chen et al., 1996; Monack et al., 2000). Las membranas onduladas rodean la pared celular bacteriana, lo que permite su replicación intracelular en el fagosoma con posterior lisis de la célula anfitriona y extensión a células epiteliales adyacentes (Cotter y DiRita, 2000). La respuesta inflamatoria limita la infección al aparato digestivo, interviene en la liberación de prostaglandinas y estimula la secreción de AMPc, el cual a su vez provoca secreción de líquidos e iones a la luz intestinal e impide su absorción. Una vez que atraviesan la mucosa, alcanzan los ganglios mesentéricos, invaden rápidamente el torrente circulatorio y originan así bacteriemia (Ochoa y Rodríguez, 2005).

Los mecanismos de producción de diarrea de *Salmonella* spp., no han sido descritos detalladamente, pero parece ser un fenómeno complejo que involucra diversos factores de virulencia. Se ha demostrado la presencia de enterotoxina en *S. enterica* serovar Typhimurium y *S. enterica* serovar Typhi similar a las enterotoxina de *Vibrio cholerae* (CT) y toxina termolábil (LT) de *E. coli* (Ochoa y Rodríguez, 2005). La proteína efectora SopB/SigD tiene actividad de inositol fosfato fosfatasa, por lo que genera una gran cantidad de fosfolípidos de inositol e inositol fosfato con capacidad de señalación, que además de participar en los rearrreglos del citoesqueleto, se encuentra involucrada en la estimulación de secreción de  $Cl^-$  (Hong y Miller, 1998). La proteína efectora SopD, trabaja en conjunto con SopB, las cuales tienen actividad de inositol fosfato fosfatasa. Estas proteínas generan fosfolípidos de inositol e inositol fosfato con capacidad de señalización, que además

de relacionarse con la modificación del citoesqueleto, se involucran en la secreción de fase fluida al estimular la secreción de cloro (Zhang et al., 2003).

La proteína PipA contribuye a la secreción fluida y reacción inflamatoria en la mucosa intestinal, su mutación muestra marcada disminución de la respuesta inflamatoria al observarse el cuadro clínico en bovinos (Cotter y DiRita, 2000). La enterobacteria induce la migración de neutrófilos y macrófagos (PMN) así la liberación de citocinas proinflamatorias como IL8, GM-CSF, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , GCP-2 (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos), GRO- $\alpha$  (gen  $\alpha$  relacionado a crecimiento), GRO- $\beta$  y GRO- $\gamma$ ; las cuales reclutan células fagocíticas que están involucradas en la diarrea. También se habla de una quimiocina, aún no caracterizada, conocida como PEEC (Quimioatrayente epitelial asociado a patógenos), en la cara apical y lateral de los enterocitos se expresa la ICAM-1, que colabora en el movimiento fagocítico de los neutrófilos (Withanage et al., 2004).

El incremento de la permeabilidad vascular que acompaña la inflamación junto con la pérdida de la integridad epitelial de la mucosa intestinal provoca la diarrea, al verse incrementada la salida de líquidos y electrolitos al lumen intestinal (Ochoa y Rodríguez, 2005). Los primeros indicios de enfermedad suelen ser la muerte repentina sin signología clínica previa en cuadros sobreagudos, en otros casos, se ha reportado en cabritos experimentalmente infectados la presentación de disnea, debilidad, anorexia y pirexia, y pérdida de peso durante el transcurso de la infección (Sharma et al., 2001). Además, se observa una diarrea amarilla-verdosa que en ocasiones se tiñe de sangre. El curso de la enfermedad es breve ya que la muerte sobreviene en 24 horas tras iniciados los signos (Méndez et al., 2015). A la necropsia se aprecia la región perineal teñida de diarrea amarillenta, con congestión y engrosamiento de la pared intestinal, con enteritis enterohemorrágica, linfonodos mesentéricos congestionados. El hígado comúnmente muestra ictericia, con la bilis espesa turbia con focos necróticos al igual que en los riñones (Wray y Davies, 2000).

### **2.2.2.3. *Clostridium* spp.**

*Clostridium perfringens* es un bacilo Gram positivo, anaerobio, formador de esporas perteneciente a la familia *Clostridiaceae* (Petit et al., 1999), se clasifica en cinco tipos toxicológicos, alpha (CPA), beta (CPB), tipo C, delta (CPD) y epsilon

(ETX) (Songer, 1996). En cabras, se ha reportado enterotoxemias asociadas a los tipos A, D y E (Kim et al., 2013; Uzal y Songer, 2008), que es un agente ocasional de enterotoxemia y se caracteriza por ocasionar signos clínicos tanto digestivos, respiratorios y nerviosos de presentación aguda a sobreaguda (Uzal y Kelly, 1996).

*C. perfringens* A está implicado en cuadros de enterotoxemia en ovinos en algunas regiones del mundo. Ocasiona la enfermedad del cordero amarillo en corderos, produciendo toxina alfa (CPA), aunque también podría producir toxinas E y B2 (Uzal y Songer, 2008). La estructura cristalizada de la toxina alfa de *C. perfringens* muestra que la proteína está organizada en dos dominios, el amino terminal, que contiene la actividad, y el carboxilo terminal de unión que es dependiente de calcio. Dependiendo de la composición de los lípidos de la membrana celular, la toxina alfa puede ser hemolítica en presencia de calcio (Nagahama et al., 1997). La hidrólisis de fosfolípidos de membrana resulta en la acumulación de diacilglicerol, compuesto que puede activar vías celulares que contribuyen al efecto citotóxico observado, como la vía del ácido araquidónico. Esta acumulación actúa como activador de la proteína-kinasa C, enzima que a su vez puede activar las fosfolipasas C y D de las células eucarióticas (Fujii et al., 1986; Titball, 1993). Asimismo, la activación de esta vía deriva en la producción de tromboxano A<sub>2</sub>, un mediador de la respuesta inflamatoria (Uzal et al., 2008). *C. perfringens* tipo B es responsable de algunas enfermedades de origen intestinal en rumiantes, principalmente ovejas, aunque también se han aislado cepas en animales clínicamente sanos (Uzal y Marcellino, 2002). En ovinos, la disentería del cordero y la enteritis hemorrágica ocurren en animales de menos de 3 semanas de vida, si bien también pueden observarse en animales de mayor edad. El resultado de la infección es una enterotoxemia acompañada de enteritis, hemorragia profusa y ulceración del intestino delgado (Songer, 1996). La prototoxina B comprende una secuencia de 336 aminoácidos con una secuencia señal de 27 aminoácidos que se eliminan en la secreción, resultando en una secuencia madura de 35 kDa (Songer, 1996). La toxina B es causante de disentería hemorrágica principalmente en los ovinos, con enteritis hemonecróticas, muerte súbita con signología nerviosa (Shepard et al., 2000; Songer, 1996).

*C. perfringens* tipo C ha sido causante de infecciones en cerdos, ganado, ovinos, equinos, humanos y perros, siendo los animales neonatos los más susceptibles, si se presenta una deficiencia en la colonización temprana de la microbiota intestinal por microorganismos benéficos, y la alteración de la microbiota por cambios súbitos de la dieta (Timoney et al., 1988). Hasta el momento, se sigue investigando sobre el mecanismo molecular de acción de *C. perfringens* tipos B y C, no obstante, algunos estudios indican que la toxina beta (producida por ambos tipos de *Clostridium*) forma poros en membranas de células de tipo leucocitario, endotelial y epitelial (Nagahama et al., 1997). Estos poros inducen el flujo de  $K^+$ ,  $Ca_2^+$ ,  $Na^+$  y  $Cl^-$  que produce cambios en la osmolaridad de la célula y posterior lisis. Se ha reportado la estimulación en la secreción de TNF- $\alpha$ , y la activación de receptores NK-1 de taquicinina por un mecanismo desconocido (Nagahama et al., 2003, 1997), produciendo alteración morfológica y desprendimiento de la mucosa intestinal, enteritis necrótica hemorrágica difusa o multifocal principalmente en íleon, con exceso de líquido seroso en la cavidad abdominal que puede deberse a la degeneración endotelial y necrosis vascular en las fase aguda de la infección (Miclard et al., 2009; Uzal y Songer, 2008).

Los animales enfermos presentan depresión, diarrea hemorrágica, congestión intestinal, acumulación de gas y distensión intestinal, con muerte súbita (Cho et al., 1991). *C. perfringens* tipos D y E ocasionan enterotoxemia en ovinos, caprinos, bovinos y conejos. *C. perfringens* tipo D produce signos agudos subagudos ó crónicos en los ovinos a partir del tercer mes de vida, mientras que en los caprinos son más susceptibles los animales jóvenes no vacunados. Los signos clínicos de tipo neurológico que se presentan son ceguera, opistótonos, convulsiones; espuma en la boca, balidos y postración en decúbito, muerte súbita, o signos respiratorios (Timoney et al., 1988). *C. Perfringens* tipo E ocasiona enterotoxemia en corderos, becerros y conejos (Songer, 1996). La toxina epsilon (ETX) es el principal factor de virulencia de *C. perfringens* tipos B y D. Esta toxina ocasiona elevación de la presión arterial, vasoconstricción, aumento de la permeabilidad, mientras que en sistema nervioso central ocasiona edema cerebral y en tórax edema pulmonar, en cabras y ovejas se presenta un cuadro de colitis

fibrinonecrótica. ETX es secretada como prototoxina (32.98 KDa), y se convierte en una enzima totalmente activa al activarse por acción de proteasas tales como tripsina, quimotripsina, y la producción de una metaloproteinsasa llamada toxina lambda producida por *C. perfringens*. Bhowan y Habeeb (1977). La internalización en la célula blanco se da por endocitosis mediada por receptores, que después de entrar al citosol, la toxina sufre modificaciones que permiten la formación de poros para salir de las vesículas endocíticas. Bachmeyer et al. (2001). Los efectos más destacados de ETX en la célula afectada incluye la despolimerización de filamentos de actina y un aumento de monómeros de G-actina, dando una desorganización de los filamentos intermedios del citoesqueleto, y el cambio de morfología hacia una forma redondeada con alteración de las uniones celulares, la activación de los leucocitos, la inhibición de la contracción muscular lisa y la pérdida total de la función del epiteilo intestinal (Verschuere et al., 1995).

La enfermedad conocida como “disentería de los corderos” o “diarreas de las parideras del invierno”, causa enterocolitis hemorrágica durante los primeros días de vida. En las formas de evolución subaguda, predominan los cuadros diarreicos (heces fluidas, oscuras y malolientes) (Méndez et al., 2015; Uzal y Kelly, 1998). Los signos clínicos que el animal presenta son depresión, anemia, ictericia y hemoglobinuria (Uzal y Songer, 2008). A la necropsia, las lesiones macroscópicas consisten en una enterocolitis multifocal fibrinonecrótica, pulmones edematosos, y el exceso de líquido pleural. Histológicamente, se pueden encontrar zonas de necrosis fibrinonecrótica multifocal con ileitis y colitis ulcerativa, edema de la serosa del colon, y edema intersticial proteico de los pulmones (Uzal et al., 2008).

#### **2.2.2.4. *Eimeria* spp.**

*Eimeria* spp., es un agente parasitario protozoo pertenecientes al Phylum Apicomplexa, de la familia *Eimeriidae* (Woods et al., 2000). Las especies más frecuentes reportadas en cabras son *E. ninakohlyakimovae*, *E. arloingi* y *Eimeria alijevi* (Ruiz et al., 2006).

EL ciclo de vida de *Eimeria* spp., en pequeños rumiantes se caracteriza por ser homogéneo, al requerir solamente un hospedador. Su ciclo comprende dos

fases, una fase exógena, en la que se lleva a cabo la maduración de los oocistos fuera del hospedador, y una fase endógena, donde parasita el hospedero teniendo una primera replicación asexual, seguida de una reproducción sexual (Soulsby et al., 1968). El potencial proliferativo en el hospedador es alto, pues un oocisto ingerido podría originar  $3 \times 10^6$  ooquistes que se excretan en las heces (Gregory y Catchpole, 1987). Los oocistos que salen con las heces no están esporulados, los esporocistos se forman de 2 a 7 días *post* excreción de acuerdo a la especie de *Eimeria* spp., y las condiciones ambientales, siendo la humedad, temperatura y el oxígeno los más influyentes (Chartier y Paraud, 2012). Los oocistos esporulados son resistentes al ambiente exterior (sobreviven varios meses a 1 año). Sin embargo, ambientes secos, la exposición directa al sol y las temperaturas inferiores a  $-30^{\circ}\text{C}$  y superiores a  $63^{\circ}\text{C}$  limitan la supervivencia (Foreyt, 1990). Los oocistos al ser ingeridos por el hospedador, experimentan un proceso de exquistación. La pared del oocisto es degradado por los jugos gástricos, y los espozoides son liberados para penetrar las células epiteliales de la mucosa intestinal del intestino delgado para transformarse en esquizonte. Ocurren entre uno o dos ciclos de replicación asexual (esquizogonia) dependiendo la especie, en el epitelio intestinal. Finalmente, los trofozoítos penetran el epitelio del intestino grueso (fase sexual o gametogonia), para producir gamontes, gametos y posteriormente esporocistos no esporulados que se liberan en las heces (Foreyt, 1990).

Los signos clínicos que se presentan en los animales son a menudo mínimos y en la mayoría de los animales suelen ser inaparentes. En algunos casos, se puede presentar anorexia, reducción en la ganancia diaria de peso o pérdida de peso provocando que los animales se estanquen en su crecimiento (Foreyt, 1990). Hay presencia de diarrea, la cual es ligeramente suave debido a que las heces no sedimentan (Andrews, 2013). En casos de infestación masiva, la diarrea es de consistencia acuosa con moco, y cambios de color de color marrón a amarillo (Koudela and Bokova, 1998). En ciertas condiciones, la coccidiosis puede caracterizarse por una mortalidad repentina y sin precedentes signos digestivos, en particular entre los animales jóvenes entre 2 y 4 meses de edad (Chartier, 2009).



Las lesiones que se presentan en los animales asociadas a *Eimeria* spp. Se concentran principalmente en el ciego, sin embargo, también el intestino delgado pueden verse también afectados (Khodakaram, Tafti y Mansourian, 2008). El cuadro patológico general en los pequeños rumiantes es una enteritis de tipo catarral en yeyuno, íleon, ciego y posiblemente colon proximal, los cuales están congestionados y puede presentarse zonas de hemorragias acompañadas de moco y fibrina (Koudela y Bokova, 1998). La presencia de nódulos de color blanco grisáceo incrustados en la mucosa es característico de la enfermedad (Koudela y Bokova, 1998). Las lesiones histopatológicas, consisten en la pérdida del epitelio superficial con atrofia de las vellosidades con destrucción de las criptas o hiperplasia asociados con los estadios infectivos del parásito (Taylor et al., 2003).

### **2.2.3. Tratamiento del SDN en pequeños rumiantes.**

El tratamiento del SDN es mediante suministro de antibióticos tales como ampicilina, estreptomina, tetraciclina, neomicina y cloranfenicol (Tadich, 1988). Los antibióticos han sido utilizados para la prevención y tratamiento de enfermedades, así como promotores del crecimiento durante la etapa de crecimiento en los animales. Sin embargo, se ha derivado con problemas de resistencia microbiana debido a la exposición continua a dichos fármacos (Heuer et al., 2011). Las bacterias resistentes incluyen tanto los agentes patógenos y los organismos comensales, este último actúa como un reservorio potencial de elementos de resistencia móviles (Shoemaker et al., 2001). Las bacterias adquieren resistencia por medio de mutaciones de genes que codifican aspectos relacionados con el metabolismo del microorganismo, como son las bombas de flujo en membranas, enzimas degradadoras, enzimas o proteínas alternativas, subunidades ribosomales (Knapp et al., 2008). Se ha demostrado que la transferencia horizontal de genes se produce incluso entre diferentes especies bacterianas y los animales de producción se consideran un importante reservorio para la aparición y persistencia de cepas resistentes hacia los antibióticos (Khachatryan et al., 2004), ocasionando el riesgo de transferencia de bacterias resistentes a antimicrobianos o de genes de resistencia a bacterias patógenas que afectan a los humanos, convirtiéndose en un problema de salud pública (Orden-Gutiérrez y De La Fuente-

López, 2001) . Por lo tanto, en algunos países, como los integrantes de la Unión Europea (EU), han prohibido el uso total de antibióticos como aditivos en la alimentación animal desde enero del 2006 (Briz, 2006). Como alternativa para la sustitución de los antibióticos como aditivos en la dieta de los animales, se ha propuesto el uso de los probióticos, prebióticos y simbióticos.

### **2.3. Uso de probióticos en la salud y producción en pequeños rumiantes**

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) define a los probióticos como “microorganismos vivos, que administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio en la salud en el hospedero” (Hill et al., 2014).

Los probióticos son clasificados por su composición en aquellos basados en bacterias o en levaduras (Rai, et al., 2013). Los microorganismos bacterianos más utilizados como probióticos en la salud de animales son las bacterias ácido lácticas de los géneros *Lactobacillus* spp., *Propionibacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., y *Enterococcus* spp., las cuales son consideradas de uso benéfico en el hospedador (Guevara, 2011). También se ha reportado el uso de bacterias utilizadoras de ácido láctico, como *Megasphaera elsdenii* y *Selenomonas ruminantium*, que tienen capacidad de convertir el ácido láctico en ácidos grasos volátiles (AGV's) para ser absorbidos en el rumen (Nagaraja y Titgemeyer, 2007).

Se ha observado que los probióticos bacterianos en humanos y animales monogástricos disminuyen los contajes viable de patógenos debido a diferentes factores: producción de compuestos antimicrobianos, competencia por nutrientes y por sitios de adhesión (Yang et al., 2009), alteración del metabolismo microbiano incrementando o disminuyendo la actividad enzimática (Jung et al., 2008) y por la estimulación del sistema inmune (Teo y Tan, 2007; Tripathi y Karim, 2011). En el caso de los rumiantes, algunos probióticos bacterianos tienen efecto sobre el medio ruminal, y otros tienen efecto en el tracto intestinal (Elghandour et al., 2015).

En el medio ruminal, los probióticos bacterianos tienen efecto sobre el pH. Se ha reportado que al suplementar cepas de *Propionibacterium* spp., *L. plantarum* y *L. rhamnosus* en ovinos se mantiene estable el pH evitando la presentación de

acidosis ruminal (Lettat et al., 2012). Este efecto podría deberse a la facilitación del crecimiento de poblaciones microbianas, con adaptación al ácido láctico y la estimulación de las bacterias utilizadoras de lactato, y el mantenimiento de poblaciones celulolíticas como *Ruminococcus flavefaciens*, el aumento de la población de protozoarios y una disminución de poblaciones amilolíticas y de *Streptococcus bovis*, principalmente en animales con acidosis ruminal subaguda, en vacas lecheras con acidosis ruminal subaguda inducida, suplementadas con *Prevotella bryantii* 25, y en novillos de engorde a los que se les administró en la dieta *Propionibacterium* spp. cepa P15 con *Enterococcus faecium* EF212 (Chiquette et al., 2012; Ghorbani et al., 2002). Por otro lado, se ha propuesto el metabolismo del lactato en ácidos grasos volátiles (AGV's) (Seo et al., 2010). Se ha reportado *in vitro* que en contenido ruminal de ganado de engorde, la inoculación de *Propionibacterium freudenreichii* aumenta la concentración de propionato, con una reducción de la producción de metano y un aumento de la proteína microbiana en los cultivos ruminales (Meale et al., 2014).

En el tracto intestinal, se han propuesto algunos modos que los probióticos bacterianos ejercen en los rumiantes (Seo et al., 2010). Uno de los mecanismos de acción más propuestos es la capacidad de prevenir e inhibir el establecimiento de enteropatógenos en la mucosa gastrointestinal, a través de la interacción de la pared celular de la bacteria con los receptores de membrana de los enterocitos, y la producción de endotoxinas que puedan inducir a diarreas en los animales (Elghandour et al., 2015). Tabe et al. (2008), en ganado de engorde reportaron que la administración de *Lactobacillus acidophilus* (LA 51) y *P. freudenreichii* (PF 24) en la dieta de finalización disminuyó la excreción fecal de *E. coli* O157:H7 en un 66% con respecto al grupo control, sin embargo, no detectaron un efecto de reducción en la excreción de *Salmonella* spp., no obstante, disminuyó la presentación de nuevas infecciones causada por el enteropatógeno en un 32% en los animales. En otro estudio similar, se observó que la suplementación de *Lactobacillus acidophilus* NPC 747 en bovinos de engorde disminuyó la excreción de *E. coli* O:157 H7 en las heces de los animales (Brashears et al., 2003). El efecto reductor del probiótico sobre las excreciones de *E. coli* cepas productoras de toxina shiga se ha observado

también en ovinos, al suplementarles *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Streptococcus thermophilus* y *Enterococcus faecium* (Rigobelo et al., 2014). Maragkoudakis et al. (2010) demostraron que la suplementación de *Lactobacillus plantarum* (PCA 236) en cabras lecheras disminuyó las excreciones fecales de *Clostridium* spp..

Otro mecanismo de acción propuesto de los probióticos bacterianos es la producción de compuestos antimicrobianos, como el peróxido de hidrógeno, con capacidad de oxidar la pared celular bacteriana, y la destrucción de la estructura molecular de las proteínas celulares (Šušković et al., 2010). La producción de bacteriocinas por bacterias productoras de ácido láctico ejercen una acción contra las bacterias gram positivas, patógenos alimentarios como *Listeria monocytogenes*, al regular la actividad enzimática, la inhibición de la formación de esporas y la formación de poros en la pared celular, ocasionando la lisis de la bacteria (Nader-Macías et al, 2015; Mendoza et al., 2015).

En rumiantes, los probióticos bacterianos también son utilizados para mejorar el desempeño productivo de los animales (Elghandour et al., 2015). En cabras, ovejas y vacas lecheras, el uso es para mejorar la producción al incrementar la ingesta diaria de alimento, la producción de leche, el porcentaje de grasa y proteína principalmente en la fase de lactancia temprana (Seo et al., 2010). Maragkoudakis et al. (2010) en cabras lecheras observaron que *Lactobacillus plantarum* (PCA 236) aumenta el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados en leche. Sin embargo, el porcentaje de grasa total y el porcentaje de proteína no fueron diferentes respecto al grupo control. Stein et al. (2006) reportaron en vacas lecheras suplementadas con *Propionibacterium* spp., cepa P169 aumenta la producción diaria de leche en un 8.5%, aumentó el porcentaje de grasa, lactosa y de sólidos no grasos. Sun et al. (2013), observaron que la suplementación de *Bacillus subtilis* en vacas lecheras incrementa la producción diaria de leche, la grasa en leche, el porcentaje de proteína y de lactosa. También se observó una disminución de células somáticas en leche, y en el medio ruminal el probiótico aumentó la concentración de AGV's, disminuyó la concentración de ácido acético y aumentó la concentración de ácido propiónico y valérico. No obstante, el pH ruminal

disminuyó. El aumento de la producción de leche, de grasa y proteína también se ha reportado en ovejas lecheras, cuando se suplemente *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis* (Kritas et al., 2006).

En ganado de engorde y ovinos, los probióticos bacterianos ejercen un efecto en la prevención de la acidosis ruminal asociada a el alto contenido concentrados en la dieta (Ghorbani et al., 2002), y en la producción de carne, mejoramiento del crecimiento y la eficiencia alimentaria (Elghandour et al., 2015). En ovinos, la suplementación de *Enterococcus faecium cernelle* aumentó la ganancia diaria de peso (Abas et al., 2007). En corderos lactantes, la suplementación de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis* disminuyó la mortalidad asociada a enfermedades digestivas y respiratorias de un 13 a 7% (Kritas et al., 2006). En corderos en engorda, *Lactobacillus acidophilus* cepa BT-1386 mejoró la conversión alimenticia, sin embargo, no se observó efecto sobre el rendimiento en canal y la ingesta diaria de alimento (Stephens et al., 2007).

#### **2.4. *Saccharomyces cerevisiae***

El uso de levaduras vivas o liofilizadas como aditivo en las dietas de rumiantes se ha ido incrementando debido a que tiene efectos benéficos en la producción animal (Chaucheyras-Durand et al., 2008). El principal motivo por el que se recurre a la suplementación con 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 *S. cerevisiae*.

Algunos cultivos o productos de levaduras han sido registrados como aditivos en alimentos de origen microbiano 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. Así, se disminuye el uso de antibióticos y la posible aparición de resistencia de las poblaciones bacterianas a tratamientos antimicrobianos, limitando además la excreción y diseminación hacia otros animales (Chaucheyras-Durand et al., 2008; Tripathi y Karim, 2011).

#### **2.4.1. Efectos de *S. cerevisiae* sobre la producción en pequeños rumiantes**

El uso de *S. cerevisiae* como probiótico en los pequeños rumiantes se caracteriza para mejorar la producción y la salud de los animales (Desnoyers et al., 2009; Elghandour et al., 2015; Khalid et al., 2011); no obstante, existe variabilidad en sobre sus efectos. En cabras y ovejas lecheras, se ha reportado que la suplementación con levaduras en la dieta de los animales aumenta la producción diaria de leche (El-Ghani, 2004; Stella et al., 2007; Zabek et al., 2014). Sin embargo, son inconsistentes los datos que evalúan los efectos sobre la composición química de la leche. Stella et al. (2007) reportaron que al suplementar un producto comercial de levadura (Levucell SC 20 Lallemand, Francia) a cabras Saanen durante la etapa de lactación se observó un aumento de la producción diaria de leche, y la disminución del porcentaje de grasa. Hadjipanayiotou et al. (1997) en cabras y ovejas lecheras no observaron efectos sobre la producción y composición de la leche al suplementar cultivo vivo de levadura (Yea-sacc<sup>8217</sup>, Altech, USA). Gomez et al., (2014) en cabras Saanen suplementadas con una cepa comercial inactiva de *S. cerevisiae* concluyeron que la suplementación del probiótico no tuvo un efecto sobre la producción diaria y composición de la leche, mientras que la ingesta diaria de alimento, la degradación total de nutrientes, la degradación de proteína cruda y de fibra detergente neutra fue mayor en las etapa post parto, en el pico de lactancia y en la lactancia tardía. Zabek et al. (2014) reportaron que la administración de levadura liofilizada (Interyeast, Leiber GmbH, Polonia) aumentó la producción diaria de leche de las ovejas en un 16%, sin embargo, los porcentajes de proteína, grasa, lactosa y sólidos totales no fueron modificados. No obstante, se observó una disminución significativa del conteo de células somáticas en la leche. Además Zaleska et al. (2015) evaluaron el efecto de la suplementación de levadura liofilizada (Interyeast, Leiber GmbH, Polonia) y de un extracto de  $\beta$ -glucanos de levadura

(Leiber Beta-S, Leiber GmbH, Polonia) sobre la producción y calidad de la leche y parámetros reproductivos en ovejas. Reportando que la suplementación de la levadura aumentó la prolificidad en un 31.66%, y un aumento en el número de corderos nacidos vivos entre un 30 a 35%. La producción diaria de leche fue más alta en los grupos suplementados con la levadura liofilizada y el extracto de  $\beta$ -glucanos, con un aumento entre 4 a 7% de sólidos totales y 12 a 23% en el porcentaje de grasa, siendo más alto los valores en el grupo suplementado con el extracto de levadura.

En ovinos jóvenes, Hernández-García et al. (2015), observaron que la ingesta de una cepa de levadura (*S.cerevisiae*) con una mezcla de minerales (selenio y cromo) durante la etapa de engorde aumenta la ingesta diaria de alimento, sin embargo, el peso vivo, la ingesta diaria de alimento, la ganancia diaria de peso, la conversión alimenticia y los parámetros de fermentación del rumen no fueron diferentes al grupo control. Estos resultados son similares a los obtenidos por Tripathi y Karim (2011), quienes establecen que la suplementación de cultivos de levaduras vivas (*Kluyveromyces marximanus* NRRL3234, *Saccharomyces cerevisiae* NCDC42 y *Saccharomyces uvarum* ATCC9080) mejoran la ingesta diaria de alimento entre un 8-26%, y una disminución de la cantidad total de AGV's en el rumen. En contraste, Malekkhahi et al. (2015) reportaron que la suplementación de levadura viva comercial (Yea-Sacc 1026; Alltech, USA) en la dieta de los animales no afectó la ingesta diaria de alimento, la conversión alimentaria, y los parámetros ruminales. Sin embargo, observaron que el probiótico aumentó el coeficiente de degradación de la fibra detergente neutra en el medio ruminal. Zaleska et al. (2015) en corderos lactantes suplementados con levadura liofilizada (Interyeast, Leiber GmbH, Polonia) y de un extracto de  $\beta$ -glucanos de levadura (Leiber Beta-S, Leiber GmbH, Polonia), reportaron un aumento del peso vivo al final del experimento, de la ganancia diaria y la tasa de crecimiento en los animales suplementados con el extracto de levadura, sin observarse en el grupo suplementado con levadura.

En caprinos se han realizado pocos estudios con la suplementación de levadura en la etapa de crianza. Bugdayci et al. (2016) y Oguz et al. (2015) en

cabritos de 1 y 2 meses de edad respectivamente, determinaron que la suplementación de *S. cerevisiae* (Rumisacc, Integro food Industry and Trade Co, Turquía) no tuvo efecto significativo sobre la ganancia diaria de peso, la ingesta diaria de alimento, la conversión alimentaria, la calidad y tamaño de las papilas del rumen. Estos resultados podrían estar relacionados con factores asociados a la cepa, ya que se ha reportado que no todas las cepas de levadura son capaces de estimular un efecto probiótico en los animales. 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<sub>2</sub> y factores de crecimiento bacteriano) (Newbold et al., 1995). Ataşođlu et al. (2010), en cabritos Saanen de 13 días de edad durante 103 días, determinaron que la suplementación de Kefir, un producto probiótico que contiene poblaciones de *Lactobacillus* spp. ( $10^8$  UFC/ml), *Lactococcus* spp ( $10^8$  UFC/ml) y de levaduras ( $10^3$  UFC/ml) y un probiótico comercial compuesto de las poblaciones microbianas *Lactobacillus plantarum* ( $1.26 \times 10^7$  ufc/kg), *L. delbrueckii* ( $2.06 \times 10^7$  ufc/kg), *L. acidophilus* ( $2.06 \times 10^7$  ufc/kg), *L. rhamnosus* ( $2.06 \times 10^7$  ufc/kg), *Bifidobacterium bifidum* ( $2.00 \times 10^7$  ufc/kg), *Streptococcus salivarius* ( $4.10 \times 10^7$  ufc/kg), *S. facium* ( $5.90 \times 10^7$  ufc/kg), *Aspergillus oryza* ( $5.32 \times 10^7$  ufc/kg) y *Candida pintolopesii* ( $5.32 \times 10^7$  ufc/kg) (Biyoteksin<sup>TM</sup> L, Novartis) no tuvo efecto sobre la ganancia diaria de peso, el peso vivo; la ingesta diaria de dieta líquida (hasta el día 45 de vida) y de dieta sólida.

#### **2.4.2. Modo de acción de *S. cerevisiae* en rumiantes**

##### **2.4.2.1. Efectos de *S. cerevisiae* sobre la fermentación ruminal y las poblaciones microbianas**

En primer lugar conviene destacar que las levaduras tipo *S. cerevisiae* no son organismos autóctonos del tracto digestivo de rumiantes, como puede ser el caso de algunas bacterias empleadas como probióticos. Dentro de los mecanismos de acción principales 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 que el animal ingiere en 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).

Riyanti et al. (2016) evaluaron el efecto de un cultivo de levadura (*S.cerevisiae* cepa NRRL 12618) en líquido ruminal a nivel *in vitro* y encontraron que la levadura aumentó las poblaciones microbianas, mantuvo constante el pH del cultivo ruminal, aumentó la concentración de amoniaco y de AGV's totales. Sin embargo, la suplementación de levadura no modificó la concentración molar del propionato, lactato y acetato, mientras que la concentración de isovalerato aumentó. Pinloche et al. (2013), analizaron el efecto de suplementación de *S. cerevisiae* Sc47 (Lesaffre Feed Additives, Marquette-Lez-Lille, Francia) en vacas lecheras Holstein canuladas con dieta altas en concentrado sobre la microbiota ruminal, confirmando que las poblaciones bacterianas celulolíticas (*Fibrobacter spp.* y *Ruminococcus spp.*) y las utilizadoras de ácido láctico (*Megasphaera spp.*; *Selenomonas spp.*) aumentaron en las vacas suplementadas y se detectaron cantidades bajas de *Prevotella spp.* y de *Mitsuokella spp.*; los cuales son 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 *S. cerevisiae* es útil al revertir la acidosis ruminal.

En cambio, Beauchemin et al. (2003) al analizar en líquido ruminal de novillos canulados el efecto de *S. 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) analizaron el efecto de *S. cerevisiae* sobre las poblaciones microbianas en heces en ovejas Suffolk canuladas alimentadas con una dieta alta en concentrados y otra baja en concentrado; en donde detectaron que en los corderos suplementados con la levadura, aumentaron la población de bacilos significativamente ( $P < 0.05$ ) en la dieta alta en concentrado, mientras que en las cantidades de enterobacterias no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los grupos de tratamientos, pero si entre dietas ( $P < 0.05$ ). Los autores explicaron 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). Mosoni et al. (2007) al determinar el efecto de *S. cerevisiae* sobre poblaciones celulolíticas ruminales en corderos canulados con dietas con 50% de concentrado, no detectaron 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*.

Chaucheyras-Durand y Fonty (2002) en corderos neonatos evaluaron el efecto de *S. 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, encontraron similares cantidades de bacterias celulolíticas en ambos grupos, por lo que concluyen que la suplementación de la levadura en los corderos tiende a aumentar la colonización de las bacterias celulolíticas en el nacimiento.

#### **2.4.2.2. Efectos de *S. cerevisiae* sobre enteropatógenos y diarreas en rumiantes**

Existen trabajos que reportan que *S. 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). La posible acción reductora de *S. cerevisiae* sobre enteropatógenos podría deberse a su metabolismo.

En ensayos *in vitro* en contenido ruminal se ha detectado cantidades altas de etanol y de AGV's, principalmente lactato, 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 de AGV's en contenido ruminal *in vivo* pueden ser distintas por su absorción por el epitelio ruminal (Chaucheyras-Durand et al., 2010; Chaucheyras-Durand et al., 2008). No obstante, aún se desconoce si *Saccharomyces* spp., ejerce una acción similar de reducción de bacterias en el intestino de rumiantes como en monogástricos. Esta acción 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. 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). Esto se debe a, como se ha señalado previamente, el ambiente anaerobio-reductor del tracto digestivo no es el natural para su crecimiento.

Liou et al., (2009) reportaron en un experimento *in vivo* que después de 11 días de inoculación de *E. coli* 0:157H7 disminuye su excreción en heces en vaquillas charoláis suplementadas con *S. cerevisiae* (Original XP yeast culture, Diamond V

Mills, USA) En cambio, Ghazanfar et al. (2015) establecen que la suplementación de *S. cerevisiae* en la dieta de vaquillas aumentó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de lactobacilos en heces, 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. Por otro lado, Brewer et al. (2014) reportaron un efecto reductor de *S. cerevisiae* sobre *Salmonella typhimurium* en becerros neonatos, a los que desafió con el enteropatógeno y se les suplementó la levadura en leche y alimento, observándose al sacrificio una reducción del patógeno en aquellos animales alimentados con la levadura al realizar el conteo en placa, además de que presentaron un mayor crecimiento de las papilas del rumen, lo que se vio reflejado en una mayor ganancia de peso (23.8 % en contra de 17.2, respectivamente), y una disminución de la presentación de diarreas y pirexia en los animales con la suplementación del probiótico. Sin embargo, Eicher et al. (2010) al suplementar distintas dosis de  $\beta$ -glucanos derivados de levadura en becerros neonatos con largos periodos de transporte, no detectaron efecto alguno sobre las excreciones de *E. coli* y *S. typhimurium*.

En pequeños rumiantes, Olvera-Ramírez (2007) reportó que la suplementación de una levadura viva (Biosaf, Phileo, Lessafre Animal Care, Francia) no influyó sobre el flujo de *L. innocua* en rumen, duodeno o en heces, en ovinos canulados, bajo condiciones controladas, y alimentados con una dieta a base de 50% de concentrado y 50% de forraje. De la misma manera, García-Trejo (2015) observó que la suplementación de levadura viva (Procreatin 7, Phileo, Lessafre Animal Care, México) en la dieta de los animales no tuvo influencia sobre las UFC de la familia bacteriana tanto en rumen como en heces en corderos de engorda,

pero si observó una diferencia en las cantidades de bacterias cuantificadas entre días, siendo menores las UFC en el último día de experimento, Mientras que Ramírez-Ramírez (2015) con los mismos animales, reportó que la suplementación de *S. cerevisiae*. (Procreatin 7, Phileo, Lessafre Animal Care, México), y la inoculación de *Listeria innocua* no afectó la ganancia diaria de peso, la eficiencia alimenticia y el pH ruminal de los corderos. Por otro lado, Kumagai et al. (2004), observaron que la suplementación de un probiótico compuesto de Lactobacilos, Bacilos, estreptococos, y de levaduras *Saccharomyces* spp., y *Candida* spp., no tuvo efecto sobre las cantidades de enterobacterias en heces en corderos canulados con dietas altas en concentrado y forraje. Sin embargo, se detectó una diferencia en las excreciones de las bacterias al comparar a los animales por dieta experimental, al ser menor la cantidad de UFC en los animales con la dieta alta en concentrado. Stella et al. (2007), detectaron un aumento de UFC de *S. 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 ambiental desafiado (*Escherichia coli*) en las cabras tratadas.

#### **2.4.2.3. Efectos de *S. cerevisiae* sobre la respuesta inmune en pequeños rumiantes**

Con respecto al efecto de la suplementación de *S. cerevisiae* var., *cerevisiae* sobre la respuesta inmune en rumiantes, existen estudios enfocados principalmente a evaluar la respuesta inmune de tipo humoral. Tao et al. (2015), establecen que la suplementación de diferentes dosis de  $\beta$ -glucanos de *S. cerevisiae* (25, 50, 75, 100 y 200 mg) no tuvo efecto sobre las concentraciones tisulares de IgA de becerros durante la crianza, pero las concentraciones plasmáticas de IgG e IgM aumentaron significativamente con respecto a los becerros no suplementados. Magalhães et al. (2008) observaron que la suplementación de una cepa comercial de *S. cerevisiae* (Diamond V XP Yeast Culture, Diamond V Mills Inc, USA) en becerros neonatos en la dieta no indujo a un aumento de las concentraciones de anticuerpos en los becerros durante el proceso

experimental (70 días). No obstante, al evaluar la actividad fagocítica de los neutrófilos, la levadura tendió a aumentar la fagocitosis de bacterias. Campos-Granados y Augusto (2015) reportaron una mayor concentración de inmunoglobulinas en el calostro en vacas próximas al parto que fueron suplementadas 21 días antes del parto con una dosis de 40 g de pared celular y producto de fermentación de levadura (Celmanax, Church y Dwight Co., USA). Sin embargo, no se observó diferencias significativas en los niveles sanguíneos de IgG de las becerras en ambos grupos. En corderos, Malaczewska et al. (2010) evaluaron el efecto inmunoestimulador de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* en la respuesta inmune específica y no específica en corderos de 30 días. Reportando un aumento en las concentraciones de gamma globulinas totales en sangre de los animales con la levadura a mediados y finales del proceso experimental (del día 30 al 65) con respecto a los animales control. Aunado a esto, observaron una mayor actividad y proliferación de linfocitos en los corderos que se suplementaron con la levadura días después de iniciado el experimento; sin embargo no se encontraron diferencias en la actividad fagocítica de los neutrófilos. (Hussein, 2014) al suplementar un probiótico que contiene *S. cerevisiae* cepa SC-47, y *Lactobacillus sporogenes* (BIOVET- YC, Wockhardt Limited, India) en corderos de tres semanas de edad, observó un aumento de globulinas totales en sangre, así como un aumento en el conteo total de leucocitos en la sangre de los animales; similarmente, Milewski et al. (2009) reportaron que la administración de *S. cerevisiae* (Inter yeast, Leiber GmbH, Polonia) en la dieta de corderos tuvo un efecto significativo en el conteo total leucocitario, como consecuencia del aumento en el porcentaje de linfocitos.

Zabek et al. (2014) en ovejas lecheras suplementadas con un probiótico comercial de levadura liofilizada (Inter yeast, Leiber GmbH, Polonia), observaron un aumento de la cantidad de globulinas totales, la actividad de la celuloplasmina y lisozima, de la actividad fagocítica celular y el aumento de la actividad de los linfocitos T y B.

### III. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades digestivas tienen una alta repercusión económica durante la etapa de crianza en los pequeños rumiantes, no sólo por las tasas de morbilidad y mortalidad que ocasionan (que van del 10 al 50% dependiendo la gravedad de la enfermedad), sino también por el retraso en el desarrollo de los animales, así como los gastos en los tratamientos (Espinosa, 2004; Méndez et al., 2015), aumentando así los costos de producción. Aunado a esto puede existir un incremento en la resistencia microbiana que generan los antibióticos al ser adicionados en el alimento como tratamiento preventivo para enfermedades. Por lo que, el uso de antibióticos ha sido prohibidos en países que integran la Unión Europea (Briz, 2006), mientras que en los Estados Unidos de Norteamérica los antibióticos son regulados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), la cual supervisa que sean utilizados solo por Médicos Veterinarios en animales enfermos con los tiempos de retiro antes de la matanza de los animales, prohibiendo su uso como promotores de crecimiento (Schneider, 2015).

El uso de levaduras como probióticos puede ser una alternativa para mejorar la salud intestinal de los rumiantes. Se ha comprobado que la suplementación de la levadura en la dieta disminuye la excreción y disminución de la prevalencia de enfermedades digestivas y respiratorias en becerras (Brewer et al., 2014; Galvão et al., 2005). En cabras adultas se ha reportado que la suplementación de *S. cerevisiae* disminuye la excreción de *E. coli* y mejora la producción de leche (Stella et al., 2007), mientras que en cabritos jóvenes de 4 meses de edad disminuyeron la excreción de coliformes totales en heces (Özsoy et al., 2013). Sin embargo, existen pocos estudios que evalúen el efecto probiótico de *Saccharomyces cerevisiae* en la etapa de crianza de los cabritos. No obstante, dichos estudios han demostrado únicamente su efecto en los indicadores productivos, por lo que su uso podría ser útil para reducir los problemas de mortalidad asociados a las bacterias enteropatógenas ambientales. Además, se sabe que no todas las cepas de levadura tienen la misma respuesta, por lo que la suplementación podría también mejorar la respuesta inmune del cabrito como se ha observado en corderos y becerros (Malaczewska et al., 2010; Tao et al., 2015). Por

lo tanto, este estudio pretende evaluar la influencia de la suplementación de levadura en la reducción de enteropatógenos y parámetros productivos en los cabritos.



## IV. HIPÓTESIS

“La suplementación de levadura cambia la excreción de enteropatógenos ambientales y los parámetros productivos durante la etapa de crianza”.

## V. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de la suplementación de un probiótico de levadura (*Saccharomyces cerevisiae cerevisiae*) sobre la excreción de enteropatógenos ambientales y la respuesta productiva durante la etapa de crianza.

### 5.2. Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto de la levadura sobre la excreción la familia *Enterobacteriaceae* y de enteropatógenos ambientales (*Salmonella* spp., *Escherichia coli*, Coccidias y *Eimeria* spp.) mediante la cuantificación de UFC en heces por medio de PCR en tiempo real.
2. Evaluar el efecto de la levadura sobre la excreción de oocistos de *Eimeria* spp. mediante la técnica de McMaster.
3. Evaluar el efecto de la suplementación de la levadura en la dieta sobre la ganancia diaria de peso de los cabritos.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Lugar experimental

El experimento se realizó en la unidad de producción caprina “Granja del Carmen”, ubicada en la localidad de Fuentezuelas, Municipio de Tequisquiapan, Qro. Las muestras se analizaron en el laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Naturales, Campus Juriquilla. El proyecto fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro con la emisión de la resolución 53FCN2016 (Anexo 1).

### 6.2. Diseño experimental y tamaño de muestra

Este trabajo se llevó a cabo bajo un modelo experimental de dos grupos al azar. La determinación del tamaño de la muestra se obtuvo de acuerdo a la ecuación para comparación de medias entre dos grupos (Gallego, 2004), obteniendo una n por tratamiento igual a 12, con valor de  $\alpha = 0.05$ .

$$n = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 s^2}{d^2}$$

Donde:

$Z_{\alpha}$ : valor Z correspondiente al riesgo  $\alpha$  fijado

$Z_{\beta}$ : valor Z correspondiente al riesgo  $\beta$  fijado

S: desviación estándar

d: valor mínimo de la diferencia que se desea detectar

### 6.3. Tratamientos experimentales

Los tratamientos experimentales fueron: a) Dieta basal (n=12), y b) Dieta basal + 0.5 g/día ( $1.25 \times 10^{12}$  UFC) de levadura liofilizada *Saccharomyces cerevisiae* (Biosaf, Phileo, Lesaffre Animal Care, México). La levadura fue suplementada desde el tercer a cuarto día de edad hasta el día 70 experimental.

El manejo de administración de la levadura se llevó a cabo diariamente, durante todo el experimento la levadura se suplementó diluida en agua con jeringa dosificadora de acuerdo al protocolo descrito por la FAO (2016). La levadura total

dosificada previamente fue depositada en un recipiente, y se vertió agua (Volúmen final de 10 ml por dosis), se homogenizó la levadura y se depositaron en los dosificadores orales. Posteriormente, se abrió la boca del animal y se colocó la cánula de la jeringa de forma que se situara por detrás de la base de la lengua del animal. Se presionó lentamente el émbolo para que el animal tomara el líquido.

#### **6.4. Dieta experimental**

Los cabritos durante las primeras dos semanas *post* nacimiento se les alimentó con leche de cabra *ad libitum*, en las cuales los primeros 3 días fué mediante biberones individuales de 500 ml (Labelvage, Francia) y se adaptaron los animales al consumo de leche en cubetas de lactancia de 10 chupones y capacidad de 18 litros. Durante las primeras semanas de lactancia, a los animales se les ofreció tres tomas diarias de leche (2 litros de leche por animal al día). A partir de la segunda semana se ofreció alfalfa henificada con alimento preiniciador (cuadros 2 y 3) una vez al día (al amanecer) y consumo de agua *ad libidum*. Al alcanzar los 7 kg de peso vivo (PV), las tomas de leche disminuyeron 2 veces al día (toma matutina y tarde). Posteriormente, al alcanzar los 12 kg de PV se ofreció una toma diaria de leche en la mañana de 1500 ml de leche por animal. Días antes del destete, cuando los animales alcanzaron o rebasaron 13.5 kg de PV (a partir de la semana octava de edad), se les restringió el consumo de leche a 500 ml diarios por tres días, mientras que se aumentó el concentrado preiniciador y el heno de alfalfa. Se tomaron muestras de los alimentos sólidos para el análisis de materia seca (MS), proteína seca (PC), extracto etéreo (EE), Cenizas, de acuerdo a la AOAC (2000) y Fracciones de fibra de acuerdo a Van Soest *et al.* (1991), en el laboratorio de Nutrición Animal de la FCN.

Cuadro 1. Composición química del alimento preiniciador utilizado en la lactancia

<i>Composición Química</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Materia seca (%)</i>	<i>89.63</i>
<i>Proteína cruda (%)</i>	<i>27.45</i>
<i>Extracto etéreo (%)</i>	<i>6.39</i>
<i>Fibra Detergente Neutro (%)</i>	<i>41.70</i>
<i>Extracto libre de nitrógeno</i>	<i>15.91</i>
<i>Fibra Detergente Ácido (%)</i>	<i>11.63</i>

Cuadro 2. Composición química de la leche de cabra

<i>Composición Química</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Materia seca (%)</i>	<i>12.24</i>
<i>Proteína (%)</i>	<i>26.67</i>
<i>Grasa (%)</i>	<i>27.12</i>
<i>Extracto libre de nitrógeno</i>	<i>38.77</i>
<i>Cenizas (%)</i>	<i>7.44</i>

Cuadro 3. Análisis químico de la alfalfa henificada

<i>Composición Química</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Materia seca (%)</i>	<i>95.45</i>
<i>Proteína cruda (%)</i>	<i>16.62</i>
<i>Extracto etéreo (%)</i>	<i>1.38</i>
<i>Fibra Detergente Neutro (%)</i>	<i>56.04</i>
<i>Fibra Detergente Ácido (%)</i>	<i>32.26</i>
<i>Extracto libre de nitrógeno</i>	<i>16.11</i>
<i>Cenizas (%)</i>	<i>9.85</i>

## **6.5. Animales experimentales, corrales y manejo**

En el experimento se utilizaron veinticuatro cabritos (hembras y machos) de razas Alpino Francés y Toggenburg, de tres a cuatro días de edad, calostrados naturalmente, con un peso al nacer promedio de 3.7 kg. Previo al experimento, se auxilió en los nacimientos de los animales de acuerdo a los protocolos establecidos en la unidad de producción. Una vez nacidos y calostrados todos los cabritos fueron separados en 2 corrales grupales contemplando el requerimiento de espacio por animal en crianza de 0.3 m<sup>2</sup> hasta el momento del destete de 0.8 m<sup>2</sup> (FAO, 2017). Los corrales fueron elaborados a base de malla borreguera, techos de lámina galvanizada, echaderos con paredes de madera, piso de tierra, bebederos, cubos de lactancia y comederos. Las instalaciones estaban bien iluminadas, con adecuada ventilación y con la capacidad de proteger de las condiciones medioambientales a los animales. La limpieza de los corrales se realizó diariamente mediante la remoción de estiércol, mientras que las mamilas y cubetas se limpiaron inmediatamente después de alimentar con la leche a los cabritos al lavarlos con detergente comercial y jabón quirúrgico (Universidad de Hertfordshire, 2011).

## **6.6. Toma de muestras**

Muestras rectales, contenido ruminal se tomaron para evaluar la excreción de enteropatógenos y pH ruminal, así como muestras de sangre y calostro para evaluar indirectamente la concentración de inmunoglobulinas; a continuación se describe cada uno.

### **6.6.1. Toma de muestras fecales y evaluación de diarreas por duración y severidad.**

Las muestras fecales se tomaron al inicio del experimento y semanalmente hasta el día 70 experimental (día 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70). La toma de muestra se realizó de acuerdo al procedimiento modificado de las operaciones estándar para la colección de muestras en pequeños rumiantes (Department of Primary Industries NSW, 2015), que se describe brevemente a continuación: primeramente se inmovilizó a cada animal mediante contención física, posteriormente se pasó suavemente en la región recto-anal un asa recolectora de

heces previamente lavada y desinfectada con solución de hipoclorito de sodio al 10%. Se masajéó suavemente la pared rectal, para con el asa retirar el contenido fecal, o en caso de ausencia de heces, estimular la defecación. Las heces se depositaron en bolsas transparente estériles, se rotularon en las mismas la fecha de muestreo, el número de identificación del animal y el tratamiento al que pertenecía. Después de ser obtenidas se mantuvieron en refrigeración, posteriormente se trasladaron al laboratorio de Microbiología Veterinaria de la FCN, donde se mantuvieron en congelación a temperatura de -80°C.

Muestras fecales fueron tomadas por tratamiento para análisis de parasitología cada 14 días a partir del inicio del experimento bajo el siguiente protocolo: en bolsas de 14x16 cm se depositaron 5 muestras de heces frescas al azar por cada uno de los corrales, teniendo cuidado de no tomar partes de la muestra que pudieran estar contaminadas con tierra. Las muestras se conservaron a 4°C para su posterior uso. Se determinó la duración y severidad de las diarreas de los animales por semana experimental, de acuerdo a McGuirk (2008). La severidad fue evaluada acuerdo a la siguiente escala: 0= heces firmes; 1= heces semifirmes; 2=Heces semilíquidas, y 3=Heces de consistencia líquida y presencia de malestar en el animal. La duración fue monitoreada en base a días durante cada semana experimental.

#### **6.6.2. Toma de contenido ruminal y medida de pH**

La toma de muestras de contenido ruminal de los cabritos se llevó a cabo al día 56 y 70 experimental, después del alimento de la mañana, mediante el uso de sonda esofágica de acuerdo a lo establecido del manual para el personal auxiliar de sanidad animal primaria de la FAO (1995) y Ramos-Morales et al. (2014). El manejo consistió de la sujeción física del animal, de tal forma que la cabeza del animal quedase ángulo hacia arriba. Un pequeño tubo de plástico se colocó sobre la boca del animal. En la cavidad oral del animal se introdujo una sonda esofágica de material moderadamente flexible de alrededor de 125 cm de longitud por 6 mm de diámetro interno con punta roma previamente lubricada, la cual fue dirigida por el esófago hacia el rumen. El flujo de contenido ruminal fue estimulado por presión negativa, generada por un frasco de polietileno adaptado con un dispositivo

(extractor de flemas). El contenido ruminal se depositó primeramente en el frasco, donde se midió el pH con un potenciómetro portátil (Waterproof Tester, HANNA instruments, USA).

### **6.6.3. Toma de muestras sanguíneas**

Las muestras de sangre a los cabritos se tomaron a las 24 horas de nacidos mediante venopunción yugular bajo el protocolo modificado del manual para el personal auxiliar de sanidad animal primaria de la FAO (2016). La obtención de sangre fue mediante la vena yugular externa, la cual se presionó levemente en la parte inferior del cuello, se desinfectó el sitio de punción e insertó en un ángulo de 45° de la vena la aguja doble (21Gx38mm, Vacutainer, Becton Dickson and Company, USA) empatada previamente con la camisa vacutainer (Vacutainer, Becton Dickson and Company, USA). La extracción de sangre se realizó mediante tubos colectores para serología (Vacutainer, Becton Dickson and Company, USA). Los tubos se conservaron en posición vertical a temperatura ambiente por un lapso de 30 a 60 minutos para favorecer la coagulación, y posteriormente se obtuvo suero sanguíneo de acuerdo al protocolo establecido por Johnson et al. (2007). La sangre se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos. El suero obtenido se depositó en tubos de 2 ml, y se conservó a temperatura de 4°C para su posterior uso.

### **6.6.4. Identificación de especies de *Eimeria* spp.**

La identificación de especies de *Eimeria* spp., se realizó mediante la visualización de los oocistos por microspía, por técnica de flotación. 2 g de heces refrigeradas se homogenizaron en 15 ml de solución salina hipersaturada en un mortero. La mezcla se filtró con una capa doble de gasas, y se dejó reposar por 5 minutos. Una gota del sobrenadante se depositó en un portaobjetos. Los oocistos se visualizaron a 40x en un microscopio óptico con cámara digital (Axio Vert.A1, Zeiss, Alemania). La identificación de las especies se realizó mediante morfología de los oocistos, al determinar el tamaño (expresado en  $\mu\text{m}$ ), la y la presencia y forma del tapón del micrópilo, mediante el programa ZEN AxioVision Rel. 4.8.2.-SP2, (Zeiss, Alemania).

### **6.6.5. Toma de muestra de calostro**

Las muestras de calostro de las madres fueron tomadas para determinar la calidad al evaluar de forma indirecta la concentración de inmunoglobulinas, de la siguiente manera. Al momento del parto de cada cabra, se desecharon los primeros tres eyecciones de la glándula mamaria, y se extrajo 25 ml de calostro de cada medio para completar 50 ml de muestra, colectada en un tubo eppendorf. La muestra se mantuvo a temperatura ambiente para su inmediato análisis (ver 6.8.2).

### **6.7. Variables productivas**

La variable productiva que se obtuvo fue la ganancia diaria de peso, peso al nacimiento y peso al final del experimento. La medición se llevó a cabo realizando el pesaje de los animales semanalmente, utilizando una báscula digital.

### **6.8. Análisis de las muestras**

#### **6.8.1. Determinación de proteínas totales a partir de las muestras de suero a las 24 horas de nacimiento de los animales.**

La determinación de la transferencia de inmunidad pasiva en los cabritos fue realizada por medio de un refractómetro densímetro manual (ATAGO, Co., LTD, EUA), el cual mide proteínas séricas totales en base a g/dL. La transferencia de inmunidad pasiva se consideró adecuada cuando los animales obtuvieron cantidad de proteínas séricas totales igual o mayor a 5.0 g/dL equivalente a 35.5 mg de Ig/ml (71% del de proteínas totales entre 24 a 48 horas de nacimiento) (Méndez et al., 2005; Montero y Jimenez, 2005).

#### **6.8.2. Análisis de la calidad de calostro por medio del calostro densímetro.**

La determinación indirecta de la concentración de globulinas en el calostro de las madres se hizo mediante un densímetro de calostro (Kruuse Colostrum Densimeter, Kruuse, Dinamarca), siguiendo las indicaciones del fabricante. En el cual, en una probeta de 50 ml se colocó la muestra recolectada de las madres al momento del parto, la muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente (20°C). El densímetro se introdujo en la probeta, el cual se sumergió en el calostro sin rozar las paredes del recipiente. En el momento en el que el densímetro dejó de sumergirse en el calostro, se realizó la lectura de la escala del densímetro, y la



interpretación de la calidad se hizo de acuerdo a las especificaciones realizadas por los fabricantes:

- Gravedad específica (SG) menor de 1035: Calidad inferior (zona roja).
- SG entre 1035-1045: Calidad intermedia (Zona verde claro).
- SG mayor a 1045: Calostro de buena calidad (zona verde oscuro).

### **6.8.3. Detección de oocistos de *Eimeria* spp., en muestras de heces.**

La técnica de McMaster fue utilizada para la cuantificación de oocistos de *Eimeria* spp., de acuerdo al protocolo establecido por Whitlock (1948). De las muestras de heces obtenidas se pesaron 2 gramos de materias fecales frescas y se colocaron en un mortero, a las cuales se añadieron 28 ml de solución salina hipersaturada para disolver la muestra. Posteriormente, la suspensión fecal se filtró con un colador de malla fina (0.5 mm de apertura) y se depositó en un recipiente limpio. La suspensión fecal se dejó reposar por un lapso de 2 minutos. Con una pipeta Pasteur se tomó sobrenadante de la mezcla para depositarla en la cámara de McMaster, y se visualizó en un microscopio óptico a objetivo de 10x, para realizar el conteo de oocistos expresado en unidades por gramo de heces. El conteo de oocistos por muestra se realizó por triplicado.

## **6.9. Técnicas moleculares**

### **6.9.1. Extracción del DNA de las muestras**

La extracción de DNA de las muestras de heces se realizó con el kit de extracción QIAamp DNA stool mini kit (QIAGEN, Alemania), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. De cada muestra congelada se pesaron 0.20 g y se depositaron en un tubo de 2ml. A los tubos se adicionó 1400 µl de buffer ASL (previamente se verificó que no estuviera precipitado, en caso de precipitación se disolvió en baño María a 70°C). Las muestras se mezclaron en el vórtex hasta que estuvieran completamente disueltas en el buffer (en el caso de heces demasiado sólidas se recurrió a una primera homogenización manual con pistilos previamente esterilizados al momento de agregar esta solución). Posteriormente, los tubos se incubaron en un baño seco FE-401 (Felisa, México) a 70°C por 5 min, y se homogenizaron brevemente en el vórtex por 15 seg para centrifugarse a 20,000xg

por 2 min. Del sobrenadante se tomó máximo 1200 µl y fueron depositados en un tubo nuevo de 2 ml. La tableta InhibitEX se adicionó a los tubos, los cuales se homogenizaron en vórtex por 1 min o hasta que la tableta estuviera completamente disuelta. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente por 1 min. Las muestras se centrifugaron a 20,000xg por 6 min. El sobrenadante se depositó en tubos nuevos de 1.5 ml, los cuales se centrifugaron a 20,000xg por 3 min. Del sobrenadante se tomaron 200 µl y se vertieron en tubos nuevos de 1.5 ml, con 15 µl de Proteinasa K. A los tubos se añadió 200 µl de buffer AL, y se homogenizaron por 15 seg en el vórtex. Los tubos se incubaron a 70°C por 10 min en el baño seco. Posteriormente, a los tubos se añadió 200 µl de Etanol 96-100% y se homogenizaron brevemente en el vórtex. La mezcla se vertió en columnas QIAamp y se centrifugaron a 20,000xg por 1 min. El filtrado se desechó y la columna se depositó en un tubo colector nuevo de 2 ml. A las columnas se vertió 500 µl de buffer AW1 y se centrifugó a 20,000xg por 1 min. El filtrado se desechó y la columna se colocó en un nuevo tubo colector de 2ml. A las columnas se les añadió 500 µl de buffer AW2, para centrifugar a 20,000xg por 5 min. El filtrado se desechó y la columna se depositó en un tubo nuevo de 1.5 ml. A las columnas se les adicionó 100 µl de buffer AE, y se incubaron a temperatura ambiente por 1 min. Las columnas se centrifugaron a 20,000xg por 1 min. La cantidad y calidad del ADN se determinó mediante un espectrofotómetro (Nanodrop 2000c; Thermo Scientific, USA) y por electroforesis utilizando gel de agarosa al 0.7% a 90v por 30 min. El DNA se mantuvo a -20°C para su posterior uso.

#### **6.9.2. Cuantificación de enterobacterias en muestras de heces por qPCR.**

La cuantificación de UFC de enterobacterias se realizó mediante la técnica de PCR en tiempo real (qPCR). El protocolo de amplificación para la familia *Enterobacteriaceae* fue de acuerdo a Castillo et al. (2006). La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la qPCR se describe en el cuadro 4. El marcador IQ SYBR Green super mix # 1708880 (Biorad, EUA), fue utilizado en la mezcla de qPCR con los reactivos que describen en el cuadro 5 para obtener así un volumen total de producto de PCR de 25 µl. El ciclo de la qPCR se realizó en base a las recomendaciones dadas por los fabricantes (Cuadro 6). Una curva estándar de

concentraciones conocidas de copias de DNA plasmídico fue utilizada para determinar la cantidad de número de gen en las muestras, la cual fue realizada en diluciones 1:10 seriadas. El análisis del DNA extraído de las muestras de heces se realizó por duplicado. El termociclador utilizado para la qPCR fue iCycler iQ Real Time PCR Detection System #170-8740 (Bio-Rad, USA).

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 grupo y día experimental, transformándose a  $\text{Log}_{10}$  para la distribución normal.

Cuadro 4. Oligonucleótidos utilizados para la Amplificación del DNA de las enterobacterias en la mezcla de reacción.

<i>Oligonucleótido</i>	<i>Secuencia del oligonucleótido</i>	<i>Orientación</i>
<i>Oligo Entero sentido: 5'</i>	<i>ATGGCTGTCGTCAGCTCGT</i>	<i>Sentido</i>
<i>Oligo Entero Anti Sentido: 3'</i>	<i>CCTACTTCTTTTGCAACCCACTC</i>	<i>Antisentido</i>

(Castillo et al., 2006)

Cuadro 5. Ciclo de amplificación qPCR para la cuantificación de enterobacterias.

<i>Proceso del ciclo</i>	<i>Número de ciclos</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo (min)</i>
<i>Pre calentamiento</i>	<i>1</i>	<i>95°C</i>	<i>0:30</i>
<i>Desnaturalización inicial del DNA</i>	<i>1</i>	<i>95°C</i>	<i>10:00</i>
<i>Desnaturalización del DNA</i>	<i>35</i>	<i>95°C</i>	<i>0:15</i>
<i>Alineación de los oligonucleótidos</i>	<i>35</i>	<i>60°C</i>	<i>0:20</i>
<i>Extensión</i>	<i>35</i>	<i>72°C</i>	<i>0:30</i>
<i>Análisis de disociación</i>	<i>40</i>	<i>Gradiente 55-95°C</i>	<i>00:30</i>
<i>Conservación del producto obtenido</i>	<i>1</i>	<i>4°C</i>	<i>Tiempo indefinido</i>

Cuadro 6. Reactivos utilizados qPCR mix para la cuantificación de enterobacterias.

<i>Reactivos para la PCR mix (25 µl)</i>	<i>Volumen (µl)</i>
<i>SYBR Green super mix # 1708880</i>	<i>12.5</i>
<i>Oligo Entero Antisentido (100µM)</i>	<i>0.075</i>
<i>Oligo Entero Sentido (100µM)</i>	<i>0.075</i>
<i>H2O Estéril uso molecular</i>	<i>10.35</i>
<i>DNA de la muestra</i>	<i>2</i>

### 6.9.3. Detección de *Salmonella* spp. PCR punto final.

La detección de *Salmonella enterica* se realizó a partir del DNA extraído de las muestras de heces mediante la técnica de PCR final. El protocolo de amplificación para *S. enterica* fue de acuerdo a lo establecido por Garrido et al. (2013). La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la PCR se describe en el cuadro 7. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo mediante el kit preparado

Hot start Maxima mix #1051 (Thermo scientific, USA), y se realizó la mezcla para el PCR con los reactivos que describen en el cuadro 8 para obtener así un volumen total de producto de PCR de 12  $\mu$ l. El ciclo de la qPCR se realizó en base a las recomendaciones dadas por los fabricantes (Cuadro 9). Los productos de la PCR fueron sometidos a electroforesis de 60 volts por 60 minutos en geles de agarosa al 1.6%. Las muestras se depositaron 6x en el gel con buffer de carga que contenía marcador gel red en dilución 1:10000.

Cuadro 7. Oligonucleótidos utilizados para la Amplificación del DNA de *Salmonella* spp. en la mezcla de reacción.

Oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido	Orientación
<i>Oligo Inv A3F</i>	AACGTGTTTCCGTGCGTAAT	Sentido
<i>Oligo Inv A3R</i>	TCCATCAAATTAGCGGAGGC	Antisentido

(Garrido et al, 2013)

Cuadro 8. Reactivos para la elaboración de la PCR mix para la detección de *Salmonella* spp

Reactivos para la PCR mix (12 $\mu$ l)	Volumen ( $\mu$ l)
Master mix Thermo Hot start 1051	6
<i>Oligo Inv A3F</i> (10 $\mu$ M)	0.12
<i>Oligo Inv A3R</i> (10 $\mu$ M)	0.12
BSA 1:10	1.8
H2O Estéril uso molecular	1.96
DNA (5ng/ $\mu$ l)	2

Cuadro 9. Ciclo de amplificación PCR para la detección de *Salmonella* spp.

<i>Proceso del ciclo</i>	<i>Número de ciclos</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo (min)</i>
<i>Desnaturalización inicial del DNA</i>	1	95°C	04:00
<i>Desnaturalización del DNA</i>	35	95°C	0:30
<i>Alineación de los oligonucleótidos</i>	35	57°C	0:30
<i>Extensión</i>	35	72°C	0:30
<i>Extensión final</i>	1	72°C	05:00
<i>Conservación del producto obtenido</i>	1	12°C	<i>Tiempo indefinido</i>

#### 6.9.4. Cuantificación de *E. coli* por qPCR

La cuantificación de número de copias de *E. coli* spp., se realizó mediante la técnica de PCR en tiempo real (qPCR). El protocolo para el ciclo de amplificación para *E. coli* fue de acuerdo a Malinen et al. (2003). La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la qPCR se describe en el cuadro 10. El marcador IQ SYBR Green super mix # 1708880 (Biorad, EUA) fue utilizado para la preparación de las reacciones de PCR, con los reactivos que se describen en el cuadro 11, con volumen final de 25 µl. El ciclo de la qPCR se realizó en base a las recomendaciones dadas por los fabricantes (Cuadro 12). Para la cuantificación absoluta se utilizó una curva estándar de concentraciones conocidas de copias de DNA plasmídico, la cual fue realizada en diluciones 1:10 seriadas. El análisis del DNA extraído de las muestras de heces se realizó por duplicado. El termociclador utilizado para la qPCR fue iCycler iQ Real Time PCR Detection System #170-8740 (Bio-Rad, USA).

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 grupo y día experimental, transformándose a Log<sub>10</sub> para la distribución normal.

Cuadro 10. Oligonucleótidos utilizados para la cuantificación de *E. coli* en la mezcla de reacción.

Oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido	Orientación
<i>E. coli F</i>	GTTAATACCTTTGCTCATTGA	Sentido
<i>E. coli R</i>	ACCAGGGTATCTAATCCTGTT	Antisentido

(Malinen et al. 2003)

Cuadro 11. Reactivos para la elaboración de la PCR mix para la detección de *E. coli* mediante qPCR

Reactivos para la PCR mix (25 $\mu$ l)	Volumen ( $\mu$ l)
SYBR Green super mix # 1708880	12.5
Oligo Antisentido (100 $\mu$ M)	0.075
Oligo Sentido (100 $\mu$ M)	0.075
H2O Estéril uso molecular	10.35
DNA de la muestra	2

Cuadro 12. Ciclo de amplificación qPCR para la cuantificación de *E. coli*

Proceso del ciclo	Número de ciclos	Temperatura	Tiempo (min)
Pre calentamiento	1	95°C	0:30
Desnaturalización inicial del DNA	1	95°C	10:00
Desnaturalización del DNA	35	95°C	0:15
Alineación de los oligonucleótidos	35	60°C	0:20
Extensión	35	72°C	0:30
Análisis de disociación	40	Gradiente 55-95°C	00:30

### 6.9.5. Detección de coccidias en las muestras de heces por PCR punto final

#### 6.9.5.1. Extracción de DNA de oocistos de *Eimeria* spp.

La extracción de DNA de oocistos de *Eimeria* spp., se realizó para la obtención de un control positivo en la PCR. La purificación de los oocistos se realizó mediante la técnica de flotación modificado de Matos et al. (2009). Primeramente, A partir de muestras fecales de cabritos con alto conteo de oocistos, se pesaron 2.5 g, y se homogenizaron con solución salina saturada en un mortero con pistilo. La

mezcla se filtró en un embudo con una gasa estéril doblada en dos capas. El filtrado se depositó en un tubo de ensayo de 15 ml, que se llenó hasta que se formara un borde convexo sobre el borde superior del tubo. En el tubo de ensayo, se colocó un cubreobjetos y se dejó reposar por 15 min para por medio de capilaridad se adherieran los oocistos al cubreobjetos. El cubreobjetos se colocó en un portaobjetos y se visualizó en microscopio a objetivo de 40x para verificar la presencia de oocistos, ambos objetos se enjuagaron con agua destilada que se depositó en un tubo de 2 ml. El tubo se centrifugó el tubo a 1000 xg por un lapso de 5 min, el sobrenadante se desechó y se re suspendieron los oocistos en 500 µl de solución buffer de fosfatos (PBS) 1x pH 7.4 estéril. Los oocistos se conservaron a 4°C para su posterior uso.

Para la extracción de DNA de los oocistos, se utilizó el kit DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN, Alemania), de acuerdo a las indicaciones de los fabricantes. Los oocistos suspendidos en PBS 1X fueron centrifugados a 5,000xg (7,500 rpm) por 5 min. El sobrenadante se desechó y al tubo se agregó 180 µl de buffer ATL, el tubo se homogenizó brevemente en vórtex. En el tubo se añadió 20 µl de proteinasa K, e inmediatamente se homogenizó por 30 seg. El tubo se incubó a 56°C en un baño seco FE-401 (Felisa, México) por 30 min. En el tubo se agregó 200 µl de etanol 96°, la muestra se homogenizó y la mezcla se depositó en una columna QIAamp. La columna se centrifugó a 7,000 xg (8,000 rpm) por 1 min. La columna fue transferida a un nuevo tubo colector, y se agregó 500 µl de buffer AW 1. El tubo con la columna se centrifugó a 7,000 xg por 1 min. La columna se colocó en un tubo colector nuevo, y se añadió 500 µl de buffer AW2. El tubo con la columna se centrifugó a 20,000 xg por 3 min. La columna fue transferida a un tubo de 1.5 ml, para posteriormente agregar 100 µl de buffer AE. La columna se incubó a temperatura ambiente por 1 min., y se centrifugó a 7,000 xg por 1 min. El DNA se conservó a -20°C para su posterior uso.

#### **6.9.5.2. Identificación de coccidias en las muestras de heces por PCR.**

La detección de coccidias se realizó a partir del DNA extraído de las muestras de heces mediante la técnica de PCR final. El protocolo para el ciclo de amplificación de coccidias fue de acuerdo a lo establecido por Reiman et al. (1996).



La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la PCR se describe en el cuadro 13. Para las elaboración de las reacciones se utilizó el kit preparado Hot start Maxima mix #1051 (Thermo scientific, USA), la mezcla para el PCR se realizó con los reactivos que describen en el cuadro 14, para obtener así un volumen total de producto de PCR de 12  $\mu$ l. El ciclo de la PCR se realizó en base a las recomendaciones dadas por los fabricantes (Cuadro 15). Los productos de la PCR fueron sometidos a electroforesis de 60 volts por 60 minutos en geles de agarosa al 1.6% TAE 1x. Para la electroforesis, el buffer de carga 6X Orange DNA Loading Dye #R0631 (Thermo Scientific, USA) se utilizó cargando 5  $\mu$ l de producto de PCR por 1  $\mu$ l de buffer de carga, y el marcador de peso molecular 100' GeneRuler 10x Plus DNA ladder #SM11153 (Thermo Scientific, USA) fue utilizado para determinar el tamaño del producto de PCR

Cuadro 13. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del DNA en la identificación de coccidia universal

<i>Oligonucleótido</i>	<i>Secuencia del oligonucleótido</i>	<i>Orientación</i>
<i>Oligo CYCF1E-F1</i>	<i>TCCCAATGAAAACAGTTT</i>	<i>Sentido</i>
<i>Oligo CYCR2B-R1</i>	<i>CAGGAGAAGCCAAGGTAGG</i>	<i>Antisentido</i>

(Reiman et al., 1996)

Cuadro 14. Reactivos para la elaboración de la PCR mix en la detección de coccidia universal.

<i>Reactivos para la PCR mix (12 <math>\mu</math>l)</i>	<i>Volumen (<math>\mu</math>l)</i>
<i>Master mix Thermo Hot start 1051</i>	<i>6</i>
<i>Oligo CYCF1E-F1 (10<math>\mu</math>M)</i>	<i>0.48</i>
<i>Oligo CYCR2B-R1 (10<math>\mu</math>M)</i>	<i>0.48</i>
<i>BSA 1:10</i>	<i>1.8</i>
<i>H2O Estéril uso molecular</i>	<i>1.24</i>
<i>DNA (5ng/<math>\mu</math>l)</i>	<i>2</i>

Cuadro 15. Ciclo de amplificación PCR para la detección de coccidias y reactivos para la elaboración de la PCR mix utilizados en la detección de coccidia universal.

<i>Proceso del ciclo</i>	<i>Número de ciclos</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo (minutos)</i>
<i>Desnaturalización inicial del DNA</i>	1	95°C	04:00
<i>Desnaturalización del DNA</i>	35	95°C	0:30
<i>Alineación de los oligonucleótidos</i>	35	53.6°C	0:30
<i>Extensión</i>	35	72°C	0:30
<i>Extensión final</i>	1	72°C	05:00
<i>Conservación del producto obtenido</i>	1	12°C	<i>Tiempo indefinido</i>

#### **6.10. Manejo, desecho de las muestras y material de muestreo**

Las muestras y el material utilizado para el muestreo de los animales se desecharon de acuerdo a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 (de la Federación, 2003) que regula el procesamiento y desecho de los residuos químico-biológicos. Las muestras de sangre, una vez centrifugadas y separadas del suero, se inactivaron con hipoclorito de sodio al 10% y se desecharon en el recipiente de residuos infecto-contagiosos (recipiente de color rojo) del laboratorio de Microbiología Veterinaria de la FCN.

Las muestras de heces, líquido ruminal, y salivales se inactivaron con cloro al 10%, se almacenaron en bolsas rojas que son las designadas para elementos patológicos. El material que se utilizó para el muestreo (guantes, bolsas, tubos), y el material desechable utilizado para la realización de las técnicas de biología molecular y serología, se desecharon como elementos no anatómicos en la bolsa roja para desechos biológico-infeccioso del laboratorio de Microbiología Veterinaria de la FCN. En el caso de las agujas para la toma de las muestras de sangre, se eliminaron en el recipiente rojo para residuos punzocortantes en el laboratorio de Microbiología Veterinaria de la FCN. Todas las bolsas rojas se llevaron a su incineración por parte de la empresa encargada de proporcionar el servicio a la Universidad.

### 6.11. Análisis estadístico de las muestras

Los datos se analizaron por medio del Software SPSS statistics v24 (IBM, USA). Se utilizó el análisis de varianza para la evaluación del peso al final del experimento y la ganancia diaria de peso utilizando como covariable el peso al nacimiento. Para la evaluación del efecto de la suplementación de la dosis de levadura sobre la cantidad de enteropatógenos (cuantificación individual de Enterobacterias, *E. coli*; y *Eimeria* por corral), pH ruminal, la ganancia diaria de peso, la duración y severidad de diarreas y se utilizó el modelo estadístico general de muestras repetidas en el tiempo, con un nivel de confianza del 95% y valor de  $\alpha=0.05$ :

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

Donde:

$Y_{ijkln}$  = efecto de la levadura sobre la cantidad de número de copias de enteropatógenos, pH ruminal, la duración y severidad de diarreas de los cabritos en el experimento

$\mu$  = Media poblacional

$T_j$  = 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

$TD_{jl}$  = interacción del efecto entre tratamiento y días experimentales

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

Considerando diferencia estadística con valores de  $P < 0.05$  y nivel de confianza del 95%.

Las prevalencias de los enteropatógenos por PCR punto final, y las prevalencias por semana de diarreas fueron evaluadas por el modelo estadístico de regresión logística binaria para la comparación de proporciones de dos poblaciones, mediante el programa estadístico SPSS statistics v24 (IBM, USA).

## VII. RESULTADOS

### 7.1. Parámetros productivos

Los resultados de las variables productivas se muestran en el cuadro 16. La suplementación de la levadura no tuvo efecto significativo en la ganancia diaria de peso (GDP), el peso a la semana 10 experimental y el pH ruminal al día 70 experimental ( $P>0.05$ ). Sin embargo, se observó una diferencia estadística en el pH ruminal el día 56 experimental ( $P<0.05$ ).

Cuadro 16. Parámetros productivos y pH ruminal de los cabritos suplementados con el probiótico de levadura.

<i>Parámetro</i>	<i>Grupo control</i>	<i>Grupo con probiótico</i>	<i>P</i>
<i>Peso final (kg)</i>	<i>14.06± 1.85</i>	<i>15.52±1.09</i>	<i>NS</i>
<i>GDP (Kg)</i>	<i>0.145±0.03</i>	<i>0.155±0.01</i>	<i>NS</i>
<i>pH ruminal día 56</i>	<i>6.89±0.30</i>	<i>6.66±0.11</i>	<i>&lt;0.05</i>
<i>pH ruminal día 70</i>	<i>6.66±0.05</i>	<i>6.63±0.03</i>	<i>NS</i>

GPD= Ganancia diaria de peso. NS=  $P>0.05$

### 7.2. Proteínas totales a las 24 horas y efecto del probiótico durante el proceso experimental

Los niveles de proteínas totales en sangre en los cabritos a las 24 horas *post* nacimiento fueron adecuados en ambos grupos antes del experimento ( $P>0.05$ ) (Cuadro 17).

Cuadro 17. Proteínas totales a las 24 horas de nacimiento de los cabritos.

Grupo experimental	Proteínas totales (g/dl)	Error estándar	P
Control	6.11±1.38	0.54	NS
Probiótico	5.45±1.28	0.54	

NS= P>0.05

### 7.3. Identificación y cuantificación de *Eimeria* spp.

La suplementación del probiótico de levadura no tuvo efecto sobre la cantidad de oocistos en las muestras por corral al día 01, 14 y 70 (P>0.05). No obstante, en el corral con probiótico las excreciones fueron menores a los días 28, 42 y 56 (P<0.05). Las excreciones de oocistos fueron diferentes entre los días de muestreo, a los días 01, 14, 56 y 70 (Cuadro 18). Las especies de *Eimeria* detectadas por microscopía se describen en el cuadro 19. *E. arloingi*, *E. jolchijevi* y *E. ninakohlyakimovae* fueron las principales especies identificadas con 24, 20.5 y 16.5% de los oocistos analizados microscópicamente (Cuadro 20, Figura 1).

Cuadro 18. Efecto del probiótico de levadura sobre la cantidad de oocistos de *Eimeria* spp., en las muestras fecales por corral durante la etapa de crianza

Día experimental	Log <sub>10</sub> Número de oocistos/g de heces		P
	Grupo control	Grupo con probiótico	
01 <sup>a</sup>	0.0	0.0	
14 <sup>b</sup>	2.70± 0.867	1.85±0.348	NS
28 <sup>cd</sup>	5.31± 0.711	3.82±0.552	<0.05
42 <sup>cd</sup>	5.22±0.225	4.39±0.141	<0.05
56 <sup>ce</sup>	4.54±0.366	3.38±0.632	<0.05
70 <sup>cd</sup>	4.46±0.505	3.92±1.002	NS

<sup>ab</sup> Letra distinta indica diferencia significativa (P<0.05). Análisis de medias para varias comparaciones de Bonferroni. NS: P>0.05

Cuadro 19. Especies identificadas de *Eimeria* spp., por microscopía

Especie	Frecuencia (%)
<i>E. aljevi</i>	5.5
<i>E. arloingi</i>	24
<i>E. caprina</i>	16
<i>E. christenseni</i>	12
<i>E. hirci</i>	5.5
<i>E. jolchijevi</i>	20.5
<i>E. ninakohlyakimovae</i>	16.5

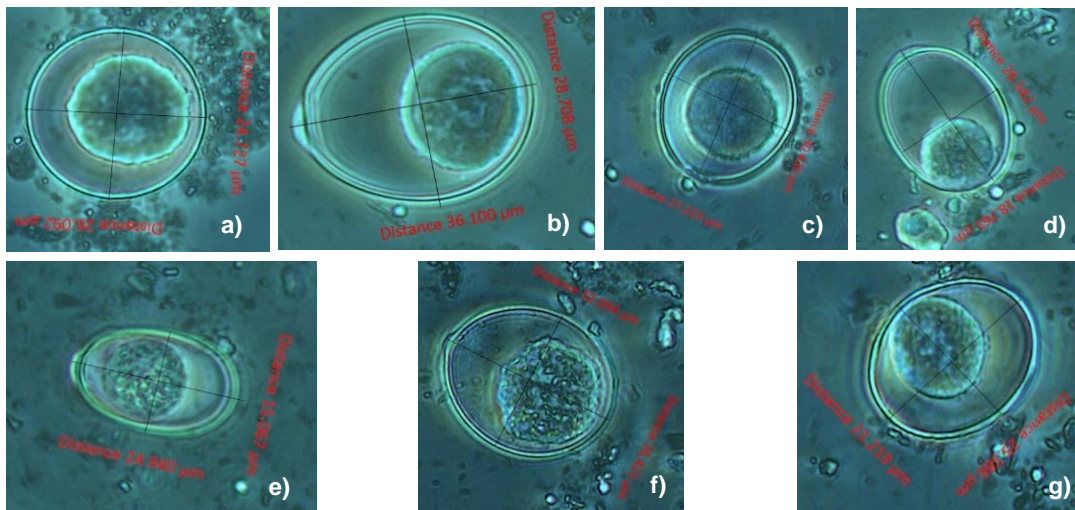


Figura 1. Especies identificadas de *Eimeria* spp., en las muestras de heces experimentales por microscopía (40x). a) *Eimeria aljevi*; b) *Eimeria arloingi*; c) *Eimeria caprina*; d) *Eimeria christenseni* e) *Eimeria hirci*; f) *Eimeria jolchijevi*; g) *Eimeria ninakohlyakimovae*.

#### **7.4. Prevalencias de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., y coccidias, y cuantificación de Enterobacterias y *E. coli*.**

Los animales positivos a enteropatógenos se muestran en la Figuras 2 y 3. La suplementación de levadura no influyó sobre la prevalencia de *E. coli*, *Salmonella* spp. y coccidea. (Cuadro 20,  $P>0.05$ ). Sin embargo la prevalencia de *E. coli* y Coccidea fue diferente entre días (Cuadro 21,  $P<0.05$ ), observándose menor prevalencia de *E. coli* los días 35 y 70 en ambos tratamientos y una mayor prevalencia de coccidea conforme fueron aumentado los días.

En el análisis de la cuantificación por medio de qPCR de las muestras de heces a los días 01, 07, 35 y 70 de Enterobacterias y *E. coli*, se obtuvieron eficiencias de 92.5 y 98%, valor de  $R^2$  de 0.9927 y 0.9976 y valor de la pendiente de -3.73 y -3.42 (Apéndice 2). La cuantificación de enterobacterias en las muestras de heces se muestra en el cuadro 22. La suplementación de la levadura no tuvo efecto sobre las cantidades de enterobacterias ( $P>0.05$ ). Respecto a las excreciones de *Escherichia coli*, el probiótico no tuvo efecto sobre las cantidades de la enterobacteria en los días 01, 35 y 70 experimentales ( $P>0.05$ , Cuadro 22). En las cuantificaciones de los dos grupos bacterianos, se observó diferencias en la excreción por días, encontrándose una notable disminución de número de copias al día 70 con respecto a los muestreos del día 01, 07 y día 35 ( $P<0.05$ ).

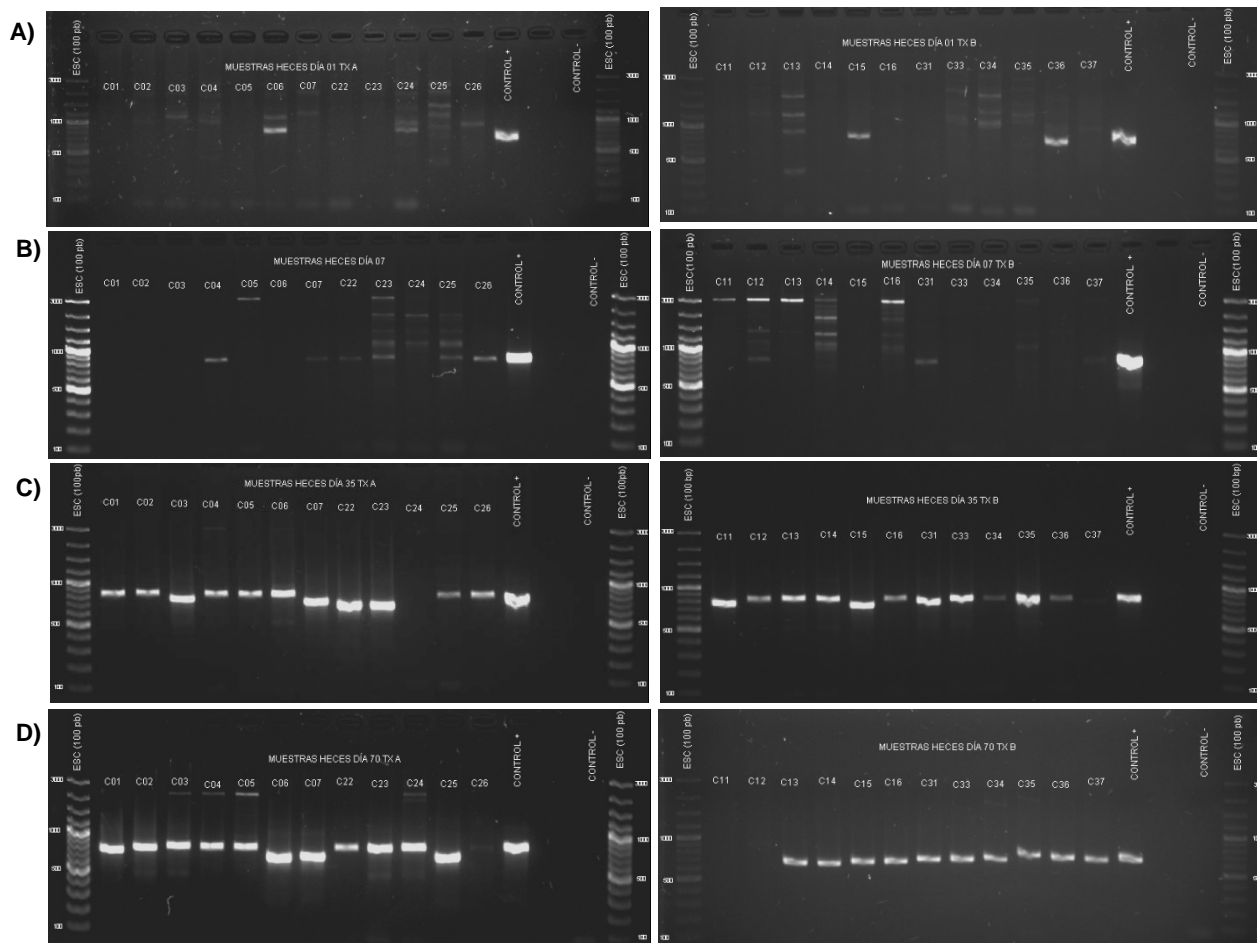


Figura 2. PCR punto final coccidia universal por grupo experimental y día de muestreo. A) Día 01. Izquierda: grupo control; derecha, grupo con levadura. B) Día 07. Izquierda: grupo control; derecha, grupo con levadura C) Día 35. Izquierda: grupo control; derecha, grupo con levadura D) Día 70. Izquierda: grupo control; derecha, grupo con levadura. Gel de Agarosa al 1.6%



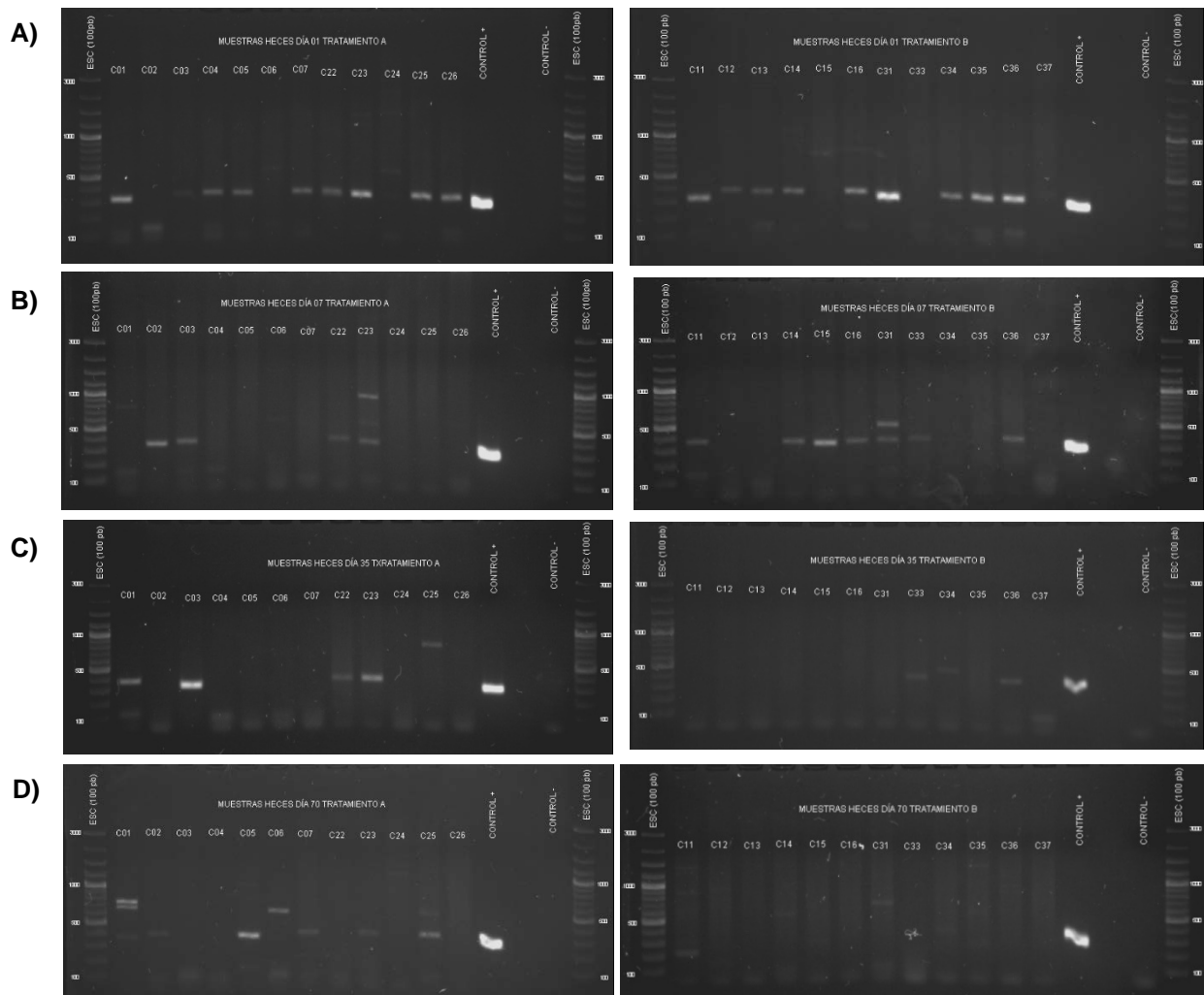


Figura 3. PCR punto final *Salmonella* spp. por grupo experimental y día de muestreo. A) Día 01. Izquierda: grupo control; derecha, grupo con levadura. B) Día 07. Izquierda: grupo control; derecha, grupo con levadura C) Día 35. Izquierda: grupo control; derecha, grupo con levadura D) Día 70. Izquierda: grupo control; derecha, grupo con levadura. Gel de Agarosa al 1.6%.

Cuadro 20. Prevalencia de los enteropatógenos durante el experimento

Día experimental	Grupo control		Grupo con probiótico		P
	Animales positivos	Frecuencia (%)	Animales positivos	Frecuencia (%)	
<i>Salmonella spp.</i>					
01	10	83.3	9	75.0	NS
07	4	33.33	7	58.33	NS
35	4	33.33	3	25.0	NS
70	6	50	2	16	NS
<i>Escherichia coli</i>					
01	12	100	12	100	-
07 <sup>a</sup>	12	100	11	91.7	NS
35 <sup>b</sup>	6	50.0	9	75.0	NS
70 <sup>b</sup>	4	33.33	8	66.7	NS
<i>Coccidias</i>					
01 <sup>a</sup>	4	33.33	4	33.33	NS
07 <sup>a</sup>	6	50.0	4	33.33	NS
35 <sup>b</sup>	11	91.7	12	100	NS
70 <sup>b</sup>	12	100	10	83.33	NS

NS: P>0.05. <sup>ab</sup>Letra distinta indica diferencia significativa (P<0.05). Análisis de medias para varias comparaciones de Bonferroni.

Cuadro 21. Efecto de la levadura sobre las prevalencias de enteropatógenos.

Variable	Coeficiente B	e <sup>b</sup>	P
<i>Escherichia coli</i>			
Tratamiento	-1.458	0.168	NS
Día	0.992	0.154	<0.05
Tratamiento*Día	-1.783	2.348	NS
Constante	6.334	543.45	<0.05
<i>Salmonella spp.</i>			
Tratamiento	-1.098	2.998	NS
Día	-0.411	0.693	NS
Tratamiento*Día	-0.596	0.566	NS
Constante	1.029	7.070	NS
<i>Coccidias</i>			
Tratamiento	0.453	1.720	NS
Día	1.577	4.841	<0.05
Tratamiento*Día	-0.462	0.630	NS
Constante	-2.636	0.180	<0.05

NS: P>0.05.

Cuadro 22. Efecto de la suplementación de levadura sobre el conteo de poblaciones bacterianas ( $\text{Log}_{10}$ ) en las muestras de heces de cabritos.

Día de muestreo	$\text{Log}_{10}$ Número de copias de Gen/g de heces		P			
	Grupo control	Grupo con probiótico	Entre Tratamientos	días	Tratamiento	Tratamiento *día
<i>Enterobacterias</i>						
01 <sup>a</sup>	6.16±0.69	6.47±0.59	NS	<0.05	NS	NS
07 <sup>a</sup>	6.62±1.14	6.18±0.90	NS			
35 <sup>a</sup>	5.79±0.70	6.17±0.75	NS			
70 <sup>b</sup>	4.73±1.01	5.39±0.65	NS			
<i>E. coli</i>						
01 <sup>a</sup>	5.88±0.50	5.96±0.44	NS	<0.05	NS	<0.05
07 <sup>a</sup>	6.33±0.49	5.42±0.72	<0.05			
35 <sup>b</sup>	2.71±2.84	4.36±2.19	NS			
70 <sup>b</sup>	1.56±2.34	2.44±2.52	NS			

<sup>ab</sup> Letras distintas indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ), análisis de medias para varias comparaciones de Bonferroni. NS:  $P > 0.05$

### 7.5. Evaluación de la prevalencia, duración y severidad de diarreas durante el experimento.

La suplementación de la levadura no tuvo un efecto significativo en la prevalencia, duración y severidad de las diarreas durante el periodo experimental ( $P > 0.05$ ). En ambos grupos, se observó una mayor prevalencia de diarreas con mayor severidad y duración entre la semana 3, 4 y 5 experimental, disminuyendo en las siguientes semanas (Figuras 4, 5 y 6).

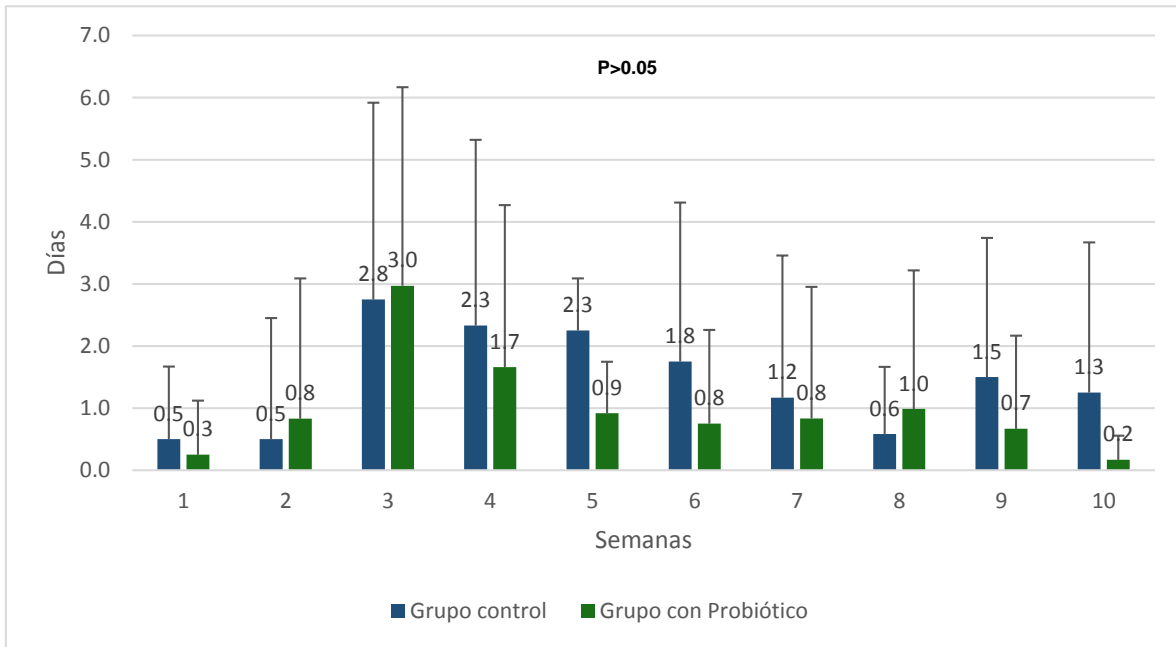


Figura 4. Duración de las diarreas durante la fase experimental por semanas.

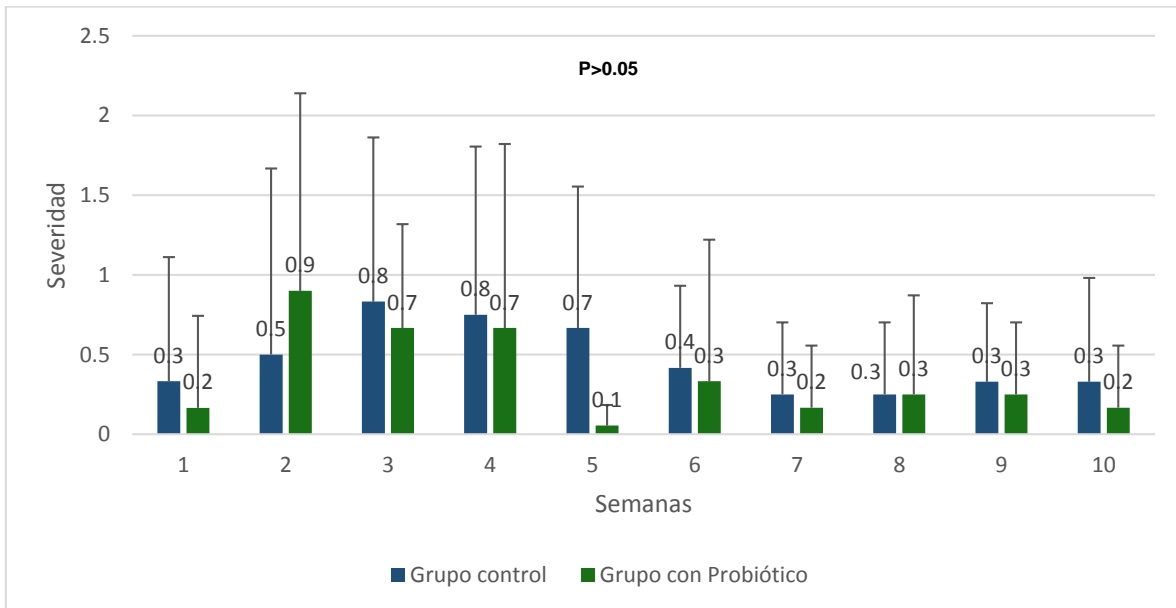


Figura 5. Severidad de las diarreas durante la fase experimental por semanas

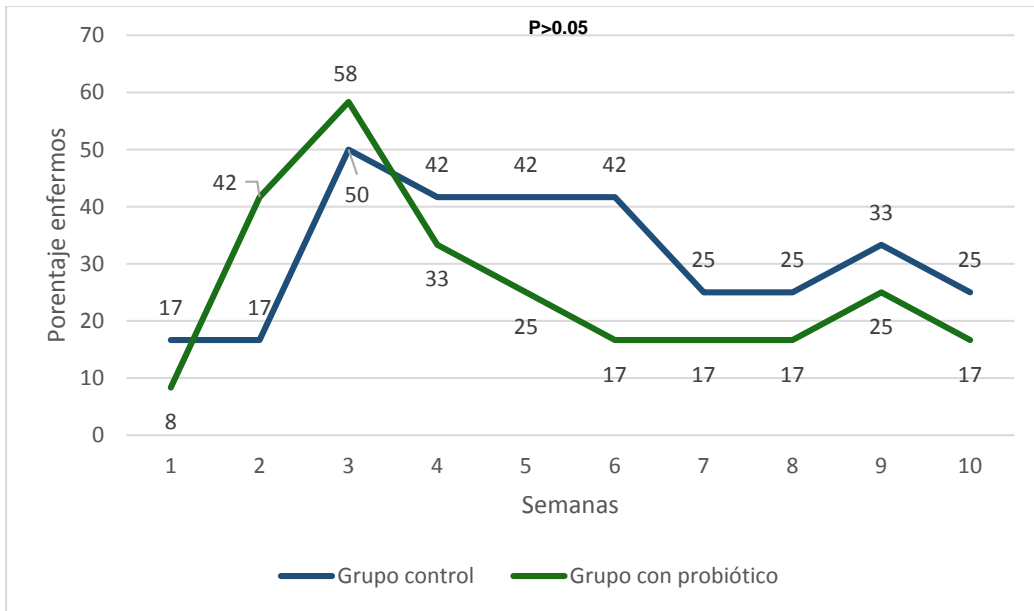


Figura 6. Prevalencia de las diarreas durante el experimento por semanas.

## VIII. DISCUSIÓN

La suplementación del probiótico de levadura durante la etapa de crianza no tuvo efecto en la ganancia diaria de peso y el peso al destete. Estos resultados son similares a lo reportado por Ataşođlu et al. (2010), quienes reportan que la suplementación del kéfir (leche fermentada que contiene poblaciones de *Lactococcus* spp, *Lactobacillus* spp, y levaduras) y de un probiótico comercial no influye en la ganancia diaria de peso y el peso vivo en cabritos Saanen antes y después del destete. Daş et al. (2012), utilizó el mismo producto probiótico de Kefir en cabritos antes y posterior al destete (al día 45 de edad) y detectaron ausencia de efecto en los mismos parámetros productivos. Bugdayci et al. (2016) en cabritos de un mes de edad reportaron que la suplementación de *S. cerevisiae* no tiene efecto sobre parámetros productivos. Similarmente He et al., (2017) no encontraron efecto en becerros lactantes Holstein, a los cuales suplementaron un probiótico comercial basado en *S. cerevisiae* sub especie *boulardii* (Levucell SB20 cepa CNCM I-1079). No obstante, Kamal et al. (2013) reportan que la suplementación de una dosis diaria de 150g ( $5.6 \times 10^9$  UFC/g) de producto fermentado de *S. cerevisiae* cepa NCDC-49 aumentó la ganancia diaria de peso, y la conversión alimenticia en cabritas durante la etapa *post*-destete. Anandan et al. (1999), observaron en cabritos suplementado con producto probiótico de *Lactobacillus* spp., un aumento significativo en la ganancia diaria de peso, y el peso vivo en cabritos Saanen. En este trabajo, la dosis suplementada a los animales fue de 0.5 g/día ( $1.25 \times 10^{12}$  UFC), y se realizó en la etapa de lactancia, por lo que es posible que el efecto del probiótico se observe en la etapa de *post* destete.

Diversos factores pudieron interferir en la ausencia del efecto en el peso vivo y la ganancia diaria de peso en este experimento. El efecto de *S. cerevisiae* sobre el mejoramiento de parámetros productivos en rumiantes en crianza, principalmente está asociado al modo de acción que la levadura ejerce sobre la colonización temprana de la microbiota ruminal, promoviendo principalmente el establecimiento de bacterias celulolíticas (Chaucheyras-Durand y Fonty, 2002). La cual se debe a la capacidad que tiene *S. cerevisiae* de reducir las concentraciones de oxígeno en el medio ruminal, favoreciendo un mejor ambiente de crecimiento y

de metabolismo para microorganismos en rumen (Chaucheyras-Durand et al., 2008; Newbold et al., 1995); así como la producción de ciertos nutrientes (vitaminas, aminoácidos y péptidos) que también podrían estimular el establecimiento de microorganismos en rumen (Chaucheyras et al., 1995). La colonización temprana del rumen favorecida por la levadura ocasiona el establecimiento de la microbiota ruminal, y favorece la transición del consumo de leche a dieta sólida (Chaucheyras-Durand y Fonty, 2002). Por otro lado, el desarrollo del rumen está relacionado con el consumo de alimento sólido, específicamente por el consumo de carbohidratos estructurales, lo cuales al ser degradados producirán mayor cantidad de ácido butírico estimula el desarrollo de las papilas ruminales en los neonatos rumiantes (Rickard y Ternouth, 1965). Rumiantes neonatos solamente con dietas lácteas, muestran un desarrollo ruminal limitado en cuanto al peso del rumen, el crecimiento y grosor de las papilas ruminales, el grado de queratinización y desarrollo muscular (Baldwin et al., 2004). No obstante, en becerros y corderos lactantes se ha demostrado que el aumento de consumo de alimento preiniciador resultó en un aumento de la longitud y grosor de las papilas ruminales, mientras que el desarrollo muscular del órgano es estimulado en mayor medida por el consumo de forraje, con un mayor crecimiento de los animales durante la lactancia (Gilliland et al., 1962; Rickard y Ternouth, 1965).

Por otro lado, no se detectó un efecto del probiótico en el pH ruminal al día 70, mientras que en el día 56, se detectó una diferencia significativa, con valores menores para los animales tratados con levadura (de 6.8 grupo control vs. 6.66 para levadura). No obstante, los animales en ambos grupos y ambos días mantuvieron niveles de pH superiores al nivel crítico que pudiera afectar a la diversidad de microorganismos ruminales. Estos resultados son similares a lo reportado a Tripathi y Karim (2011), en corderos destetados con dietas altas en concentrado, observaron que la suplementación de cepas de *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces* spp. y *S. cerevisiae* sub especie *uvarum* disminuyeron el pH ruminal con respecto a los corderos control los cuales mantuvieron con dietas altas en concentrados. Kamal et al. (2013) no encontraron efecto sobre el pH de cabritas suplementadas con producto fermentado de *S. cerevisiae*. La levadura modifica el pH ruminal al disminuir las concentraciones

de ácido láctico generado por la alimentación de los animales con dietas altas en concentrados, al estimular el crecimiento de poblaciones utilizadoras de lactato (*Selenomonas ruminantium*, *Megaesphaera eldesnii*), y al aumentar las poblaciones de protozoarios ciliados, quienes regulan el pH al disminuir la concentración de almidones, ya que compiten por el sustrato con las poblaciones amilolíticas (Mendoza, et al., 1993). Estos efectos se han visto en animales adultos ya sea en vacas, cabras y ovejas (El-Ghani, 2004). No obstante, la disminución del pH del líquido ruminal en animales con probiótico al día 54, también puede estar asociado al aumento de consumo de concentrado, el cual ocasiona una mayor producción de AGVs como describe Abecia et al. (2014). Otros factores asociados al probiótico, como la cepa utilizada y la dosis pueden inferir en la ausencia del efecto sobre la ganancia diaria de peso (Chaucheyras-Durand et al., 2010; Newbold et al., 1996); no obstante, la dosis utilizada en este trabajo es similar a las utilizadas en otros trabajos que reportan presencia o ausencia de efecto en la crianza de rumiantes (Brewer et al., 2014; Chaucheyras-Durand y Fonty, 2002; Kamal et al., 2013).

La suplementación de levadura durante la etapa de crianza en cabritos tuvo un efecto en las excreciones de oocistos de *Eimeria* spp., por corral experimental, la cual disminuyó en ciertos días de la lactancia ( $P < 0.05$ ). No obstante, al día 14 y 70 experimentales, no hubo diferencias significativas en el conteo de oocistos, mientras que, las prevalencias individuales de coccidia no fue alterado por la suplementación del probiótico ( $P > 0.05$ ). Daş et al. (2012) en cabritos destetados suplementados con kéfir, producto probiótico que contiene bacterias probióticas *Lactococcus* spp. ( $10^{11}$  ufc/g), *Lactobacillus* spp. ( $10^3$  ufc/g) y levaduras ( $10^3$  ufc/g), detectaron una disminución no significativa de la carga parasitaria en los animales con el probiótico. Dicho efecto podría relacionarse con la carga parasitaria presente en el ambiente antes del experimento. Además en este trabajo no se monitoreó a las madres, ni a los neonatos desde los primeros días de vida; por lo que no se detectaron excreciones de oocistos y la prevalencia de coccidas fueron bajas al inicio del experimento, mientras que a las dos semanas siguientes, se detectaron oocistos en las muestras de ambos grupos, y los porcentajes de animales positivos a coccidas fueron altas al día 35 y 70. Esto puede estar relacionado a que los



animales tuvieron contacto con el parásito durante los primeros días de vida, como lo describe Saratsis et al. (2011), quienes observaron en corderos lactantes que al menos la mitad de los animales fueron positivos a *Eimeria* spp., entre los 12 a 15 días de vida. Además, el aumento de las excreciones durante el experimento por corral puede deberse primeramente a que la carga parasitaria de *Eimeria* spp., suele ser alta durante los primeros dos meses de vida, aumentando principalmente cuando el animal está sometido a situaciones de estrés, como es el destete (Ruiz et al., 2006). Los animales alrededor del día 70 estaban en la etapa post destete, lo que podría explicar el aumento de oocistos y animales positivos en heces en esa fase experimental. Las excreciones de oocistos fueron aumentando observándose la excreción máxima al día 42 experimental. El grupo suplementado con la levadura, tuvo una disminución significativa en tres días experimentales (días 28, 42 y 56). Esto pudiera deberse a un posible efecto del probiótico de levadura a nivel intestinal, que pudiera ser similar a lo reportado en monogástricos, al tener un efecto estimulante de la respuesta inmune innata en el tejido linfoide asociado al intestino (GALT). En pollo de engorde, la suplementación de levadura, por medio de su pared celular que contiene polisacáridos  $\beta$  1-3 y 1-6 glucanos estimula la proliferación de las células B y T principalmente TH CD4+, quienes secretan citoquinas e INF- $\gamma$  e interleucina 22 (IL-22) para la activación de macrófagos, y las células T CD8+, con propiedades citotóxicas (Gao et al., 2009), la activación de estas células inhiben el desarrollo de esporozoitos durante la infección temprana, y la destrucción de las células infectadas durante la infección tardía (Liu et al., 2006). Además, la activación de las células B por parte de linfocitos TH-2, induce a la producción de anticuerpos, los más producidos son la IgA e IgM, y tienen la propiedad de inhibir la unión de los esporozoítos y merozoítos a las células epiteliales, mediante el bloqueo del sitio de unión por la adhesión de las inmunoglobulinas a la superficie del parásito (Rose y Hesketh, 1987). Los efectos inmunoestimulantes de *S.cerevisiae* han sido comprobado en corderos (Malaczewska et al., 2010; S. Milewski, 2009; Zabek et al., 2014). Las especies identificadas de *Eimeria* spp., por morfología en este experimento fueron *E. alijeви*, *E. arloingi*, *E. caprina*, *E. christenseni*, *E. hirci*, *E. jolchijevi* y *E. ninakohlyakimovae*, entre las cuales se encuentran las consideradas más patógenas en caprinos (*E. alijeви*, *E. arloingi* y *E. ninakohlyakimovae*). Estas

especies han sido reportadas por otros autores que han identificado oocistos de *Eimeria* spp. en Asia (Das et al., 2017; Faizal et al., 1999); Europa (Ruiz et al., 2013), y América (Freitas et al., 2005). Respecto a las prevalencias de coccidia, hay que considerar que los oligonucleótidos detectan no solo *Eimeria* spp., sino también los otros géneros que conforman este grupo parasitario, que son *Cyclospora* spp., *cryptosporidium* spp e *Isospora* spp. (Reiman et al., 1996). Por lo que es necesario utilizar o diseñar otros oligonucleótidos más específicos de *Eimeria* spp., y las especies que conforman este género, Para revisar las muestras individuales y hacer la cuantificación por medio de qPCR específicamente de *Eimeria* spp., para evaluar si el probiótico tiene un efecto reductor del parásito.

Respecto a los enteropatógenos bacterianos, la levadura no influyó en las prevalencias de *Salmonella* spp., y *Escherichia coli*, ( $P>0.05$ ) sin embargo, las prevalencias fueron altas al inicio del experimento en ambos grupos, y se comenzó a observar una disminución gradual siendo más bajas al día 35 y 70 ( $P<0.05$ ). Brewer et al., (2014) en becerros infectados experimentalmente con *Salmonella* entérica serotipo *typhimurium* observaron una reducción de la carga de la enterobacteria a las 48 horas *post*-inoculación. La suplementación del probiotico no influyó en las excreciones de enterobacterias en heces durante el experimento. La ausencia de efecto de la levadura fue observado también en la cuantificación de *E. coli* en los días 01, 35 y 70; sin embargo, las cantidades de copias de gen rRNA de *E. coli* fue menor en el grupo con probiótico al día 07 ( $P<0.05$ ). No obstante, las excreciones por día fueron disminuyendo principalmente al día 70 ( $P<0.05$ ). Los trabajos que han evaluado el efecto de la levadura sobre enterobacterias y *E. coli* en rumiantes han reportado resultados inconsistentes. Ghazanfar et al. (2015) en becerros lactantes suplementados con probiótico comercial de levadura, observaron efecto reductor sobre las cantidades de coliformes totales excretados en heces en una día experimental (día 30 experimental), mientras que en los demás días de muestreo no se detectaron diferencias con respecto al grupo control, no obstante, las excreciones fueron disminuyendo entre los días de muestreo en ambos grupos. He et al. (2017) reportaron que la suplementación de levadura en becerras no tuvo efecto sobre las excreciones de *E. coli* en heces, sin embargo, también detectaron

una disminución al analizar la excreción por días, al ser menor en el último día de muestreo. En pequeños rumiantes, Olvera-Ramírez (2007) reportó que la suplementación de una levadura viva (Biosaf, Phileo, Lessafre Animal Care, Francia) no influyó sobre el flujo de *L. innocua* en rumen, duodeno o en heces, en ovinos adultos canulados, bajo condiciones controladas, y alimentados con una dieta a base de 50% concentrado y 50% de forraje. En un trabajo previo, (García-Trejo, 2015) la suplementación de una cepa de levadura viva (*S. cerevisiae*, P7, Phileo, Lessafre Animal Care, México) no tuvo influencia en la excreción de la familia *Enterobacteriaceae* en corderos de engorde; sin embargo, se observó que el conteo de excreciones disminuyeron hacia el final del experimento. 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, y la disminución de *E. coli* en el grupo suplementado con el probiótico. Las poblaciones microbianas fecales pueden presentar cambios durante la etapa de crianza. Se ha reportado que el porcentaje de enterobacterias en la microbiota fecal es inferior a 0.8% en becerras en lactación a partir de la quinta semana de edad, mientras que a la semana 12 de vida ya no fue detectable esta población microbiana (Khan et al., 2016). La modificación de la dieta en las etapas del *pre* y *post*-destete influyen también en las proporciones de la familia bacteriana, ya que la transición del consumo de leche a dieta sólida modifica las poblaciones microbianas en el tracto intestinal (Uyeno et al., 2010). La variabilidad en los efectos de la suplementación con levaduras en animales jóvenes puede explicarse porque en algunos casos los animales son infectados artificialmente (Brewer et al., 2014), o asociados a las prevalencias de estos grupos bacterianos y las condiciones de crianza de cada estudio. El efecto reductor de la levadura sobre los enteropatógenos bacterianos se ha asociado 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. Así se evitaría la adhesión de las bacterias en la membrana celular de las vellosidades intestinales (Haldar et al., 2011; Pérez, 2009), la producción de sustancias inhibitorias de crecimiento, y estimulan la actividad de células fagocíticas, principalmente de neutrófilos y de macrófagos

(Bach et al., 2003; Małaczewska et al., 2010). La suplementación del probiótico no influyó en la duración y severidad de las diarreas en ambos grupos ( $P>0.05$ ), sin embargo, estos indicadores fueron más altos durante las primeras 4 semanas experimentales, disminuyendo en las siguientes 6 semanas en el grupo con el probiótico. Dichos resultados son similares a lo observado por He et al. (2017), quienes no detectaron diferencia estadística en la severidad y duración de diarreas al suplementar levadura en becerros lactantes antes y después del destete. Magalhães et al. (2008) observaron que la suplementación de *S. cerevisiae* a becerros en los primeros 70 días de vida tuvo efecto en la prevalencia de diarreas, en una disminución en 15%, y posterior reducción al 3.1% en el predestete, con una disminución de la mortalidad de los animales a partir del día 13 de vida. Ataşođlu et al. (2010) en cabritos observaron que la suplementación del kéfir y de probiótico comercial no afectó la prevalencia de diarreas, las cuales fueron más altas durante las semanas 3 a 6 de vida, no obstante, el porcentaje de animales con diarreas líquidas osciló entre un 2 a 4% en todos los grupos. En este estudio, se observó una reducción de la prevalencia, duración y severidad de diarreas a partir de la semana 5 experimental en ambos grupos, con los valores menores en el grupo con levadura. La presencia de diarras están relacionadas con aspectos relacionados con la higiene de la unidad de producción, las condiciones del ambiente, y la presencia de patógenos en la unidad de producción (Ataşođlu et al., 2010), y la adecuada transferencia de la inmunidad pasiva de los animales al nacimiento (Meganck et al, 2014). El control de las diarreas es importante en la etapa de crianza, ya que ocasiona la deshidratación, y la disminución en la absorción de nutrientes, por lo que los animales experimentan retraso en el crecimiento y en casos severos, la muerte (Chartier y Paraud, 2012).

Por lo tanto, es importante realizar futuros trabajos que evalúen el efecto de la levadura sobre indicadores productivos desde la crianza y el *post* destete, evaluar el efecto reductor del probiótico sobre *Eimeria* spp., por técnicas moleculares a partir de muestras individuales y con oligonucleótidos más específicos, así como complementar con las cuantificaciones de *Salmonella* spp.. Además, se debe de tener en los grupos experimentales un mayor número de

animales para poder determinar si el probiótico, pudiera tener un impacto benéfico en lo económico en las unidades de producción.

## **IX. CONCLUSIONES**

La suplementación de *Saccharomyces cerevisiae* en cabritos durante la crianza artificial y el predestete no influyó sobre el comportamiento productivo, el pH ruminal, la prevalencia de enteropatógenos bacterianos y en la presencia de diarreas. Sin embargo, el probiótico redujo la excreción de oocistos de *Eimeria* spp., y *Escherichia coli* en ciertos días de lactancia, por lo que la levadura podría generar algún mecanismo que permita reducir la carga parasitaria y de la enterobacteria en los animales, como es la estimulación de la respuesta inmune. La prevalencia de *E. coli* y Coccidea fue diferente entre los días, encontrándose una notable disminución de número de copias de *E. coli* en el predestete con respecto a la crianza y aumentado la prevalencia de Coccidea durante la crianza y predestete.

## **X. RECOMENDACIONES**

Se propone desarrollar futuros trabajos con mayor número de animales para poder determinar si la ausencia de diferencias significativas en algunos parámetros tiene relevancias biológicas y económicas, y que evalúen el efecto del probiótico, y evaluar el efecto del probiótico sobre la respuesta inmune en los animales.

## XI. APENDICES

### Apendice 1. Carta de aprobación del proyecto de investigación por el comité de Bioética de la FCN



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales



Comité de Bioética

Querétaro, Qro; 06 Junio 2016.

**JOSÉ RICARDO GARCÍA TREJO**  
**MAESTRÍA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL SUSTENTABLE**  
**PRESENTE**

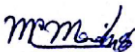
Estimado: **JOSÉ RICARDO GARCÍA TREJO**

Nos permitimos hacer de su conocimiento que el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales dio la siguiente resolución del proyecto de Investigación del cual usted es responsable:

Titulo	Resolución
"Efecto de la suplementación de un pro biótico de levadura ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) sobre la excreción de entero patógenos ambientales y la respuesta inmune humoral en cabritos" (53FCN2016).	<b>Aprobado</b>

Sin más por el momento quedamos a sus órdenes para cualquier aclaración o duda.

Atentamente

  
Dra. María Concepción Méndez Gómez Humarán  
Comité de Bioética  
Facultad de Ciencias Naturales

**Apéndice 2. Curva estándar, de amplificación y de disociación qPCR enterobacterias y *E. coli***

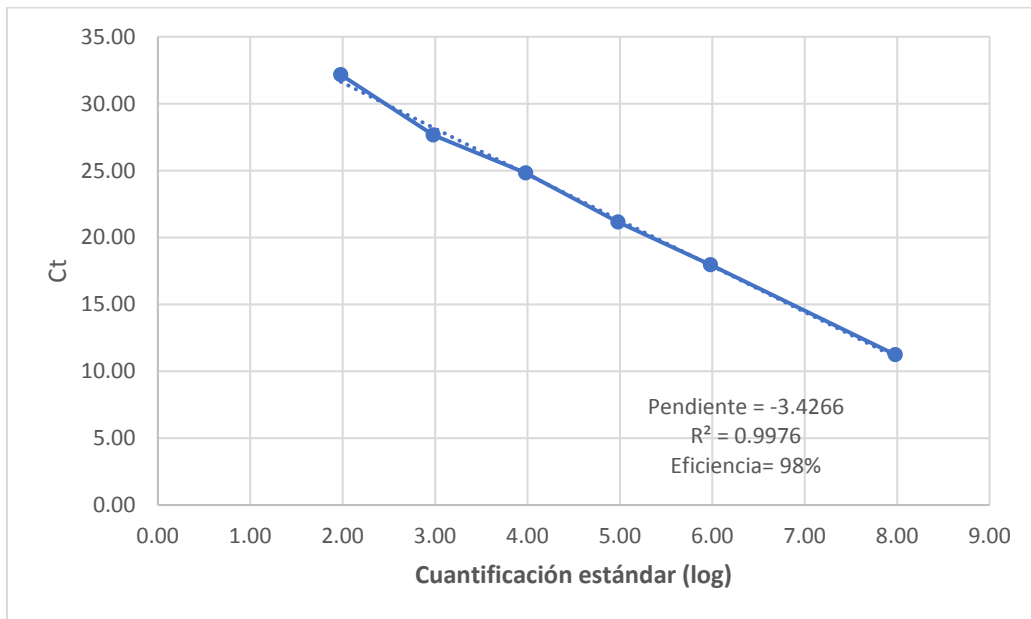


Figura 7. Curva estándar qPCR Enterobacterias

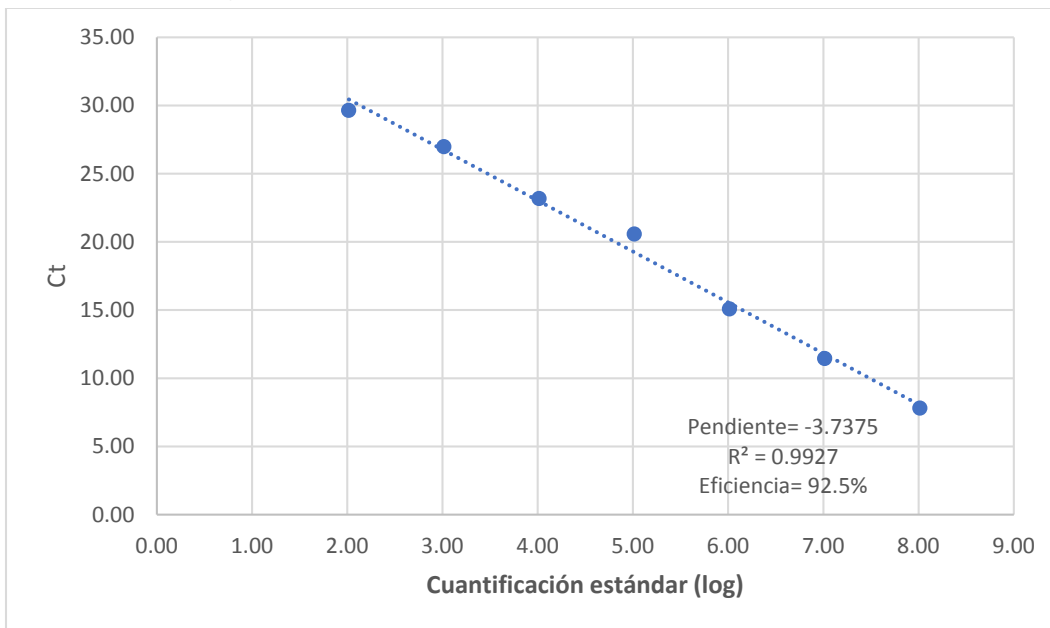


Figura 8. Curva estándar qPCR *Escherichia coli*



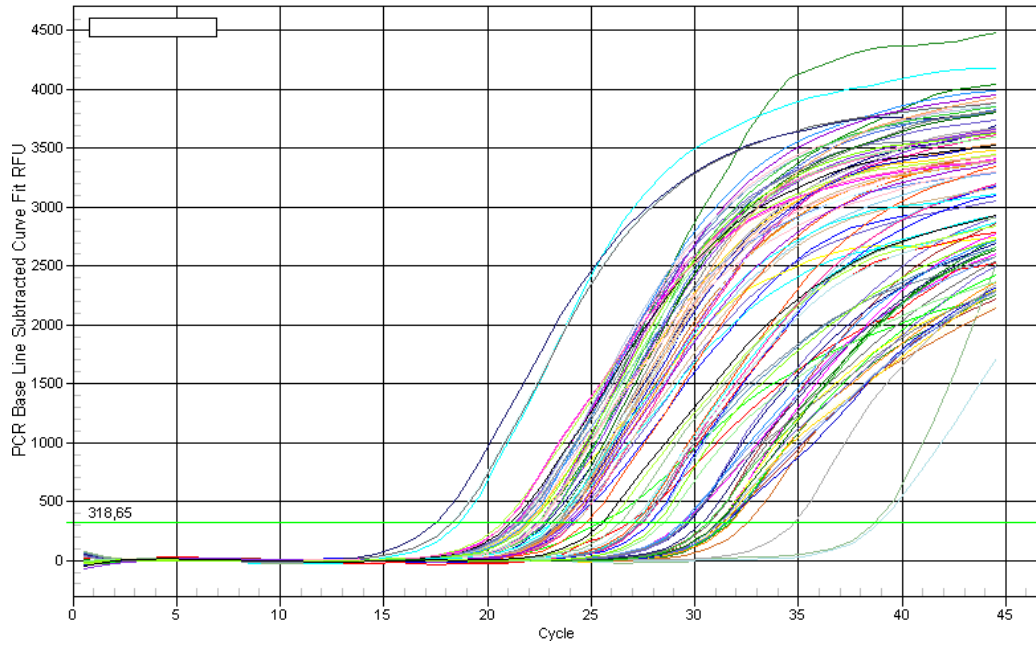


Figura 9. Amplificación qPCR Enterobacterias

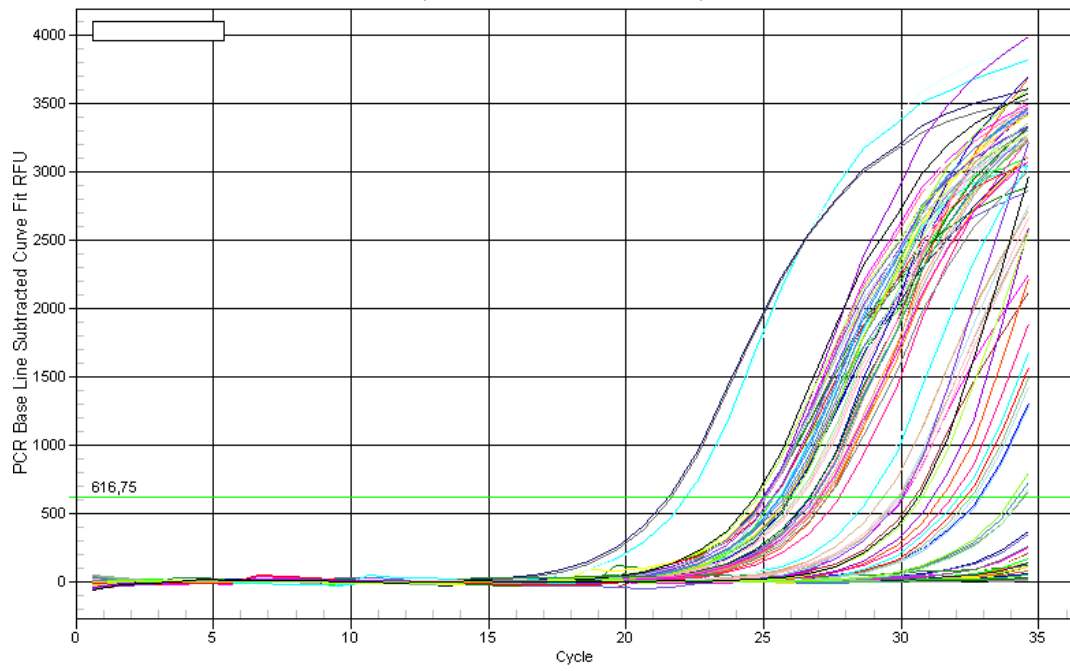


Figura 10. Amplificación qPCR *E. coli*

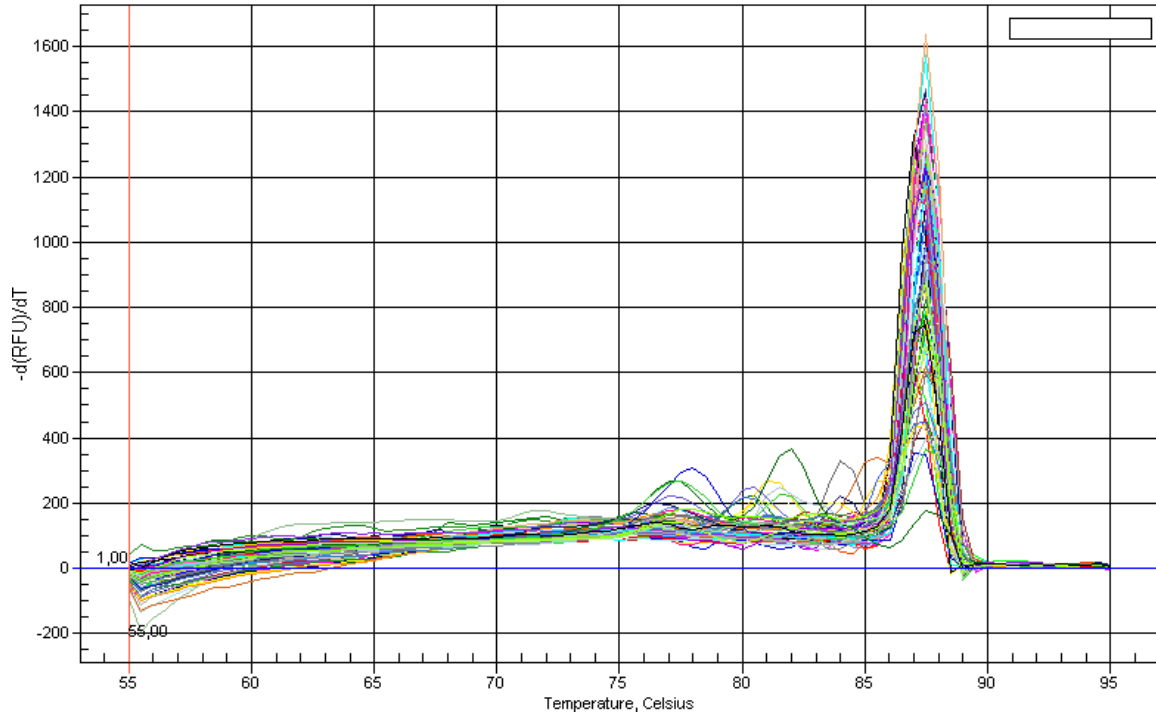


Figura 11. Curva de disociación qPCR Enterobacterias

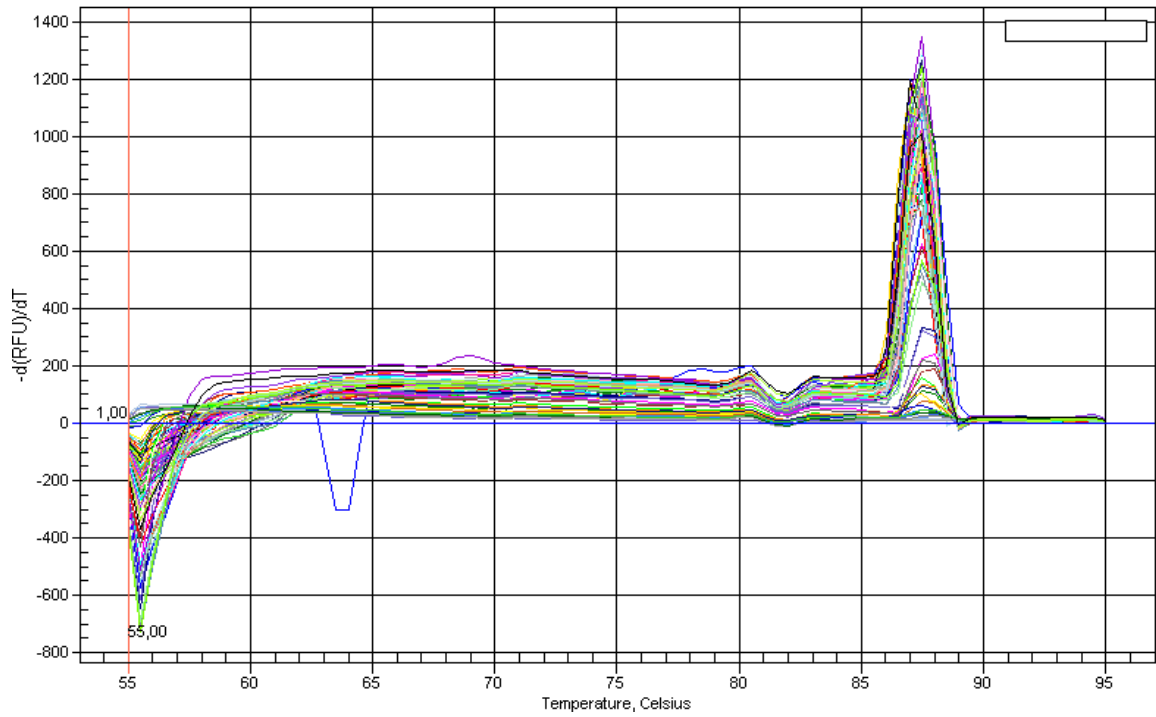


Figura 12. Curva de disociación qPCR *E. coli*

### Apéndice 3. Abreviaturas Utilizadas

µl: Microlitro	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
DNA: Ácido desoxirribonucleico (siglas en inglés)	qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
AGV: Ácidos grasos volátiles	ng: Nanogramos
d: Día	µmol: Micromoles
USA: Estados Unidos de Norte América	ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura	xg: Gravedades
Mg: Miligramo	Ig: Inmunoglobulina
g: Gramo	UK: Reino Unido
GRAS: Aditivos alimentarios generalmente reconocidos como seguros	Log <sub>10</sub> : Logaritmo natural
xg: Gravedades	RPM: Revoluciones por minuto
ml: Mililitro	UFC: Unidades formadoras de colonia
MOS: Manano-oligosacáridos	Na <sup>+</sup> : Sodio
OMS: Organización Mundial de la Salud	K <sup>+</sup> : Potasio
LPS: Lipopolisacárido	Cl: Cloro
pH: potencial de Hidrógeno	NaHCO <sub>3</sub> : Bicarbonato de sodio
PBS: Solución buffer de fosfatos	min: minutos
PCL: Pared celular de levadura/ proteína concentrada de levadura	seg: segundos
Spp: Especie	
UE: Unión Europea	

## XII. LITERATURA CITADA

- Abas, I., Kutay, H. C., Kahraman, R., Toker, N. Y., Ozcelik, D., Ates, F., y Kaçakci, A. (2007). Effects of organic acid and bacterial direct-feed microbial on fattening performance of Kivircik-male yearling lambs. *Pakistan Journal of nutrition*, 6(2), 149–154.
- Abecia, L., Ramos-Morales, E., Martínez-Fernandez, G., Arco, A., Martín-García, A. I., Newbold, C. J., y Yáñez-Ruiz, D. R. (2014). Feeding management in early life influences microbial colonisation and fermentation in the rumen of newborn goat kids. *Animal Production Science*, 54(9), 1449–1454.
- Ale, C. E., Nader-Macías, M. E. F., Pasteris, S. E., y otros. (2015). Characterization of a Bacteriocin Produced by *Enterococcus gallinarum* CRL 1826 Isolated from Captive Bullfrog: Evaluation of its Mode of Action against *Listeria monocytogenes* and Gram-Negatives. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 2015.
- Anandan, S., Dey, A., Deb, S. M., Kumar, S., y Harbola, P. C. (1999). Effect of curds as probiotic supplement on performance of Cheghu crossbred kids. *Small Ruminant Research*, 32(1), 93–96.
- Andrews, A. H. (2013). Some aspects of coccidiosis in sheep and goats. *Small Ruminant Research*, 110(2–3), 93–95.
- Arevalo, L. Z. (1995). Diarrea infecciosa del ternero causada por *Escherichia coli* enterotoxigénica. *TecnoVet*, 1(1). Recuperado a partir de <http://www.tecnovet.uchile.cl/index.php/RT/article/view/5146>
- Ataşoğlu, C., Akbağ, H. I., Tölü, C., Daş, G., Savaş, T., y Yurtman, İ. Y. (2010). Effects of kefir as a probiotic source on the performance of goat kids. *South African Journal of Animal Science*, 40(4), 363–370.
- Bach, S. J., McAllister, T. A., Veira, D. M., Gannon, V. P. J., y Holley, R. A. (2003). Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* feed supplement on *Escherichia coli* O157: H7 in ruminal fluid in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 104(1), 179–189.
- Bachmeyer, C., Benz, R., Barth, H., Aktories, K., Gilbert, M., y Popoff, M. R. (2001). Interaction of *Clostridium botulinum* C2 toxin with lipid bilayer membranes and Vero cells: inhibition of channel function by chloroquine and related compounds in vitro and intoxication in vivo. *The FASEB Journal*, 15(9), 1658–1660.
- Baldwin, R. L., McLeod, K. R., Klotz, J. L., y Heitmann, R. N. (2004). Rumen development, intestinal growth and hepatic metabolism in the pre-and postweaning ruminant. *Journal of Dairy Science*, 87, E55–E65.
- Beauchemin, K. A., Yang, W. Z., Morgavi, D. P., Ghorbani, G. R., Kautz, W., y 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(6), 1628–1640.
- Benyacoub, J., Rochat, F., Saudan, K.-Y., Rochat, I., Antille, N., Cherbut, C. y Blum, S. (2008). Feeding a diet containing a fructooligosaccharide mix can

- enhance *Salmonella* vaccine efficacy in mice. *The Journal of nutrition*, 138(1), 123–129.
- Bhown, A. S., y Habeeb, A. (1977). Structural studies on  $\epsilon$ -prototoxin of *Clostridium perfringens* type D. Localization of the site of tryptic scission necessary for activation to  $\epsilon$ -toxin. *Biochemical and biophysical research communications*, 78(3), 889–896.
- Boza-López, J., Rodríguez-Osorio, M., Sanz-Ceballos, L., y Sanz-Sampelayo, M. R. (2006). Alergia a las proteínas de la leche. ¿Puede considerarse la leche de cabra hipoalergénica respecto a la de vaca? *Anales*, 19(1). Recuperado a partir de [http://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/3959/09\\_anales.pdf?sequence=1](http://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/3959/09_anales.pdf?sequence=1)
- Brashears, M. M., Galyean, M. L., Loneragan, G. H., Mann, J. E., y Killinger-Mann, K. (2003). Prevalence of *Escherichia coli* O157: H7 and performance by beef feedlot cattle given *Lactobacillus* direct-fed microbials. *Journal of Food Protection*, 66(5), 748–754.
- Brewer, M. T., Anderson, K. L., Yoon, I., Scott, M. F., y 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(1–2), 248–255.
- Briz, R. C. (2006). Retirada de los antibióticos promotores de crecimiento en la unión europea: causas y consecuencias. Dpto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. Recuperado a partir de [https://www.researchgate.net/profile/Ricardo\\_Cepero/publication/267787390\\_RETIRADA\\_DE\\_LOS\\_ANTIBIOTICOS\\_PROMOTORES\\_DE\\_CRECIMIENTO\\_EN\\_LA\\_UNION\\_EUROPEA\\_CAUSAS\\_Y\\_CONSECUENCIAS/links/54b3c16a0cf26833efcecd06.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Ricardo_Cepero/publication/267787390_RETIRADA_DE_LOS_ANTIBIOTICOS_PROMOTORES_DE_CRECIMIENTO_EN_LA_UNION_EUROPEA_CAUSAS_Y_CONSECUENCIAS/links/54b3c16a0cf26833efcecd06.pdf)
- Bugdayci, K. E., Oguz, M. N., Oguz, F. K., Albay, M. K., y Oner, J. (2016). Effects of live yeast culture addition into sucrose supplemented diet on fattening performance, some blood and histological parameters in Saanen male kids fed without forage. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 63. Recuperado a partir de <http://dergiler.ankara.edu.tr/dergiler/11/2059/21379.pdf>
- Campos-Granados, C., y Augusto, R.-B. (2015). Suplementación con Pared Celular y Cultivo de Levaduras en Vacas Prontas y su Efecto sobre la Calidad del Calostro y el Estado Inmunológico de las Terneras. *Agronomía Costarricense*, 39(1), 121–129.
- 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., y Gasa, J. (2006). Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR. *Veterinary microbiology*, 114(1), 165–170.
- Castro, M., y Rodríguez, F. (2005). Levaduras: probióticos y prebióticos que mejoran la producción animal. *Revista Corpoica*, 6(1), 26–38.

- Chartier, C., y Paraud, C. (2012). Coccidiosis due to *Eimeria* in sheep and goats, a review. *Small Ruminant Research*, 103(1), 84–92.
- Chaucheyras, F., Fonty, G., Bertin, G., y Gouet, P. (1995). In vitro H<sub>2</sub> utilization by a ruminal acetogenic bacterium cultivated alone or in association with an Archaea methanogen is stimulated by a probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(9), 3466–3467.
- Chaucheyras-Durand, F., Faqir, F., Ameilbonne, A., Rozand, C., y 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(3), 640–647.
- Chaucheyras-Durand, F., y 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(1), 30–36.
- Chaucheyras-Durand, F., Walker, N. D., y Bach, A. (2008). Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1), 5–26.
- Chen, L. M., Kaniga, K., y Galán, J. E. (1996). *Salmonella* spp. are cytotoxic for cultured macrophages. *Molecular microbiology*, 21(5), 1101–1115.
- Chiquette, J., Allison, M. J., y Rasmussen, M. (2012). Use of *Prevotella bryantii* 25A and a commercial probiotic during subacute acidosis challenge in midlactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95(10), 5985–5995.
- Cho, S. K., Kim, J. Y., y Park, J. M. (1991). Studies on *Clostridium perfringens* infection of piglets. *The Research Reports of the Rural Development Administration* (Korea Republic). Recuperado a partir de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=KR9136566>
- Cid, D., Píriz, S., Ruiz-Santa-Quiteria, J. A., Valle, J., Vadillo, S., y de la Fuente, R. (1996). In vitro susceptibility of *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic lambs and goat kids to 14 antimicrobial agents. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 19(5), 397–401.
- CNPC. (2014). Anuario 2013. *Comité Nacional Sistema Producto Caprinos 2013*, SAGARPA, México.
- Cotter, P. A., y DiRita, V. J. (2000). Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 519–565.
- Cruz-López, A. (2015). Estrategias para disminuir la mortalidad perinatal en cabras. Presentado en 2° Simposio Nacional de la Cabra, Pachuca, Hidalgo, México: Asociación Mexicana de Criadores de Ganado Caprino de Registro.
- Daş, G., Ataşoğlu, C., Akbağ, H. I., Tölü, C., Yurtman, İ. Y., y Savaş, T. (2012). Effects of kefir on coccidial oocysts excretion and performance of dairy goat kids following weaning. *Tropical animal health and production*, 44(5), 1049–1055.
- Das, M., Laha, R., Goswami, A., y Goswami, A. (2017). Gastrointestinal parasitism of goats in hilly region of Meghalaya, India. *Veterinary World*, 10(1), 81.

- NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos -Clasificación y especificaciones de manejo. Manejo de RPBI. Publicado en el Diario Oficial de la Federación. Ciudad de México, 17 de febrero de 2003
- Department of Primary Industries (NSW). (2015). Standard Operating Procedures-cattle [Collection of faeces]. Recuperado el 8 de agosto de 2015, a partir de <http://www.dpi.nsw.gov.au/agriculture/livestock/animal-welfare/general/livestock/sop/cattle/faeces-collection>
- Desnoyers, M., Giger-Reverdin, S., Bertin, G., Duvaux-Ponter, C., y Sauvant, D. (2009). Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. *Journal of Dairy Science*, 92(4), 1620–1632.
- Díaz-Aparicio, E., Jaramillo-Meza, L., Aguilar-Romero, F., y Cárdenas, L. S. (1987). Aislamiento e identificación de salmonelas en caprinos de México. *Técnicas Pecuarias México*, 25(1), 49–52.
- Díaz-Plascencia, D., Rodríguez-Muela, C., y Mancillas-Flores, P. F. (2013). Aditivo de Levaduras de manzana para Alimentación Animal. Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Zootecnia y Ecología, Chihuahua, México.
- Duhamel, G. E., Moxley, R. A., Maddox, C. W., y Erickson, E. D. (1992). Enteric Infection of a Goat with Enterohemorrhagic *Escherichia Coli* (0103:H2). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4(2), 197–200.
- Edwards, P. R., y Ewing, W. H. (1962). Identification of *Enterobacteriaceae*. *Identification of Enterobacteriaceae*, (2nd Edition).
- Eicher, S. D., Wesley, I. V., Sharma, V. K., y Johnson, T. R. (2010). Yeast cell-wall products containing  $\beta$ -glucan plus ascorbic acid affect neonatal calf leukocytes and growth after a transport stressor. *Journal of animal science*, 88(3), 1195–1203.
- Elghandour, M. M., Salem, A. Z., Castañeda, J. S. M., Camacho, L. M., Kholif, A. E., y Chagoyán, J. C. V. (2015). Direct-fed microbes: A tool for improving the utilization of low quality roughages in ruminants. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(3), 526–533.
- El-Ghani, A. A. (2004). Influence of diet supplementation with yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on performance of Zaraibi goats. *Small ruminant research*, 52(3), 223–229.
- Espinosa, J. G. (2004). Diarreas neonatales en corderos y cabritos. *Mundo ganadero*, 15(164), 38–39.
- Faizal, A. C. M., Rajapakse, R. P. V. J., Jayasinghe, S. R., y Rupasinghe, V. (1999). Prevalence of *Eimeria* Spp. and gastrointestinal nematodes versus weight gains in treated goats raised in the dry areas of Sri Lanka. *Small Ruminant Research*, 34(1), 21–25.
- Fernández, J. L., Rabasa, A. E., Saldaño, S. A., Cruz, M. L., y Gutiérrez, C. V. (2001). Mortalidad perinatal de cabritos criollos en condiciones de manejo mejorado. *Zootecnia Tropical*, 19(1), 73–79.

- Finlay, B. B., y Falkow, S. (1997). Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and molecular biology reviews*, 61(2), 136–169.
- Foreyt, W. J. (1990). Coccidiosis and cryptosporidiosis in sheep and goats. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 6(3), 655–670.
- Forte, L. R., Thorne, P. K., Eber, S. L., Krause, W. J., Freeman, R. H., Francis, S. H., y Corbin, J. D. (1992). Stimulation of intestinal Cl<sup>-</sup> transport by heat-stable enterotoxin: activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 263(3), C607–C615.
- Freitas, F. L. da C., Almeida, K. de S., Nascimento, A. A. do, Machado, C. R., Veschi, J. L. A., y Machado, R. Z. (2005). Espécies do gênero *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) em caprinos leiteiros mantidos em sistema intensivo na região de São Jose do Rio Preto, estado de São Paulo, Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet*, 7–10.
- Fujii, Y., Nomura, S., Oshita, Y., y Sakurai, J. (1986). Excitatory effect of *Clostridium perfringens* alpha toxin on the rat isolated aorta. *British journal of pharmacology*, 88(3), 531–539.
- Gaggia, F., Mattarelli, P., y Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, 141, S15–S28.
- Galán, J. E. (1996). Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Molecular microbiology*, 20(2), 263–271.
- Gallego, C. F. (2004). Cálculo del tamaño de la muestra. *Matronas profesión*, 5(18), 5–13.
- Galvão, K. N., Santos, J. E., Coscioni, A., Villasenor, M., Sischo, W. M., y Berge, A. C. B. (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(4), 427–440.
- Gao, J., Zhang, H. J., Wu, S. G., Yu, S. H., Yoon, I., Moore, D., Qi, G. H. (2009). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on immune functions of broilers challenged with *Eimeria tenella*. *Poultry Science*, 88(10), 2141–2151.
- García-Trejo, J. R. (2015). Efecto de una cepa de levadura concentrada (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre las poblaciones de la familia *Enterobacteriaceae* en corderos de raza blackbelly (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma de Querétaro, México.
- Gene, O. (2002). The isolation, identification and serotyping of *Salmonella* isolated from domestic poultry in Kars district. *Kafkas Univarsitesi Veteriner Fakultesi, Dergisi*, 8, 23–30.
- Ghazanfar, S., Anjum, M., Azim, A., y 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(1), 53–59.
- Ghorbani, G. R., Morgavi, D. P., Beauchemin, K. A., y Leedle, J. A. Z. (2002). Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation, blood variables,



- and the microbial populations of feedlot cattle. *Journal of animal science*, 80(7), 1977–1985.
- Gilliland, R. L., Bush, L. J., y Friend, J. D. (1962). Relation of ration composition to rumen development in early-weaned dairy calves with observations on ruminal parakeratosis. *Journal of Dairy Science*, 45(10), 1211–1217.
- Gomes, L. C., Alcalde, C. R., Lima, L. R. de, Lima, L. S. de, Souza, R. de, y Possamai, A. P. S. (2014). Nutritive value of diets containing inactive dry yeast for lactating Saanen goats. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 43(1), 36–43.
- Gómez, A., Pinos, J. M., y Aguirre, J. (2009). Manual de producción caprina. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, SLP. México.
- Gómez, S. M. (2001). Síndrome diarreico neonatal de los rumiantes. *Ganadería*, (10), 36–40.
- Gorvel, J.-P., y Méresse, S. (2001). Maturation steps of the *Salmonella*-containing vacuole. *Microbes and infection*, 3(14), 1299–1303.
- Gregory, M. W., y Catchpole, J. (1987). Ovine coccidiosis: pathology of *Eimeria ovinoidalis* infection. *International journal for parasitology*, 17(6), 1099–1111.
- Groisman, E. A., y Ochman, H. (1997). How *Salmonella* became a pathogen. *Trends in microbiology*, 5(9), 343–349.
- Guerrero-Cruz, M. (2010). La caprinocultura en México, una estrategia de desarrollo. *Revista Universitaria Digital de Ciencias Sociales*, 1, 1–8.
- Guevara, D. (2011). Probióticos en nutrición animal. Sistema de revisiones en investigación veterinaria en San Marcos. Recuperado a partir de [http://veterinaria.unmsm.edu.pe/files/Articulo\\_guevara\\_probioticos.pdf](http://veterinaria.unmsm.edu.pe/files/Articulo_guevara_probioticos.pdf)
- Hadjipanayiotou, M., Antoniou, I., y Photiou, A. (1997). Effects of the inclusion of yeast culture on the performance of dairy ewes and goats and the degradation of feedstuffs. *Livestock Production Science*, 48(2), 129–134.
- Hartemink, R., Van Laere, K. M. J., y Rombouts, F. M. (1997). Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 83(3), 367–374.
- He, Z. X., Ferlisi, B., Eckert, E., Brown, H. E., Aguilar, A., y Steele, M. A. (2017). Supplementing a yeast probiotic to pre-weaning Holstein calves: Feed intake, growth and fecal biomarkers of gut health. *Animal Feed Science and Technology*, 226, 81–87.
- Hernández-García, P. A., Lara-Bueno, A., Mendoza-Martínez, G. D., Bárcena-Gama, J. R., Plata-Pérez, F. X., López-Ordaz, R., y Martínez-García, J. A. (2015). Effects of feeding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), organic selenium and chromium mixed on growth performance and carcass traits of hair lambs. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(3), 575–582.
- Herrera, B. Y., y Jarib, R. L. (2015). Salmonelosis, zoonosis de las aves y una patogenicidad muy. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 16(1). Recuperado a partir de <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010115/011504.pdf>

- Heuer, H., Schmitt, H., y Smalla, K. (2011). Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 236–243.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., y Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506–514.
- Hirst, T. R., Ruddock, L. W., Hillary, J. B., y Lencer, W. I. (1998). Membrane translocation and targeting of cholera toxin and related enterotoxins in prokaryotic and eukaryotic systems. *Zentralblatt fur Bakteriologie-supplement*, 113–120.
- Hitotsubashi, S., Fujii, Y., Yamanaka, H., y Okamoto, K. (1992). Some properties of purified *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Infection and immunity*, 60(11), 4468–4474.
- Hong, K. H., y Miller, V. L. (1998). Identification of a Novel *Salmonella* Invasion Locus Homologous to *Shigella*. *Journal of Bacteriology*, 180(7), 1793–1802.
- Hussein, A. F. (2014). Effect of biological additives on growth indices and physiological responses of weaned Najdi ram lambs. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 2(6), 597–607.
- Ja, H., Li, M., Je, R., y Ni, G. (1981). Role of *Salmonella arizonae* and other infective agents in enteric disease of lambs. *American Journal of Veterinary Research*, 42(4), 596–599.
- Jung, S. J., Houde, R., Baurhoo, B., Zhao, X., y Lee, B. H. (2008). Effects of galactooligosaccharides and a *Bifidobacteria lactis*-based probiotic strain on the growth performance and fecal microflora of broiler chickens. *Poultry science*, 87(9), 1694–1699.
- Kamal, R., Dutt, T., Singh, M., Kamra, D. N., Patel, M., Choudhary, L. C., y Islam, M. (2013). Effect of live *Saccharomyces cerevisiae* (NCDC-49) supplementation on growth performance and rumen fermentation pattern in local goat. *Journal of Applied Animal Research*, 41(3), 285–288.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., y Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology*, 2(2), 123.
- Kernéis, S., Bogdanova, A., Kraehenbuhl, J.-P., y Pringault, E. (1997). Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science*, 277(5328), 949–952.
- Khachatryan, A. R., Hancock, D. D., Besser, T. E., y Call, D. R. (2004). Role of Calf-Adapted *Escherichia coli* in Maintenance of Antimicrobial Drug Resistance in Dairy Calves. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 752–757.
- Khalid, M. F., Shahzad, M. A., Sarwar, M., Rehman, A. U., Sharif, M., y Mukhtar, N. (2011). Probiotics and lamb performance: A review. *African Journal of agricultural Research*, 6(23), 5198–5203.

- Khan, M. A., Bach, A., Weary, D. M., y von Keyserlingk, M. A. G. (2016). Invited review: Transitioning from milk to solid feed in dairy heifers. *Journal of dairy science*, 99(2), 885–902.
- Kim, H.-Y., Byun, J.-W., Roh, I.-S., Bae, Y.-C., Lee, M.-H., Kim, B., y Jung, B. Y. (2013). First isolation of *Clostridium perfringens* type E from a goat with diarrhea. *Anaerobe*, 22, 141–143.
- Knapp, C. W., Engemann, C. A., Hanson, M. L., Keen, P. L., Hall, K. J., y Graham, D. W. (2008). Indirect evidence of transposon-mediated selection of antibiotic resistance genes in aquatic systems at low-level oxytetracycline exposures. *Environmental science & technology*, 42(14), 5348–5353.
- Kolenda, R., Burdukiewicz, M., y Schierack, P. (2015). A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 5.
- Kritas, S. K., Govaris, A., Christodouloupoulos, G., y Burriel, A. R. (2006). Effect of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* Supplementation of Ewe's Feed on Sheep Milk Production and Young Lamb Mortality. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 53(4), 170–173.
- Kumagai, H., Kumagae, S., Mitani, K., y 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(3), 219–224.
- Lettat, A., Nozière, P., Silberberg, M., Morgavi, D. P., Berger, C., y Martin, C. (2012). Rumen microbial and fermentation characteristics are affected differently by bacterial probiotic supplementation during induced lactic and subacute acidosis in sheep. *BMC microbiology*, 12(1), 1.
- Lior, H. (1994). Classification of *Escherichia coli*.
- Liou, L., Sheng, H., Ferends, W., Schneider, C., Hristov, A. N., Yoon, I., y Hovde, C. J. (2009). Reduced Carriage of *Escherichia coli* O157:H7 in Cattle Fed Yeast Culture Supplement. *The Professional Animal Scientist*, (25), 553–558.
- Liu, J., Zheng, S., y Hu, J. (2006). Dynamic changes of T lymphocyte subpopulations in immune organs of chicks infected with *Eimeria necatrix*. *Acta Veterinaria et Zootechnica SINICA*, 37(2), 168.
- Macedo, R., Arredondo, V., Rodríguez, J., Ramírez, J., y López, B. (2010). Efecto del sistema de producción, de la época de nacimiento y del sexo sobre la mortalidad neonatal de corderos Pelibuey. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12, 77–84.
- Magalhães, V. J. A., Susca, F., Lima, F. S., Branco, A. F., Yoon, I., y Santos, J. E. P. (2008). Effect of feeding yeast culture on performance, health, and immunocompetence of dairy calves. *Journal of dairy science*, 91(4), 1497–1509.
- Małaczewska, J., Milewski, S., y otros. (2010). Immunomodulating effect of Inter Yeast S on the non-specific and specific cellular and humoral immunity in lambs. *Pol J Vet Sci*, 13, 163–170.

- Malekkhahi, M., Tahmasbi, A. M., Naserian, A. A., Danesh Mesgaran, M., Kleen, J. L., y Parand, A. A. (2015). Effects of essential oils, yeast culture and malate on rumen fermentation, blood metabolites, growth performance and nutrient digestibility of Baluchi lambs fed high-concentrate diets. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 99(2), 221–229.
- Malinen, E., Kassinen, A., Rinttilä, T., y Palva, A. (2003). Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology*, 149(1), 269–277.
- Maragkoudakis, P. A., Mountzouris, K. C., Rosu, C., Zoumpopoulou, G., Papadimitriou, K., Dalaka, E., y otros. (2010). Feed supplementation of *Lactobacillus plantarum* PCA 236 modulates gut microbiota and milk fatty acid composition in dairy goats—a preliminary study. *International journal of food microbiology*, 141, S109–S116.
- Matos, L., Hermosilla, C., Taubert, A., Muñoz, M. C., Molina, J. M., Andrada, M., y otros. (2009). Aislamiento e infectividad en cabritos de una cepa de *Eimeria ninkohlyakimovae* aislada en Gran Canaria (España). *Revista canaria de las ciencias veterinarias*, (6), 6–13.
- Meale, S. J., Ding, S., He, M. L., Dugan, M. E. R., Ribeiro, G. O., Alazzeh, A. Y. y Chaves, A. V. (2014). Effect of *Propionibacterium freudenreichii* on ruminal fermentation patterns, methane production and lipid biohydrogenation of beef finishing diets containing flaxseed oil in a rumen simulation technique. *Canadian Journal of Animal Science*, 94(4), 685–695.
- Meganck, V., Hoflack, G., y Opsomer, G. (2014). Advances in prevention and therapy of neonatal dairy calf diarrhoea: a systematical review with emphasis on colostrum management and fluid therapy. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56, 75.
- Méndez, A., Maldonado, A., Ruiz-Villamor, E., Luque, I., Bautista, M. J., Huerta, B. y Borge, C. (2015). Enfermedades neonatales. Recuperado a partir de <http://www.uno.org.mx/empezar/neonatales.html>
- Mendoza, G. D., Britton, R. A., y Stock, R. A. (1993). Influence of ruminal protozoa on site and extent of starch digestion and ruminal fermentation. *Journal of animal science*, 71(6), 1572–1578.
- Mendoza, M. G., Ale, C. E., Nader-Macías, M. E. F., y Pasteris, S. E. (2015). Characterization of a Bacteriocin Produced by *Enterococcus gallinarum* CRL 1826 Isolated from Captive Bullfrog: Evaluation of its Mode of Action against *Listeria monocytogenes* and Gram-Negatives. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 5(8), 1.
- Miclard, J., van Baarlen, J., Wyder, M., Grabscheid, B., y Posthaus, H. (2009). Clostridium perfringens $\beta$ -toxin binding to vascular endothelial cells in a human case of enteritis necroticans. *Journal of medical microbiology*, 58(6), 826–828.
- Milewski, S. (2009). Effect of yeast preparations *Saccharomyces cerevisiae* on meat performance traits and blood hematological indices in sucking lambs. *Medycyna Weterynaryjna*, 65(1), 51–54.

- Milewski, S., Sobiech, P., y otros. (2009). Effect of dietary supplementation with *Saccharomyces cerevisiae* dried yeast on milk yield, blood biochemical and haematological indices in ewes. *Bull Vet Inst Pulawy*, 53, 753–758.
- Monack, D. M., Hersh, D., Ghorri, N., Bouley, D., Zychlinsky, A., y Falkow, S. (2000). *Salmonella* exploits caspase-1 to colonize Peyer's patches in a murine typhoid model. *Journal of Experimental Medicine*, 192(2), 249–258.
- Mosoni, P., Chaucheyras-Durand, F., Béra-Maillet, C., y 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(6), 2676–2685.
- Moxley, R. A., y Smith, D. R. (2010). Attaching-effacing *Escherichia coli* infections in cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 26(1), 29–56.
- Muñoz, M., Alvarez, M., Lanza, I., y Carmenes, P. (1996). Role of enteric pathogens in the aetiology of neonatal diarrhoea in lambs and goat kids in Spain. *Epidemiology and Infection*, 117(1), 203–211.
- Murray, P., Rosenthal, K. S., y Pfaller, M. A. (2015). *Microbiología médica*. Elsevier Brasil.
- Nagahama, M., Morimitsu, S., Kihara, A., Akita, M., Setsu, K., y Sakurai, J. (2003). Involvement of tachykinin receptors in *Clostridium perfringens* beta-toxin-induced plasma extravasation. *British journal of pharmacology*, 138(1), 23–30.
- Nagahama, M., Nakayama, T., Michiue, K., y Sakurai, J. (1997). Site-specific mutagenesis of *Clostridium perfringens* alpha-toxin: replacement of Asp-56, Asp-130, or Glu-152 causes loss of enzymatic and hemolytic activities. *Infection and immunity*, 65(8), 3489–3492.
- Nagaraja, T. G., y Titgemeyer, E. C. (2007). Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *Journal of Dairy Science*, 90, E17–E38.
- Nagy, B., y Fekete, P. Z. (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *International Journal of Medical Microbiology*, 295(6–7), 443–454.
- Nataro, J. P., y Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 11(1), 142–201.
- Newbold, C. J., Wallace, R. J., Chen, X. B., y 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(6), 1811–1818.
- Newbold, C. J., Wallace, R. J., y McIntosh, F. M. (1996). Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *British Journal of Nutrition*, 76(2), 249–261.
- Nowak, R., y Poindron, P. (2006). From birth to colostrum: early steps leading to lamb survival. *Reproduction Nutrition Development*, 46(4), 431–446.
- O'Brien, A. D., y Holmes, R. K. (1996). Protein toxins of *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Escherichia coli*, 2788–2802.

- Ochoa, I. M. F., y Rodríguez, A. V. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Revista latinoamericana de microbiología*, 47(1–2), 25–42.
- Oguz, F. K., Bugdayci, K. E., y Oguz, M. N. (2015). The Effects of Yeast Culture Products on Fattening Performance, Rumen Papilla Morphology, Some Blood and Rumen Fluid Parameters in Saanen Male Kids. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 21(4), 455–461.
- Ohl, M. E., y Miller, S. I. (2001). *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annual review of medicine*, 52(1), 259–274.
- Olvera-Ramírez, A. M. (2007). The effect of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on pathogen survival and fermentation parameters in the rumen (graduate thesis). University of Aberdeen, United Kingdom.
- Orden-Gutiérrez, J. A., y de la Fuente López, R. (2001). Repercusiones en la salud pública de la resistencia a quinolonas en bacterias de origen animal. *Revista Española de Salud Pública*, 75(4), 313–320.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2015). FAOSTAT [Producción/Ganadería]. Recuperado el 12 de octubre de 2015, a partir de <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QA/S>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), (2016). Manual para el personal auxiliar de sanidad animal primaria. Recuperado el 2 de marzo de 2016, a partir de <http://www.fao.org/docrep/t0690s/t0690s0i.htm>
- Özsoy, B., Yalçın, S., Erdoğan, Z., Cantekin, Z., y Aksu, T. (2013). Effects of dietary live yeast culture on fattening performance on some blood and rumen fluid parameters in goats. *Revue Méd. Vét.*, 164(5), 263–271.
- Palacios-Toro, I. (2008). Mortalidad Neonatal en corderos en la región de Magallanes (Tesis de Ingeniería). Universidad de Magallanes, Magallanes, Chile.
- Paton, J. C., y Paton, A. W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical microbiology reviews*, 11(3), 450–479.
- Petit, L., Gibert, M., y Popoff, M. R. (1999). *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends in microbiology*, 7(3), 104–110.
- Pinloche, E., McEwan, N., Marden, J.-P., Bayourthe, C., Auclair, E., y Newbold, C. J. (2013). The Effects of a Probiotic Yeast on the Bacterial Diversity and Population Structure in the Rumen of Cattle. *Plos One*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067824>
- Rai, V., Yadav, B., Lakhani, G. P., y otros. (2013). Application of Probiotic and Prebiotic in Animals Production: A Review. *Environment & Ecology*, 31(2B), 873–876.
- Ramírez-Bribiesca, E., Hernández-Camacho, E., Hernández-Calva, L. M., y Tórtora-Pérez, J. L. (2004). Efecto de un suplemento parenteral con selenito de sodio en la mortalidad de corderos y los valores hemáticos de selenio. *Agrociencia*, 38(1), 43–51.

- Ramírez-Ramírez, M. (2015). Influencia de la suplementación de una levadura viva (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre la productividad y supervivencia de *Listeria innocua* en corderos de engorda (Tesis de posgrado). Universidad Autónoma de Querétaro, México.
- Ramírez-Bribiesca, J. E., Tórtora, J. L., Hernández, L. M., y Huerta, M. (2001). Main causes of mortalities in dairy goat kids from the Mexican plateau. *Small Ruminant Research*, 41(1), 77–80.
- Reiman, D. A., Schmidt, T. M., Gajadhar, A., Sogin, M., Cross, J., Yoder, K. y Echeverria, P. (1996). Molecular Phylogenetic Analysis of *Cyclospora*, the Human Intestinal Pathogen, Suggests that it is Closely Related to *Eimeria* Species. *The Journal of Infectious Diseases*, 173(2), 440–445.
- Rickard, M. D., y Ternouth, J. H. (1965). The effect of the increased dietary volatile fatty acids on the morphological and physiological development of lambs with particular reference to the rumen. *The Journal of Agricultural Science*, 65(3), 371–377.
- Rigobelo, E. E. C., Karapetkov, N., Maestá, S. A., Ávila, F. A. de, y McIntosh, D. (2014). Use of probiotics to reduce faecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep. *Beneficial microbes*, 6(1), 53–60.
- Riyanti, L., Evvyernie, D., y otros. (2016). In vitro Fermentation Characteristics and Rumen Microbial Population of Diet Supplemented with *Saccharomyces cerevisiae* and Rumen Microbe Probiotics. *Media Peternakan*, 39(1), 40–45.
- Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 44(5), 464–475.
- Rojas, L. (2014). Las cabras en México. Recuperado el 7 de marzo de 2016, a partir de <http://www.borrego.com.mx/zootecnia/cabras/las-cabras-en-mexico/>
- Rose, M. E., y Hesketh, P. (1987). *Eimeria tenella*: effects of immunity on sporozoites within the lumen of the small intestine. *Experimental parasitology*, 63(3), 337–344.
- Ruiz, A., Gonzalez, J. F., Rodríguez, E., Martín, S., Hernández, Y. I., Almeida, R., y Molina, J. M. (2006). Influence of Climatic and Management Factors on *Eimeria* Infections in Goats from Semi-arid Zones. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 53(8), 399–402.
- Ruiz, A., Matos, L., Muñoz, M. C., Hermosilla, C., Molina, J. M., Andrada, M., y Taubert, A. (2013). Isolation of an *Eimeria ninakohlyakimovae* field strain (Canary Islands) and analysis of its infection characteristics in goat kids. *Research in Veterinary Science*, 94(2), 277–284.
- Saha, G. K., Paul, A. K., Abdussamad, M., y Khan, M. S. R. (2013). Epidemiological Investigation and Antibiotic Sensitivity of Salmonellosis in Goats at the Selected Areas of Bangladesh. *Journal of Embryo Transfer*. Recuperado a partir de [https://www.researchgate.net/profile/Ashit\\_Paul2/publication/259675370\\_Epidemiological\\_Investigation\\_and\\_Antibiotic\\_Sensitivity\\_of\\_Salmonellosis\\_in\\_Goats\\_at\\_the\\_Selected\\_Areas\\_of\\_Bangladesh/links/0c96052d4bc2e9341b000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Ashit_Paul2/publication/259675370_Epidemiological_Investigation_and_Antibiotic_Sensitivity_of_Salmonellosis_in_Goats_at_the_Selected_Areas_of_Bangladesh/links/0c96052d4bc2e9341b000000.pdf)

- Salcedo, J., Anaya, G., Naranjo-Cerillo, G., Hermoso, D., y Mendoza-Salcedo, M. (1994). Prácticas Zootécnicas Asociadas al Síndrome de Mortalidad Neonatal en pequeños rumiantes. *Producción ovina y caprina*, 21, 93.
- Saratsis, A., Joachim, A., Alexandros, S., y Sotiraki, S. (2011). Lamb coccidiosis dynamics in different dairy production systems. *Veterinary Parasitology*, 181(2–4), 131–138.
- Savarino, S. J., McVeigh, A., Watson, J., Cravioto, A., Molina, J., Echeverria, P. y Fasano, A. (1996). Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative E. coli. *Journal of infectious diseases*, 173(4), 1019–1022.
- Schneider, S. A. (2015). Beyond the Food We Eat: Animal Drugs in Livestock Production. En Duke Environmental Law y Policy Forum (Vol. 25). Recuperado a partir de [http://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract\\_id=2628314](http://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=2628314)
- Seo, J. K., Kim, S.-W., Kim, M. H., Upadhaya, S. D., Kam, D. K., y Ha, J. K. (2010). Direct-fed Microbials for Ruminant Animals. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(12), 1657–1667.
- Sharma, A. K., Tripathi, B. N., Verma, J. C., y Parihar, N. S. (2001). Experimental *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar Typhimurium infection in Indian goats: clinical, serological, bacteriological and pathological studies. *Small Ruminant Research*, 42(2), 125–134.
- Shepard, L. A., Shatursky, O., Johnson, A. E., y Tweten, R. K. (2000). The mechanism of pore assembly for a cholesterol-dependent cytolysin: formation of a large prepore complex precedes the insertion of the transmembrane  $\beta$ -hairpins. *Biochemistry*, 39(33), 10284–10293.
- Shoemaker, N. B., Vlamakis, H., Hayes, K., y Salyers, A. A. (2001). Evidence for Extensive Resistance Gene Transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and Other Genera in the Human Colon. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2), 561–568.
- Sirard, J.-C., Niedergang, F., y Kraehenbuhl, J.-P. (1999). Live attenuated *Salmonella*: a paradigm of mucosal vaccines. *Immunological reviews*, 171(1), 5–26.
- Sistema Producto Caprino (SPC). (2014). Cadena productiva Leche de Cabra. Recuperado a partir de [www.cnsp.caprinos.org.mx](http://www.cnsp.caprinos.org.mx)
- Smit, H., Gaastra, W., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F., y De Graaf, F. K. (1984). Isolation and structural characterization of the equine erythrocyte receptor for enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 fimbrial adhesin. *Infection and immunity*, 46(2), 578–584.
- Songer, J. G. (1996). Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clinical microbiology reviews*, 9(2), 216.
- Soulsby, E. J. L., y otros. (1968). Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. Recuperado a partir de <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19682902735>



- Spangler, B. D. (1992). Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiological reviews*, 56(4), 622–647.
- Stein, D. R., Allen, D. T., Perry, E. B., Bruner, J. C., Gates, K. W., Rehberger, T. G., y Spicer, L. J. (2006). Effects of Feeding Propionibacteria to Dairy Cows on Milk Yield, Milk Components, and Reproduction. *Journal of Dairy Science*, 89(1), 111–125.
- Stella, A. V., Paratte, R., Valnegri, L., Cigalino, G., Soncini, G., Chevaux, E. y 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(1), 7–13.
- Stephens, T. P., Loneragan, G. H., Karunasena, E., y Brashears, M. M. (2007). Reduction of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* in feces and on hides of feedlot cattle using various doses of a direct-fed microbial. *Journal of Food Protection*, 70(10), 2386–2391.
- Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K., y Matošić, S. (2010). Antimicrobial activity—the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3), 296–307.
- Tabe, E. S., Oloya, J., Doetkott, D. K., Bauer, M. L., Gibbs, P. S., y Khaitisa, M. L. (2008). Comparative effect of direct-fed microbials on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in naturally infected feedlot cattle. *Journal of Food Protection*, 71(3), 539–544.
- Tadich, N. T. (1988). Colibacilosis en corderos. *Monografías de Medicina Veterinaria*, 10(1). Recuperado a partir de <http://www.revistas.uchile.cl/index.php/MMV/article/view/6148>
- Tao, M. A., Yan, T. U., Zhang, N., Guo, J., Deng, K., Yi, Z. y Diao, Q. (2015). Effects of dietary yeast  $\beta$ -glucan on nutrient digestibility and serum profiles in pre-ruminant Holstein calves. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(4), 749–757.
- Teo, A. Y., y Tan, H.-M. (2007). Evaluation of the Performance and Intestinal Gut Microflora of Broilers Fed on Corn-Soy Diets Supplemented With *Bacillus subtilis* PB6 (CloSTAT). *The Journal of Applied Poultry Research*, 16(3), 296–303.
- Timoney, J. F., Gillespie, J. H., Scott, F. W., Barlough, J. E., y otros. (1988). Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals. (Ed. 8). Recuperado a partir de <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19892292649>
- Titball, R. W. (1993). Bacterial phospholipases C. *Microbiological reviews*, 57(2), 347–366.
- Tripathi, M. K., y 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(1), 17–25.
- Universidad de Hertfordshire. (2011). Código de Recomendaciones para el bienestar del ganado (PB9733 y PB0081) - Viviendas, edificios y equipo.

Recuperado el 7 de marzo de 2016, a partir de <http://adlib.everysite.co.uk/adlib/defra/content.aspx?id=000IL3890W.16NTBXJAGDY1AQ>

- Uyeno, Y., Sekiguchi, Y., y Kamagata, Y. (2010). rRNA-based analysis to monitor succession of faecal bacterial communities in Holstein calves. *Letters in applied microbiology*, 51(5), 570–577.
- Uzal, F. A., Fisher, D. J., Saputo, J., Sayeed, S., McClane, B. A., Songer, G. y Gard, S. (2008). Ulcerative Enterocolitis in Two Goats Associated with Enterotoxin- and beta2 Toxin-Positive *Clostridium Perfringens* Type D. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(5), 668–672.
- Uzal, F. A., y Kelly, W. R. (1996). Enterotoxaemia in goats. *Veterinary Research Communications*, 20(6), 481–492.
- Uzal, F. A., y Kelly, W. R. (1998). Experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in goats. *Veterinary Pathology Online*, 35(2), 132–140.
- Uzal, F. A., y Marcellino, R. M. (2002). *Clostridium perfringens* in clinically healthy sheep of Patagonia, Argentina. En The 6th Biennial Congress of the Anaerobe Society of the Americas.
- Uzal, F. A., y Songer, J. G. (2008). Diagnosis of *Clostridium Perfringens* Intestinal Infections in Sheep and Goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(3), 253–265.
- Vázquez, C., y Dolores, M. (2002). Caracterización de estirpes de *Esherichia coli* aisladas de diarreas neonatales de corderos y cabritos. Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones. Recuperado a partir de <http://eprints.ucm.es/3200/>
- Vazquez-Torres, A., y Fang, F. C. (2001). *Salmonella* evasion of the NADPH phagocyte oxidase. *Microbes and Infection*, 3(14), 1313–1320.
- Verschueren, H., Van der Taelen, I., Dewit, J., De Braekeleer, J., De Baetselier, P., Aktories, K., y Just, I. (1995). Effects of *Clostridium botulinum* C2 toxin and cytochalasin D on in vitro invasiveness, motility and F-actin content of a murine T-lymphoma cell line. *European journal of cell biology*, 66(4), 335–341.
- Withanage, G. S. K., Kaiser, P., Wigley, P., Powers, C., Mastroeni, P., Brooks, H., y McConnell, I. (2004). Rapid expression of chemokines and proinflammatory cytokines in newly hatched chickens infected with *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infection and immunity*, 72(4), 2152–2159.
- Woods, W. G., Richards, G., Whithear, K. G., Anderson, G. R., Jorgensen, W. K., y Gasser, R. B. (2000). High-resolution electrophoretic procedures for the identification of five *Eimeria* species from chickens, and detection of population variation. *Electrophoresis*, 21(17), 3558–3563.
- Wray, C., y Davies, R. H. (2000). *Salmonella* infections in cattle. *Salmonella in domestic animals*, 169–190.
- Yang, Y., Iji, P. A., y Choct, M. (2009). Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. *World's Poultry Science Journal*, 65(1), 97–114.

- Zabek, K., Milewski, S., Wojcik, R., y Siwicki, A. K. (2014). The effects of supplementing diets fed to pregnant and lactating ewes with *Saccharomyces cerevisiae* dried yeast. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 38(2), 200–206.
- Zaleska, B., Milewski, S., y Zabek, K. (2015). Impact of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on reproductive performance, milk yield in ewes and offspring growth. *Archiv fuer Tierzucht*, 58(1), 79.
- Zamora, J., Reinhardt, G., Tadich, N., Polette, M., y Jaramillo, M. I. (1997). Propiedades hemaglutinantes de cepas de *Escherichia coli* aisladas de corderos diarreicos y su relación con su toxicidad. *Archivos de medicina veterinaria*, 29(1), 77–81.
- Zhang, S., Kingsley, R. A., Santos, R. L., Andrews-Polymenis, H., Raffatellu, M., Figueiredo, J. y Bäumler, A. J. (2003). Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium-induced diarrhea. *Infection and immunity*, 71(1), 1–12.