

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Aislamiento e identificación por técnicas moleculares
de aislados bacterianos pertenecientes a géneros con
potencial aplicación probiótica presentes en el intestino
de cuyes (*Cavia porcellus*)**

TESIS

para optar el título de Médico Veterinario

AUTOR

Katerine Porturas Araujo

ASESORES

Jorge Rodríguez,

Arnaldo Alvarado

Lima, Perú

2011

Dedicatoria

*Éste pequeño pero significativo logro en mi vida deseo dedicarlo a la **Energía** que me mantiene viva y me permite plasmar mi más profundo HOMENAJE Y AGRADECIMIENTO a los que en silencio y sumisión aceptaron morir para que Yo pueda aprender: me refiero a los **animales**... por ellos, para ellos, dirijo mi profesión.*

Dedico a mi núcleo familiar: mi mamita, mi gorda, mi momo y mi abuelita que con su apoyo racional, ilimitado y amoroso me transmiten fortaleza, aliento, rumbo y esperanza para creer que mi presente es lo suficientemente bueno como para que sea el último...sin pedir más...

*Dedico también a todas esas **bellas personas** que con su infinita amistad suman y sumarán exceso de felicidad a mi vida.*

Agradecimientos

A Dios, por permitirme vivir, por mi salud, por mi realidad y por ser mi más grande confidente sin criticarme, por el contrario, estimulándome a la autocrítica... mil gracias amigo...

A los animales sacrificados para realizar ésta tesis, gracias a ellos se producirán mejoras para beneficio de sus iguales.

A mi singular familia, que a pesar de las dificultades, nunca dejaron de creer en Mí, a mi Momo, que siempre me roba una sonrisa.

A mi Director de tesis; Dr Fernando Carcelén; por permitirme ser su tesista, ofrecerme su apoyo y confianza hasta el final a pesar de mi rebeldía, por ser mi amigo... mi respeto y valoración.

A mi estimado asesor; Dr Jorge Rodriguez; cuyo conocimiento fue sumamente esencial para desarrollar ésta tesis, gracias a las horas y horas de dedicación, por las clases teóricas y prácticas, por su tiempo, su paciencia, sus explicaciones, por permitirme hallarle el gusto a la genética y sobre todo, gracias por ser mi amigo.

A mi querido asesor; Dr Arnaldo Alvarado; sin Él no se hubiese podido realizar la parte microbiológica, gracias por su conocimiento, asesoramiento, gracias por transmitirme tranquilidad, alegría, seguridad y la oportunidad de practicar en Bioservice, gracias amigo.

A mi querida amiga Karina Mendoza, quien me asesoró en el laboratorio de microbiología, una chica muy capaz, con gran futuro a quien sabe que quiero un montón.

A mis amigos, que son tantos, quienes me ayudaron de alguna u otra manera, ya sea con su conocimiento, presencia, aliento constante o preocupación, ellos saben quiénes son, cuya amistad es tan valiosa, soy afortunada de tenerlos.

A la Veterinaria AMA, mi jefe Adrián, las doctoras Windy y Jenny, a Katya y Jaimito, porque de alguna u otra manera me dieron el tiempo necesario para lograr mi tesis.

INDICE

INDICE	i
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ANEXOS	ix
INTRODUCCIÓN	x
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
II.1 Cuy (<i>Cavia porcellus</i>)	1
II.1.1 Generalidades	1
II.2 Microbiota en Animales de Abasto	3
II.2.1 Microbiota Indígena en Animales de Abasto.	3
II.2.2 Especies Microbianas Predominantes en Animales de Abasto.	5
II.3 Probióticos	6
II.3.1 Criterios de Selección de los Probióticos.	7
II.4 Métodos de Identificación Microbiana	8
II.4.1 Métodos Microbiológicos Convencionales	8
II.4.1.1 Medios de Cultivo Sólidos.....	8
II.4.1.2 Tinción de Gram.....	9
II.4.2 Métodos Moleculares.	10

II.4.2.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	10
II.4.2.2 Electroforesis.....	15
II.4.2.3 Secuenciamiento.....	17
II.5 RNAr 16S.....	19
III MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
IV RESULTADOS.....	30
V DISCUSIÓN.....	37
VI CONCLUSIONES.....	44
VII RECOMENDACIONES.....	45
VIII ANEXOS.....	46
IX BIBLIOGRAFÍA.....	53

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue aislar e identificar por técnicas moleculares cepas bacterianas pertenecientes a géneros con potencial aplicación probiótica presentes en el intestino de cuyes (*Cavia porcellus*), como futura posible alternativa al uso de antibióticos. Para ello, se utilizaron 13 cuyes, diez de ellos neonatos de 2 a 6 días de edad y tres adultos de 2 meses de edad, se les extrajo el intestino de cada uno de ellos y se tomaron muestras raspando la mucosa intestinal, éstas se sembraron en diferentes medios de cultivo sólido con la finalidad de lograr aislar colonias con características fenotípicas de géneros bacterianos de conocido potencial probiótico (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*). Se identificaron las 27 cepas más representativas por medio de la amplificación, secuenciamiento y análisis bioinformático del gen 16S RNAr. Las secuencias de DNA fueron comparadas con tres diferentes bases de datos: Blast server for bacterial identification, Ribosomal database Project, BIBI database para identificar género. Resultó que el 85.18% (23) de las bacterias identificadas pertenecieron a los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Bacillus*; el 14.81% (4) restante identificó géneros bacterianos gran positivos que no son objetivo de éste estudio, pero que, sin embargo, contribuyen con la identificación de la microbiota intestinal del cuy; se halló, *Staphylococcus*. Finalmente, se llegó al objetivo en cuestión; la identificación de géneros bacterianos con probable potencial probiótico. Se sugiere evaluar; en investigaciones posteriores; el potencial probiótico de dichos géneros bacterianos.

Palabras clave: Cuy, potencial probiótico, PCR, identificación.

ABSTRACT

The objective of this study was to isolate and identify bacterial strains by molecular techniques belonging to genera with potential for probiotics in the intestine of guinea pigs (*Cavia porcellus*) as possible future alternative to antibiotics. To do this, we used 13 guinea pigs, ten infants from 2 to 6 days old and three adults from 2 months old, the intestine was extracted from each sample were taken by scraping the intestinal mucosa, they were planted in different culture media in order to achieve isolated colonies with phenotypic characteristics of bacterial species of known potential probiotic (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*). We identified 27 representative strains by amplification, sequencing and bioinformatic analysis of 16S rRNA gene. DNA sequences were compared with three different databases: Blast server for bacterial identification, Ribosomal Database Project, BIBI database to identify the genus. It turned out that 85.18% (23) obtain *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* and *Bacillus*, the 14.81% (4) remaining bacterial species gram positive identified that are not objective of this study, but that however, contribute to the identification of guinea pig intestinal microbiota, was found *Staphylococcus*. Finally, we reached the target in question, identification of probable bacterial genera with probiotic potential. It is suggested to evaluate, in subsequent research, the probiotic potential of these bacterial genera.

Keywords: Guinea pig, probiotic potential, PCR, identification.

LISTA DE ABREVIATURAS

A: Adenina.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ADNd: ADN doble cadena.

ARN: Ácido Ribonucleico.

bp: Pares de bases.

C: Citosina.

CCD: Charge coupled device.

dATP: Deoxiadenosina trifosfato.

dCTP: Deoxicitidina trifosfato.

ddNTPs: Dideoxynucleosidos trifosfatos.

dGTP: Deoxiguanidina trifosfato.

dTTP: Deoxitimidina trifosfato.

dNTPs: Deoxirribonucleosidos trifosfatos.

EDTA: Ácido etileno diamino tetraacético.

EtBr: Bromuro de etidio.

g/L: Gramos por litro.

Gram -: Bacterias con tinción gran negativa.

Gram +: Bacterias con tinción gram positiva.

G: Guanina.

Ig A: Inmunoglobulina A.

INIA: Instituto Nacional de Investigación Agraria.

Kb: Kilo bases.

KDa: Kilo Dalton.

Mg²⁺: Ión magnesio.

mM: Milimolar.

ng: Nanogramos.

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa.

P: Ión fósforo.

Primer F: Primer de avance.

Primer R: Primer de reversa.

RNAr 16S: Ácido Ribonucleico ribosomal, subunidad 16 S.

rpm: Revoluciones por minuto.

T: Timina.

TAE: Tris acetato EDTA.

TBE: Tris borato EDTA.

Tm: Temperatura de fusión.

UFC/g: Unidades formadoras de colonias por gramo.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Rango óptimo de separación en geles de agarosa.

Tabla 2: Migración del colorante marcador en geles de agarosa.

Tabla 3: Composición de las distintas soluciones tampón de carga.

Tabla 4: Identificación de los animales de la Estación Experimental IVITA – Huancayo usados en el estudio.

Tabla 5: Condiciones de la PCR para un volumen final de 20 ul.

Tabla 6: Calibración del Termociclador.

Tabla 7 / Grupo 1: Existencia y cantidad de colonias con probables características probióticas, aisladas en los diferentes medios de cultivo sólido a partir del intestino de 5 cuyes neonatos.

Tabla 8 / Grupo 2: Existencia y cantidad de colonias con probables características probióticas, aisladas en los diferentes medios de cultivo sólido a partir del intestino de 5 cuyes neonatos.

Tabla 9 / Grupo 3: Existencia y cantidad de colonias con probables características probióticas, aisladas en los diferentes medios de cultivo sólido a partir del intestino de 3 cuyes de dos meses de edad.

Tabla 10: Tabla resumen de todos los géneros con sus respectivas especies identificadas en cada tracto del tubo digestivo para las diferentes edades de cuyes.

Tabla 11: Relación de bacterias identificadas con probable potencial probiótico. (objetivo del estudio).

Tabla 12: Identificación de la microflora intestinal según 3 diferentes bases de datos utilizadas a partir de cuyes neonatos del grupo 1.

Tabla 13: Identificación de la microflora intestinal según 3 diferentes bases de datos utilizadas a partir de cuyes neonatos del grupo 2.

Tabla 14: Identificación de la microflora intestinal según 3 diferentes bases de datos utilizadas a partir de cuyes de 2 meses del grupo 3.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquematización de las etapas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Figura 2: Escala de secuencia mediante secuenciación radiactiva comparada con máximos de fluorescencia.

Figura 3 : Morfología de las Colonias en Placa.

Figura 4: Electroforesis de ADN de microbiota intestinal de cobayo visualizada por luz ultravioleta.

LISTA DE ANEXOS

Tabla 1: Rango óptimo de separación en geles de agarosa.

Tabla 2: Migración del colorante marcador en geles de agarosa.

Tabla 3: Composición de las distintas soluciones tampón de carga.

Kit: promega wizard genomic adn isolation / Protocolo de extracción modificado.

Tabla 12: Identificación de la microflora intestinal según 3 diferentes bases de datos utilizadas a partir de cuyes neonatos del grupo 1.

Tabla 13: Identificación de la microflora intestinal según 3 diferentes bases de datos utilizadas a partir de cuyes neonatos del grupo 2.

Tabla 14: Identificación de la microflora intestinal según 3 diferentes bases de datos utilizadas a partir de cuyes de 2 meses del grupo 3.

I INTRODUCCIÓN

La crianza del cuy en los últimos años está teniendo gran auge tanto a nivel interno como externo debido al mayor consumo de su carne, gracias a su alto valor nutricional y palatabilidad, éste auge involucra pasar de una crianza casera a una intensiva; implicando el uso de nuevas técnicas de alimentación, la limitación de las crías al contacto materno, el hacinamiento masivo, entre otros; éstas extremas condiciones favorecen el estrés en los animales produciendo desbalances en su microbiota intestinal debilitando de ésta manera la barrera natural intestinal contra microorganismos patógenos y con ello desencadenando desórdenes digestivos y enfermedades (Rosmini, 2004).

La presencia de enfermedades y su prevención conllevan al uso de antibióticos, sin embargo; su uso indiscriminado produce la aparición de cepas bacterianas resistentes, proceso que se potencializa por la capacidad de transferir resistencia entre bacterias incluso de diferente género y especie, si bien éstas terapias controlan los microorganismos patógenos, también afectan a muchos microorganismos benéficos produciendo trastornos en el equilibrio de la microbiota intestinal y modificaciones en el tejido del intestino delgado. Muchos de éstos antibióticos pueden quedar como residuos en los tejidos animales (Fuller, 1997).

Éstas desventajas han estimulado el interés por el uso de aditivos alimentarios naturales y terapias alternativas no medicamentosas en reemplazo de los antibióticos, entre los cuales destaca el uso de probióticos que son un suplemento alimenticio microbiano vivo que en adecuadas cantidades afecta benéficamente al animal hospedero fomentando su balance microbiano intestinal, promoviendo la síntesis de vitaminas , degradando componentes alimenticios, produciendo ácidos grasos de cadena corta y sus derivados como acetato, butirato, propionato, además de tener un efecto barrera que aumenta la resistencia a la colonización por bacterias exógenas y desarrollar el sistema inmunológico del hospedero (Rosmini,2004).

Tradicionalmente la microbiota ha sido estudiada mediante técnicas basadas en el cultivo, lo cual requería una intensa labor e información sobre requerimientos nutricionales y de crecimiento. En la microbiota intestinal puede haber más de 40 géneros microbianos y cientos de especies, lo que origina que los métodos clásicos sean insuficientes, siendo sus principales desventajas la baja sensibilidad, imposibilidad de detectar microorganismos no cultivables y/o especies desconocidas, largo tiempo requerido y bajos niveles de reproducibilidad.

Recientemente estos métodos han sido sustituidos por técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) principalmente el análisis del gen 16S rRNA (Zootendal, 2004). Esta técnica permite identificar, tipificar y establecer relaciones filogenéticas de los

microorganismos con una alta probabilidad (Zootendal, 2004). La caracterización molecular de la microbiota ya se está realizando con éxito en diferentes especies domesticas como perros, conejos, cerdos entre otras, lamentablemente, en el caso del cuy, no se cuenta con información sobre la microbiota indígena, ni mucho menos una caracterización de la misma, siendo un requerimiento primordial para la identificación de potenciales bacterias para uso como probióticos; por ello; el objetivo del presente trabajo es aislar e identificar cepas bacterianas pertenecientes a géneros con potencial aplicación probiótica presentes en intestinos de cuyes.

II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1 CUY (*Cavia porcellus*)

II.1.1 GENERALIDADES

El cuy (*Cavia porcellus*), llamado también cobayo o curí, es un mamífero roedor originario de la zona andina de Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú. Según Joseph y Patrick (1976), lo clasifican taxonómicamente de la siguiente manera:

REYNO:	Animalia
ORDEN:	Rodentia
SUB ORDEN:	Hystricomorpha
FAMILIA:	<i>Caviidae</i>
GÉNERO:	<i>Cavia</i>
ESPECIE:	<i>Cavia porcellus</i>

Es una especie herbívora monogástrica, de ciclo reproductivo corto, de fácil adaptación a diferentes ecosistemas y de alimentación versátil ya que utiliza insumos no competitivos con la alimentación de otros monogástricos, utiliza forrajes de buena calidad y también toscos (Chauca, 1997). Al igual que otras especies domésticas, el cuy requiere agua, aminoácidos, energía, ácidos grasos esenciales, minerales y vitaminas, todas éstas necesidades dependen cuantitativamente de la edad, genotipo, estado fisiológico y medio ambiente al que están sujetos los animales (Chauca, 1997).

Su aparato digestivo consta de un esófago, estómago, intestino delgado (de 120 cm de largo para un cuy de 23 cm de largo aproximadamente, que incluye al duodeno, yeyuno e ileon), intestino grueso (que es el 65% del intestino delgado e incluye al ciego, colon mayor y colon menor). El ciego constituye el 15% del peso total (Joseph y col, 1976).

Está clasificado según su anatomía gastrointestinal como fermentador post – gástrico debido a los microorganismos que posee a nivel del ciego, la ingesta llega al estómago donde realiza su digestión enzimática, luego pasa al intestino delgado y en dos horas aproximadamente la ingesta llega al ciego donde realiza la digestión bacteriana pudiendo demorar 48 horas dicha

fermentación, tanto en el ciego como en el resto del intestino grueso, se absorben ácidos grasos de cadena corta, los ácidos grasos de cadena larga se absorben en el estómago e intestino delgado (Joseph y col, 1976).

Otra de las características de los cuyes es su conducta coprófaga, consiste en la reingestión de sus propias heces tomadas directamente desde el ano, la cual tiene una función digestiva (Joseph y col, 1976). Se producen dos tipos de heces; las duras y blandas, las heces blandas se originan de los materiales de fermentación en el ciego, el cual es rico en vitaminas y proteínas microbianas, las heces blandas son ingeridas en la excreción directamente desde el ano, por tanto, no son expuestos al medio ambiente (Chauca, 1997). Joseph y col (1976) sugiere que la reingestión de heces blandas es imperativa y obligatoria mientras que el de heces duras es sólo facultativo si las circunstancias lo permiten.

La alimentación es uno de los factores de mayor importancia en el proceso productivo y es la base para el éxito de la crianza del cuy, representa más del 50% de los costos totales de producción en cualquier actividad pecuaria. Por esto, variaciones en los costos de alimentación repercuten fuertemente en los costos totales, pudiendo significar el éxito o fracaso de una empresa (INIA, 1994).

Aún es insuficiente la información referente a los requerimientos nutritivos de los cuyes productores de carne en sus diferentes estadios fisiológicos, siendo éste conocimiento esencial para lograr el eficiente crecimiento, mantenimiento y producción de éstos animales (INIA, 1994).

A través de los años se ha apreciado un creciente interés en desarrollar investigaciones en cuyes. Esto indudablemente obedece a la importancia que va tomando esta especie y al reconocimiento de la misma como una alternativa de producir carne. Se busca crear una especie precoz, prolífica, de conformación cárnica, eficiente convertidora de alimentos, rústica, entre otras ventajas productivas (INIA; 1994).

II.2 MICROBIOTA EN ANIMALES DE ABASTO.

II.2.1 MICROBIOTA INDÍGENA EN ANIMALES DE ABASTO.

En el organismo animal sano las superficies externas e internas están recubiertas por microorganismos que constituyen su microbiota natural (Rosmini, 2004). Se considera que el neonato es estéril durante la vida intrauterina, comenzando la colonización del tubo digestivo a las pocas horas del nacimiento a partir de la microbiota de la vagina, del intestino y la piel de la madre, así como del ambiente en general (Salminen y col., 1999).

Un gran número de las bacterias que migran de estas fuentes sobreviven y se desarrollan en el tracto gastrointestinal; sin embargo, una gran proporción de esta microbiota colonizadora no sobrevive ya que no resiste la presencia de antimicrobianos naturalmente presentes, ni a los movimientos peristálticos (Tannock, 1995). Para poder colonizar, la bacteria necesita adherirse a la pared intestinal o desarrollarse más rápido que la velocidad del peristaltismo (Tannock, 1995).

Una vez establecida, la microbiota gastrointestinal normal está compuesta por dos grupos: la microbiota indígena y la microbiota transitoria (Donald, 2000). La microbiota indígena de una determinada especie animal está constituida por microorganismos que habitan en todos los integrantes de esa comunidad, en el caso de animales de abasto, es la microbiota presente en los animales de un hato o región geográfica (Rosmini, 2004). Ésta microbiota está siempre presente en los individuos adultos, crece en anaerobiosis en el tracto gastrointestinal colonizando nichos determinados, está asociada íntimamente al epitelio de la mucosa y es capaz de mantener estable al ecosistema gastrointestinal (Rosmini, 2004). La microbiota indígena es la que mayor impacto tiene cuando se caracteriza a su ecosistema (Donald, 2000; Rosmini, 2004).

La microbiota transitoria está formada por microorganismos no siempre presentes en todos los individuos de la comunidad; en general proviene del agua, los alimentos y de otras partes del cuerpo, pero utilizan el tracto gastrointestinal solo en forma temporal (Raibaud, 1992; Rosmini, 2004).

Al colonizarse el tracto gastrointestinal de los animales, este se protege en forma natural por la microbiota indígena que lo coloniza a partir del momento de su nacimiento, se adapta al ambiente y dificulta la colonización del lumen por otros microorganismos, en especial por patógenos (Vaughan y col., 1999).

Se transforma entonces en un ecosistema complejo formado por elementos bióticos tales como microorganismos indígenas, transitorios, células del epitelio intestinal y constituyentes de la dieta o componentes abióticos; tales como la saliva, las secreciones o excreciones de los diferentes órganos del tubo digestivo, las enzimas, las hormonas, entre otros (Donald, 2000). El equilibrio de este ecosistema depende en gran medida de la microbiota intestinal indígena, muy estable en individuos adultos sanos y esenciales para el mantenimiento de la salud del hospedero (Pascual y col., 1996; Rosmini, 2004).

Cuando los animales se desarrollan en sistemas de producción tanto extensivos como en forma silvestre, la colonización del aparato digestivo ocurre en forma espontánea adquiriendo la microbiota del entorno que lo rodea (Schneider y col., 2000). En un animal sano cada porción del intestino es colonizada por una microbiota típica, la cual se adapta y desarrolla en una simbiosis benéfica con el hospedero (Schneider y col., 2000). Por el contrario, en las crianzas artificiales, en especial cuando las crías son separadas de sus madres y alojadas en sistemas intensivos, la posibilidad de adquirir la microbiota autóctona natural es fuertemente disminuida, dando como resultado que el intestino sea fácilmente colonizado por patógenos (Schneider y col., 2000).

Desde el punto de vista de su relación con el hospedero, la microbiota intestinal se puede agrupar en microorganismos benéficos, neutrales o peligrosos teniendo un efecto importante sobre la estructura, función y el metabolismo del intestino. Los patógenos ocasionan condiciones nocivas mientras que las especies neutrales inducen daños menores, como diarreas, cuando están presentes en un elevado número y son dominantes (Kontula, 1999; Rosmini, 2004).

Los microorganismos benéficos promueven síntesis de vitaminas, degradación de componentes alimenticios y producción de ácidos grasos de cadena corta y sus derivados, tales como acetatos, propionatos y butiratos además de tener un efecto de barrera que aumenta la resistencia a la colonización por bacterias exógenas y por consiguiente prevenir enfermedades intestinales, además de desarrollar el sistema inmunológico del hospedero (Rosmini, 2004).

II.2.2 ESPECIES MICROBIANAS PREDOMINANTES EN ANIMALES DE ABASTO.

Los microorganismos que predominan en el contenido intestinal son anaerobios obligados o facultativos como bacterias, eubacterias, peptococos, lactobacilos y bifidobacterias, en segundo lugar en abundancia se encuentran estreptococos y colibacterias (Pascual y col., 1996). La microbiota incluye organismos sacarolíticos y proteolíticos (Pascual y col., 1996). Cerca del 90 % de la microbiota intestinal que coloniza el tubo digestivo es permanente, el 10% restante es transitoria (Pascual y col., 1996).

Es importante hacer notar que cada especie animal presenta una composición microbiana intestinal distinta y específica, además de que la densidad de ésta varía en las diferentes zonas del tubo digestivo (Rodríguez, 1994). Si se consideran solamente las regiones anatómicas, el duodeno es la zona de menor contenido, no más de 10^4 UFC/g, seguido por el yeyuno, el estómago y la boca. En forma contraria, el ileon, ciego y recto son las zonas con mayor contenido, superior a 10^{11} UFC/g (Bengmarck, 1998).

Con relación a la especie animal, mientras que en los pollos la especie dominante en el intestino y ciego es *Lactobacillus salivarius*, en los patos predominan cinco géneros diferentes: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Weisella* (Pascual y col., 1996). Del tubo digestivo de terneros criados en condiciones artificiales se han aislado en mayores cantidades *Pediococcus acidolactis*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus reuteri*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus casei*, con excepción de *L. farciminis*, estos microorganismos han sido reportados en otras especies animales (Rosmini, 2004).

Cuando se inicia el proceso de recuperación de la microbiota indígena con el fin de producir probióticos a nivel industrial, la población microbiana recuperada es de importancia ya que a mayor número de microorganismos obtenidos, mayor será la probabilidad de obtener los de actividad probiótica significativa para el hospedero (Rosmini, 2004). La metodología utilizada para recuperar los microorganismos a partir de las diferentes estructuras anatómicas puede ser determinante del número de microorganismos recuperados (Rosmini, 2004). El número de bacteria ácido lácticas encontradas en el buche de los patos oscila alrededor de 5.6×10^4 UFC/g, cuando las muestras son obtenidas mediante el lavado de la superficie de la mucosa y 1.1×10^5 UFC/g, cuando dicha superficie es raspada, ésto evidencia la capacidad de adherencia de algunos microorganismos que habitan en el tubo digestivo (Rosmini, 2004).

II.3 PROBIÓTICOS.

Se describían a los probióticos como el suplemento alimenticio microbiano vivo que afecta benéficamente al animal hospedero fomentando su balance microbiano intestinal (Fuller, 1989), actualmente el concepto se ha redefinido como cultivos de uno o varios microorganismos vivos que, cuando son suministrados al hombre o a los animales afectan benéficamente al hospedero desarrollando las propiedades de la microbiota indígena (Rosmini, 2004).

Los trastornos digestivos son frecuentes a temprana edad debido al estrés que sufren sobre todo en el destete, por lo que, en éstas circunstancias, es preferible administrar bacterias benéficas; como los *Lactobacilli*; a utilizar antibióticos que destruyen las bacterias tanto beneficiosas como patógenas generando desequilibrio en la microbiota del hospedero (Donald, 2000).

Las bacterias probióticas ejercen sus efectos por alguno de los siguientes mecanismos:

- Adherirse a las paredes del tracto digestivo para evitar la colonización por microorganismos patógenos. Las bacterias perjudiciales como *E. coli*, se unen a la pared intestinal mediante estructuras pilosas llamadas fimbriae que están constituidas por proteínas llamadas lectinas, que reconocen y se combinan selectivamente con centros receptores de oligosacáridos específicos de la pared intestinal. Los *Lactobacilli* (bacteria probiótica) compiten con éxito por dichos centros de unión (Donald, 2000).

- La neutralización de las enterotoxinas producidas por bacterias patógenas que determinan la pérdida de líquidos. Existen ciertas pruebas de que las bacterias probióticas vivas pueden neutralizar dichas toxinas, aunque todavía no se ha identificado la sustancia activa (Donald, 2000).

- Actividad bactericida: Los *Lactobacilli* fermentan la lactosa hasta ácido láctico, con lo que se rebaja el pH hasta un nivel que las bacterias patógenas no pueden tolerar. Además, se produce peróxido de hidrógeno que inhibe la multiplicación de las bacterias Gram negativas. Así mismo, se ha publicado que las bacterias productoras de ácido láctico de las especies *Streptococcus* y *Lactobacillus* producen antibacterianos específicos como las bacteriocinas (nisina y pediocinas) (Donald, 2000).

- Impiden la síntesis de aminas: las bacterias coliformes decarboxilan aminoácidos para producir aminas que irritan el intestino, son tóxicas y son coincidentes con la presentación de diarreas. Si las bacterias beneficiosas impiden la proliferación de coliformes, también se impedirá la producción de aminas (Rosmini, 2004).

- Mejor competencia inmune: la inoculación oral de *Lactobacilli* a los lechones ha incrementado la proteína del suero y el recuento de leucocitos en sangre. Ello puede mejorar el desarrollo del sistema inmune al estimular la producción de anticuerpos y una mayor actividad fagocitaria (Donald, 2000). Según Rosmini (2004), la exclusión de antígenos ha sido asociada con la capacidad de la mucosa intestinal para producir moco e IgA secretoria; algunos lactobacilos tienen la capacidad de aumentar el número de células inmunes productoras de IgA asociadas al intestino así como el número de macrófagos, neutrófilos y eosinófilos relacionados con una respuesta inmune inflamatoria.

Otros efectos que se han indicado son la beneficiosa interacción con las sales biliares, la mayor producción de enzimas digestivas y una más eficiente absorción de nutrientes, con mayor producción de vitaminas.

Según Donald (2000) la administración de probióticos a lechones en los que continúa el desarrollo del tracto digestivo después del destete es efectivo; sin embargo, son menos efectivos para los cerdos en crecimiento y acabado, que ya disponen de una población equilibrada de microorganismos.

El conocimiento de que el uso de probióticos puede sustituir las terapias con antibióticos con métodos menos agresivos ha dado como resultado una nueva visión en la industria farmacéutica al contemplar una tecnología global, desde el aislamiento de probióticos de ecosistemas específicos tales como un hato o región geográfica, seleccionar y caracterizar a las bacterias responsables de la acción probiótica, producirlas a escala industrial, procesarlas y reintroducirlas a la dieta del animal (Rosmini, 2004).

II.3.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS

Se reconocen dos principios básicos cuando se seleccionan cepas bacterianas: la especificidad del hospedero, el cual indica que las mejores cepas son las que provienen de especies semejantes; y la proximidad del ecosistema que reconoce la importancia que el microorganismo sea utilizado en el mismo lugar donde actúa en el huésped (Gibson, 1995; Rosmini, 2004).

Para ser considerado un buen probiótico, una cepa microbiana debe poseer varias propiedades: ejercer un efecto benéfico en el hospedador, resistentes a los ácidos biliares, capacidad de adhesión a las superficies de la mucosa, seguridad para su uso como alimento,

inhibir la actividad patogénica, ausencia de patogenicidad o toxicidad, viables y estables en las condiciones de producción y almacenamiento industrial (Donald, 2000; Havenaar y col, 1992).

II.4 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN MICROBIANA.

Se entiende por identificación microbiana al conjunto de técnicas y procedimientos que se aplican para establecer la identidad de un microorganismo. Estas técnicas se utilizan en diferentes áreas; por ejemplo: en la identificación básica donde se aísla un determinado microorganismo que debe identificarse para comprobar si se trata de un microorganismo conocido o de uno nuevo para poder clasificarlo.

II.4.1 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS CONVENCIONALES.

II.4.1.1 MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO

Un cultivo es un método utilizado en microbiología para la multiplicación de microorganismos tales como: bacterias, hongos, parásitos, en el que se prepara un medio artificial óptimo para favorecer el proceso deseado (Madigan y col. , 2005).

Los medios de cultivo contienen distintos nutrientes y diversas condiciones ambientales que son variables para cada tipo de microorganismo (Schelegel, 1997). El crecimiento de microorganismos va ligado a la presencia de agua y a las sustancias disueltas en el agua, a partir de las cuales los microorganismos forman su material celular y obtienen energía (Schelegel, 1997). Se reconocen 11 macroelementos esenciales para el crecimiento celular, entre los cuales están el carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo, potasio, sodio, calcio, magnesio, hierro; contenidos en todos los microorganismos y los oligoelementos o microelementos: manganeso, molibdeno, zinc, cobre, níquel, vanadio, boro, cloro, selenio, silicio, wolframio, etc, los cuales no son necesarios en todos los microorganismos; otro de los componentes también son los metales pesados que forman parte de las enzimas (Schelegel, 1997). Éstos elementos se añaden a los medios de cultivo dependiendo del medio que se desee preparar (Schelegel, 1997).

Para obtener un medio de cultivo sólido se añade a los caldos de cultivo una sustancia solidificante llamada agar, el cual es un polisacárido extraído de algas marinas, intensamente ramificado y entrelazado, se añade a las composiciones acuosas en una concentración de 15 a 20 g/L (Madigan y col. , 2005).

La utilización de los diferentes medios de cultivo varía según el propósito y tipo de microorganismo que se desee aislar, para su posterior identificación se utilizan diversos métodos como son el estudio de su morfología, reacciones frente a diversos colorantes, reacciones bioquímicas o con la ayuda de métodos moleculares (Jawetz y col., 2002).

II.4.1.2 TINCIÓN DE GRAM.

La tinción de GRAM, es una tinción diferencial que permite la clasificación de las bacterias en base a su forma, tamaño, morfología celular y reacción GRAM (color), de acuerdo a la reacción gram, las bacterias se clasifica en dos grupos: gram + y gram – (Schlegel, 1997).

El distinto comportamiento en la tinción se debe a las diferentes capas superficiales o paredes de los dos tipos de bacterias (Schlegel, 1997).

En el proceso de tinción se emplean 4 tipos de soluciones (Schlegel, 1997):

- El cristal violeta que es un colorante básico.
- Lugol, que sirve para potenciar o reforzar la acción del cristal violeta.
- Alcohol, que sirve para decolorar las células que están teñidas.
- Solución de contraste (fucsina, safranina) que es la que va diferenciar el color final.

Los microorganismos no se decoloran fácilmente sino que retienen el color del colorante inicial (básico), las células que retienen este colorante básico inicial, son las que se van a quedar teñidas de color violeta, mientras que las demás van a quedar de color rojizo (Prescott, 1999).

Esto se debe a la diferencia en su pared celular, básicamente hay dos causas de diferencia: la cantidad de fosfolípidos que tienen las gram -, el cual es mayor que el de las gram +, y por otro lado, los peptidoglucanos, que es mayor en las gram + que en las gram - (Prescott, 1999).

El alcohol en las gram – va a extraer los lípidos de la pared con lo cual aumentan los poros de esa pared y sale el colorante de cristal violeta. En las gram +, que tienen menos lípidos,

ocurre una deshidratación de la pared y por lo tanto disminuyen los poros de la pared, entonces no sale el cristal violeta (Prescott, 1999).

La fucsina es un colorante de contraste, las gram – van a quedar teñidas de color rojo o rojizo y las gram + quedarán de color azul (violeta) (Prescott, 1999).

Las gram -, tienen una gran cantidad de lípidos en su pared, el alcohol los extrae, origina grandes poros en su pared y a través de ellos el complejo cristal violeta – yodo, puede salir permitiendo que su lugar sea ocupado por el colorante fucsina, tomando por tanto un color entre rojo y rosado (Schlegel, 1997).

En las gram +, al actuar el alcohol se produce deshidratación y los poros de la pared disminuyen, el complejo cristal violeta – yodo no puede salir y las células quedan teñidas de color púrpura – violeta (Schlegel, 1997).

II.4.2 MÉTODOS MOLECULARES.

II.4.2.1 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Concepto: La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), es una técnica utilizada para amplificar *in vitro* secuencias específicas de ácidos nucleicos a partir de cantidades muy pequeñas como extractos o células únicas hasta niveles fácilmente detectables (Cooper, 2000). Ésta técnica es muy sensible y específica debido a que se utilizan oligonucleótidos cebadores que hibridan con secuencias complementarias del molde de ADN (Cooper, 2000). Por tanto, la PCR puede amplificar de modo selectivo una molécula de ADN específica a partir de una mezcla compleja, como el ADN o el ARN celular total (Cooper, 2000).

La PCR es una replicación *in vitro* que utiliza componentes similares a los de replicación *in vivo*, los cuales se mezclan apropiadamente y se incuban en un termociclador a temperaturas pre programadas (Hays y col. , 2008).

Componentes de la PCR: Se compone de los siguientes elementos:

a.ADN polimerasa: se utiliza una ADN polimerasa termoestable como la *Taq* polimerasa, la cual amplifica el ADN *in vitro*, ésta es una ADN polimerasa tipo I, aislada del *Thermus aquaticus*, una eubacteria que se desarrolla a altas temperaturas, tiene una óptima temperatura de trabajo de 75 a 80°C, una de sus desventajas es que carece de actividad de corrección (proofreading) y va perdiendo gradualmente su actividad conforme pasan los ciclos en la PCR (Madigan y col. , 2005).

b.Oligonucleótidos (primers o cebadores): los primers son secuencias de ADN de usualmente 18 a 20 pares de bases de largo y representan una exacta secuencia de ADN que flanquea el fragmento de ADN buscado o de interés (Hays y col. , 2008). La frecuencia aproximada de una particular secuencia está representada por 4^n , donde n es la longitud de la secuencia del primer. La razón de ésta frecuencia es debido a que justo son cuatro posibles nucleótidos en cualquier lugar del ADN, por lo tanto, por cada locus hay una posibilidad de 4^n de encontrar (Hays y col. , 2008).

La longitud del cebador especifica la reacción; es decir; cuanto más grande sea el cebador, más específica será la reacción, el tamaño de elección del cebador va de la mano con el tamaño del DNA molde, si el primer es demasiado grande, la posibilidad de encontrar una zona de alineamiento al azar es menor; por tanto; en ese caso se sugiere dar mayor tiempo de alineamiento de tal manera que el cebador encuentre su zona complementaria al azar, en la práctica, el tamaño usual del cebador es de 15 a 20 nucleótidos (Koolman y col. ,2005).

Otro punto crítico es la secuencia del primer, debido a que son secuencias de simple hebra, cabe la posibilidad de alinear sobre sí mismos si es que presentan secuencias complementarias, formando un look u horquilla, no estando disponibles para la PCR, de igual manera, si los primers son complementarios, se alinearán entre ellos formando un dímero de primer indisponiéndolos para la reacción (Hays y col. , 2008; Koolman y col. ,2005).

El extremo crítico en la secuencia de un primer es el extremo 3¹, a partir de ese extremo se inicia su alineamiento con el DNA molde y la polimerasa inicia su extensión, si ese extremo no está bien alineado la polimerasa no podrá extender la cadena y no se obtendrán productos de PCR (Hays y col. , 2008).

c.Deoxiribonucleósidos trifosfatos (dNTP_s): dATP, dCTP, dTTP, dGTP, al incorporarse, éstos deben tener una concentración equimolar la cual dependerá del largo de la cadena a amplificar (Hays y col. , 2008).

d.ADN molde: el ADN blanco es definido por los sitios de alineamiento de los primers, la distancia usual entre los sitios de alineamiento es de 100 bp hasta 40 Kb. El ADN blanco debe ser de buena calidad, sin presencia de sales y proteínas ya que podrían inhibir la posterior PCR (Hays y col. , 2008).

e.Iones de Magnesio: actúa como cofactor para la ADN polimerasa; por tanto debe utilizarse la cantidad adecuada, ésta se sabrá al realizar una curva de magnesio que aumente en pasos de 0.5 mM. A mayor ión Mg habrá mayor amplificación, pero el exceso de éste ión inducirá amplificaciones inespecíficas (Hays y col. , 2008). La disponibilidad de iones Mg^{2+} es también influenciada por la concentración de EDTA, siendo necesario incrementar la concentración de Mg^{2+} , si EDTA extra es adicionado en la PCR con el ADN molde (Wilson y col. , 1996).

f.Agua: es necesaria para la formación de los puentes de hidrógeno que se forman entre las bases nitrogenadas. El agua debe ser de alta pureza, libre de contaminantes, desionizado, tridestilado (Hays y col. , 2008).

g.Buffer de PCR (EDTA): favorece la eficiencia de la actividad de la ADN polimerasa, el rango ideal es entre 7.8 – 8 (Hays y col. , 2008).

Etapas de la PCR: Los pasos básicos son:

a.Desnaturalización : el ADN es desnaturalizado por calentamiento a $94^{\circ}C$, a ésta temperatura se logra romper los puentes de hidrógeno y obtener dos simples hebras de ADN (Thompson, 1994). Extensas incubaciones a esta temperatura pueden causar daño al ADN, debido a divisiones inducidas por agua a los puentes b – glicosídicos entre las bases purinas y los azúcares (desoxirribosa), conduciendo a la despurinización y luego a la división de la cadena de ADN (Thompson, 1994).

b.Alineamiento : un par de oligonucleótidos (primers o cebadores) son adicionados al ADN para permitir el alineamiento de los primers a sus zonas blanco, la temperatura baja entre 40 a $70^{\circ}C$ dependiendo de la secuencia del cebador (Koolman y col. ,2005). Idealmente la temperatura de alineamiento es de 2 a 4 $^{\circ}C$ debajo de la temperatura de fusión (T_m) del par de cebadores usados en la PCR. La temperatura de fusión puede ser hallada con la siguiente fórmula (Hays y col. , 2008):

$$T_m = 4(n^\circ G + n^\circ C) + 2(n^\circ A + n^\circ T)$$

Donde:

G = guanine

C = citosina

A = adenine

T = timina

Esta estimación no es enteramente certera y la actual T_m de un cebador puede ser baja o alta, especialmente si la secuencia incluye un número elevado de As o Ts (dando bajas T_m) o de Gs y Cs (dando elevadas T_m) (Hays y col. , 2008).

La temperatura de alineamiento de un nuevo par de cebadores puede ser optimizada por series de PCRs con temperaturas de alineamiento en rangos de 8°C debajo hasta 4°C encima de la T_m estimada, variando en incrementos de 2°C (Hays y col. , 2008).

c.Extensión : en ésta etapa la ADN polimerasa termoestables (Taq polimerasa) se une al complejo DNA molde – cebador e inicia la amplificación del DNA molde añadiendo los deoxinucleósidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) complementarios para las cadenas molde de ADN, éste proceso se realiza a una temperatura óptima de 72°C, a esta temperatura, la enzima polimerizará aproximadamente 6000 nucleótidos de ADN por minuto, una elevada temperatura no es usada porque se pone en riesgo que los cebadores se separen del ADN molde antes que hayan sido extendidos (Hays y col. , 2008).

Los ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión son repetidos de 25 a 30 veces, con un número de moléculas de ADN sintetizado que se dobla durante cada ciclo (2^n), esta exponencial amplificación resulta de la síntesis de un gran número de copias de la secuencia de ADN flanqueado por el par de oligonucleótidos (Koolman y col., 2005). Cada paso dura entre 15 a 30 segundos; pero; se da una desnaturalización inicial y extensión final de 5 minutos con la finalidad de permitir la desnaturalización y extensión completa de toda la cadena de DNA (Hays y col., 2008).

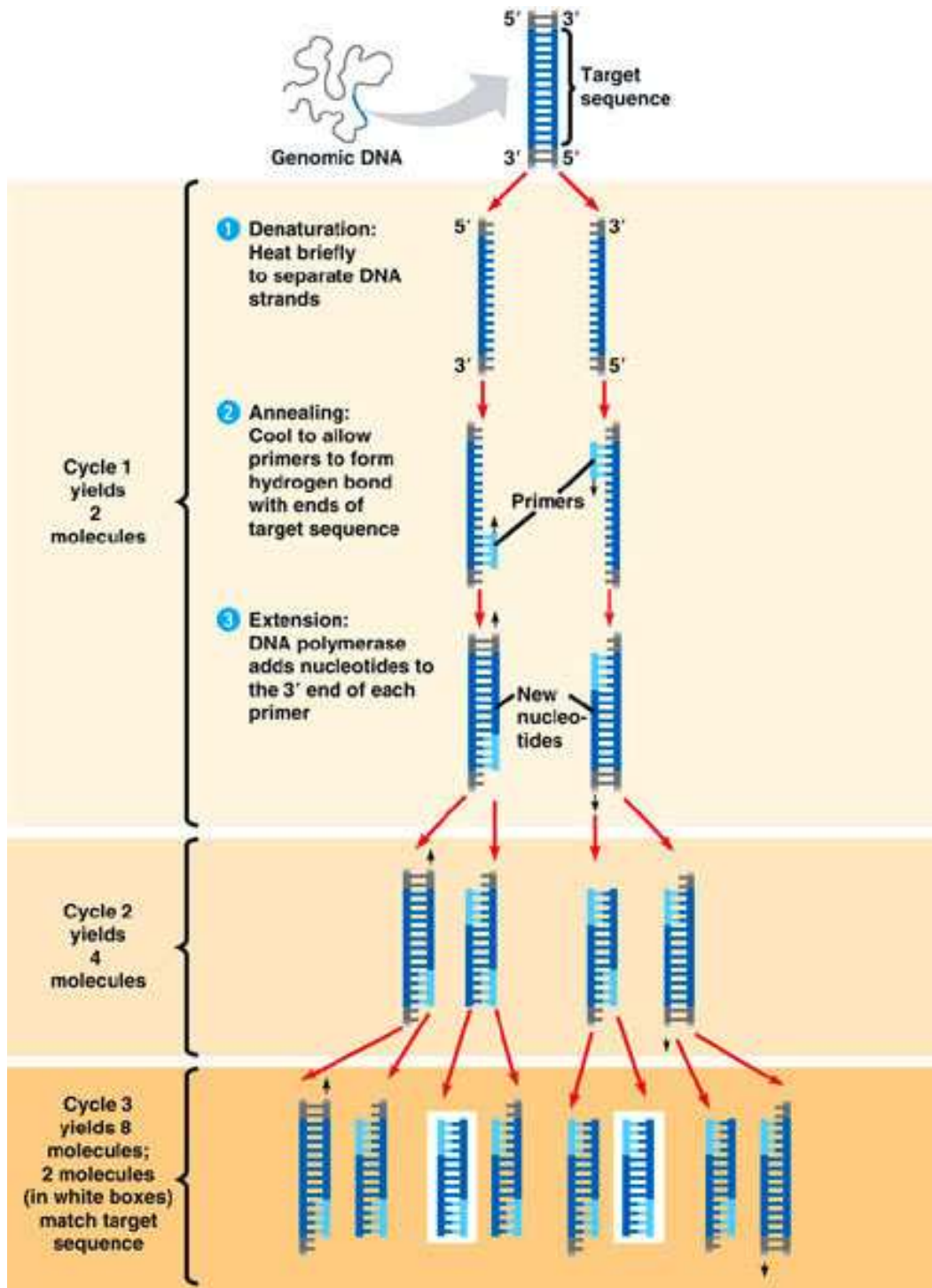


Figura 1: Esquematización de las etapas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa Fuente: Hays y col (2008).

II.4.2.2 ELECTROFORESIS DE ADN

Concepto: La electroforesis es definida como la migración de partículas (iones y macromoléculas) a través de un campo eléctrico debido a la presencia de carga, para prevenir disturbios mecánicos y de convección, durante la migración se utiliza un medio estabilizante como la agarosa o poliacrilamida, éstos medios también están influenciados por un campo eléctrico y actúan a manera de tamiz molecular (Gishy y col. , 1993).

El DNA está compuesto por cuatro nucleótidos que tienen carga negativa y peso molecular similar, en su estructura externa presenta al ión fosfato, por lo tanto, cuando dicho ácido nucleico es colocado en un campo eléctrico, éste migrará hacia el polo positivo (cátodo) (Wilson y col., 1996).

La velocidad de migración del DNA está determinada en primer lugar por la intensidad de atracción que es directamente proporcional a la carga y en segundo lugar por la fuerza de rozamiento que se opone a la migración y está determinada por la forma y tamaño de la partícula. En el caso del DNA, la forma es la misma para cualquier molécula entonces la velocidad dependerá del tamaño de cada molécula, es decir, de la longitud en pares de bases del DNA (Koolman y col. ,2005).

Electroforesis en geles de agarosa: Para realizar la electroforesis se utiliza un medio de migración adecuado, de modo que la separación sea eficiente, se necesita que exista suficiente fuerza de rozamiento para que las moléculas de distinto tamaño se separen, para ello se utiliza la agarosa que es un polímero orgánico derivado de un polisacárido de varias especies de algas marinas rojas de los géneros *Gelidium* y *Gracilaria*. La unidad básica de la agarosa es la agarobiosa, la cual forma largas cadenas de aproximadamente 400 unidades, con un promedio de masa molecular de 120 KDa (Gishy y col., 1993; Wilson y col., 1996).

Una de las propiedades de la agarosa es el promedio del tamaño de los poros que varía con la concentración, el tamaño comprende entre 100 – 300 nm, además la rapidez con la que migran las moléculas puede ser regulada por la concentración de agarosa disuelta en el buffer: a mayor concentración, mayor compactación de la red y por tanto menor velocidad de migración (Thompson, 1994).

Uno de los más importantes factores que contribuyen al éxito de la agarosa como un medio de anticonvección es su habilidad para exhibir alta solidez del gel a bajas concentraciones

(menores al 6%) (Hays y col., 2008). La resistencia del gel está definida como la fuerza expresada en g/cm^2 que es necesario aplicar para romper el gel (Hays y col., 2008).

Fundamento de la formación del gel: El mecanismo de gelificación de la agarosa es el resultado de un proceso físico, debido a un cambio en la conformación de sus moléculas (Madigan y col., 2005). La agarosa en su forma original está compuesta por un enrollado al azar de polisacáridos. Cuando se encuentra en solución, éstos rollos de polisacáridos adoptan una conformación helicoidal (forma de doble hélice) en etapas iniciales de gelificación y después debido a que cada molécula de polisacárido participa en la formación de una estructura de doble hélice, esto resulta en una masa enmarañada de moléculas (gel) con espacios entre las hélices que actúan a modo de poros. El tamaño de los poros no es particularmente regular, además, puede ser controlado variando la concentración de la agarosa en la solución (Koolman y col., 2005). Estos enlaces cruzados entre los polímeros de agarosa se realiza a través de puentes de hidrógeno (Madigan y col., 2005).

Las ventajas de la utilización de geles de agarosa es que forma macroporos los cuales permiten la rápida difusión de macromoléculas de alto peso molecular (1000 KDa), variando la concentración de la agarosa y/o la solución tampón es posible separar satisfactoriamente ADN doble cadena en un rango de tamaño de aproximadamente 20 bp a 50 kb, además la agarosa no es tóxica y es termorreversible (Hays y col., 2008; Madigan y col., 2005) (Ver en anexos, Tabla 1: Rango óptimo de separación en geles de agarosa).

Visualización de fragmentos: El bromuro de etidio (EtBr) es un tinte fluorescente el cual detecta ADN de simple y doble cadena, éste puede ser adicionado directamente al gel de agarosa en el momento de su preparación o puede usarse una solución de EtBr luego de la electroforesis para teñir el gel de agarosa (Koolman y col., 2008). El EtBr se intercala entre las bases del ADN resultando en un incremento en el campo de la fluorescencia, cuando el complejo ADN – EtBr absorbe luz en un rango de 300 a 350 nm y emite luz a 590 nm, siendo 300 nm la longitud de onda óptima para observar fluorescencia del complejo ADN – EtBr (Koolman y col., 2008).

Soluciones tampón de electroforesis: Hay dos tipos de buffers de corrida: Tris Borato EDTA (TBE) y Tris Acetato EDTA (TAE), en estos medios se prepara la agarosa a una determinada

concentración, estas soluciones le dan la propiedad a la matriz de ser conductor de corriente y permitir la migración del DNA. El ácido bórico es mejor conductor de corriente que el ácido acético, por ello el TBE es la solución tampón de elección (Hays y col., 2008).

Solución tampón de carga de muestra: La solución tampón de carga tiene tres propósitos principales en la electroforesis de ADN: incrementar la densidad de la muestra, adicionar color a la muestra y facilitar el monitoreo de la electroforesis (Wilson y col., 1996). La solución tampón de carga contiene colorantes que poseen un campo eléctrico, por lo cual se mueven hacia el ánodo en un rango predecible, es así, que el azul de bromofenol migra a través del gel de agarosa aproximadamente 2.2 veces más rápido que el xilene cianol FF, independientemente de la concentración del gel (Wilson y col., 1996). (Ver en anexos, Tabla 2: Migración del colorante marcador en geles de agarosa. Tabla 3: Composición de las distintas soluciones tampón de carga).

II.4.2.3 SECUENCIAMIENTO

Existen diferentes técnicas de secuenciación, pero la técnica más utilizada es la desarrollada por Frederick Sanger en 1970, la cual forma la base del “ciclo” automatizado de la reacción de secuenciación de hoy (Schelegel, 1997).

Para la secuenciación se agregan sustancias de tinción fluorescentes a las reacciones, y un láser dentro de una máquina secuenciadora de ADN automatizada se usa para analizar los fragmentos de ADN producidos (Schelegel, 1997).

El propósito de la secuenciación es determinar el orden de los nucleótidos de un gen, para lo cual se parte desde fragmentos de PCR o genes clonados (Schelegel, 1997).

Hay tres pasos en la reacción de secuenciación (como en la PCR) que son repetidos por 30 a 40 ciclos (Hays y col., 2008):

Desnaturalización a 94°C: Durante la desnaturalización, la doble cadena se funde abriéndose para dejar DNA de cadena simple (Hays y col., 2008).

Alineamiento a 50°C: Se usa sólo un primer, así se copia una sola cadena (en PCR se usan dos primers y dos cadenas son copiadas), se forman enlaces iónicos entre la cadena simple del

primer y la cadena plantilla simple. La polimerasa copia la plantilla generando una nueva cadena de DNA (Hays y col., 2008).

Extensión a 60°C: Normalmente es a 72°C, porque la polimerasa tiene que incorporar ddNTP^s (dideoxynucleótidos trifosfatos) que están químicamente modificados con un marcador fluorescente. Estos dideoxynucleótidos terminan la elongación de la cadena al carecer un grupo 3'-OH que se necesita para la formación del enlace_fosfodiéster entre dos nucleótidos durante la elongación de la cadena de ADN (Hays y col., 2008).

Después de la reacción de secuenciación, la mezcla de cadenas, todas de diferente longitud y todas terminadas en una marca fluorescente ddNTP tienen que ser separadas. Esto se hace en un gel de acrilamida, que es capaz de separar una molécula de 30 bases de una de 31 bases, y también una molécula de 750 bases de una de 751 bases (Rodocio y col., 2004).

Los fragmentos marcados fluorescentemente migran a través del gel y se pasan por un haz de láser, el láser excita la molécula fluorescente que despide luces de distinto color, ésta luz es captada y enfocada por lentes de un espectrógrafo el cual separa las luces a través de una cámara CCD (charge coupled device) (Rodocio y col., 2004). Cada base tiene su propio color, así el secuenciador puede detectar el orden de las bases en el gen secuenciado (Rodocio y col., 2004). Cuando todos los fragmentos son secuenciados, un programa de computadora ajusta apropiadamente las diferentes partes y reúne la secuencia del gen total (Rodocio y col., 2004).

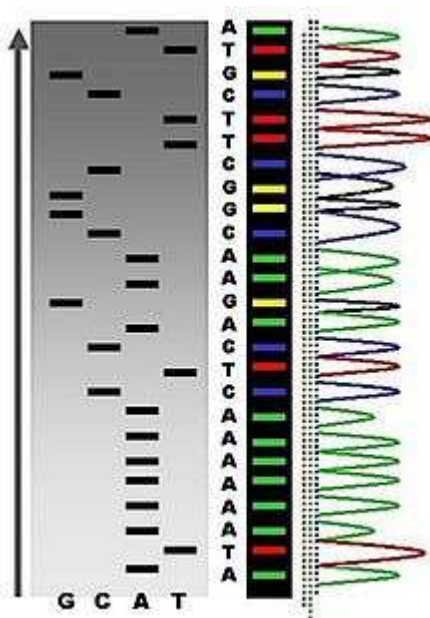


Figura 2: Escala de secuencias mediante secuenciación radiactiva comparada con máximos de fluorescencia. Fuente: Hays y col (2008).

II.5 ARNr 16S

Los ribosomas son los lugares de la síntesis protéica y se encuentran por tanto en todas las células (Schelegel, 1997; Rodicio y col., 2004; Rodriguez, 2009). Desde el punto de vista de su función son muy conservativos, esto es especialmente válido para los RNA ribosómicos (RNAr) ya que su secuencia de bases no está influida por la degeneración del código genético ni por mutaciones supresoras, el ARNr cumple por lo tanto las condiciones que debe tener un marcador filogenético general. Para ello se han aislado los ARNr 16S de las subunidades menores de los ribosomas de los organismos que se quieren comparar (Schelegel; 1997).

El ARNr 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 bp codificado por el gen rrs, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. En eucariotas el ARNr 18S es la macromolécula equivalente. Éstos polirribonucleótidos se encuentran altamente conservados, presentando regiones comunes a todos los organismos, pero contienen además variaciones que se concentran en zonas específicas (Rodicio y col., 2004)

El análisis de la secuencia de los ARNr 16S de distintos grupos filogenéticos presenta una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos firma, los cuales se tratan de secuencias específicas cortas que aparecen en todos o en la mayor parte de los miembros de un determinado grupo filogenético, nunca o sólo raramente están presentes en otros grupos, por ello los oligonucleótidos firma pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo (Rodicio y col. , 2004).

El ARNr 16S es considerado como cronómetro molecular definitivo debido a que:

- Es una molécula muy antigua presente en todas las bacterias actuales, constituyendo una diana universal para su identificación (Rodicio y col. , 2004).
- Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios (Rodicio y col. , 2004).
- Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información acerca de todos los procariotas (Rodicio y col. , 2004).
- El tamaño relativamente largo minimiza las fluctuaciones estadísticas (Rodicio y col. , 2004).

-Su secuencia permite la identificación de regiones de homología y heterogeneidad (Rodríguez, 2009).

-Su tasa de cambio de la secuencia está en correlación con la distancia evolutiva (Rodríguez, 2009).

Las técnicas moleculares basadas en la detección específica de secuencias de ácidos nucleicos, han permitido por una parte, incrementar notoriamente la capacidad de detección de microorganismos, evitando generalmente los pasos de aislamiento y cultivo, mientras que por otra, han refinado las posibilidades de identificación y tipificación para bacterias cultivadas.

Dentro de la caracterización molecular de bacterias, la secuenciación y el análisis del gen 16S que codifica el ARN ribosómico es la técnica de identificación más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía del mundo procariota, causando un profundo impacto en nuestra visión de la evolución, y como consecuencia, en la clasificación e identificación bacteriana (Rodicio, 2004).

Para la identificación bacteriana existen diversas herramientas bioinformáticas tales como Blast server for bacterial identification, la cual permite la exploración en una base de datos teniendo en cuenta secuencias de al menos 1200 nucleótidos, tiene gran sensibilidad a secuencias con débil similitud, otra de ellas es Ribosomal database Project, la cual organiza secuencias en bruto de las alineaciones, anota los datos de las secuencias de RNAr y ofrece un panorama filogenético; por otro lado; BIBI database identifica la secuencia teniendo en cuenta el porcentaje de similitud, la longitud de la secuencia y la menor distancia filogenética (Vasek y col., 2002).

El análisis comparativo de secuencias permite construir árboles filogenéticos que reflejan gráficamente la genealogía molecular de la bacteria, mostrando su posición evolutiva en el contexto de los organismos comparados (Schelegel, 1997).

III MATERIALES Y MÉTODOS

1- LUGAR

El estudio de investigación se realizó en los siguientes lugares:

-Estación experimental “El Mantaro” del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA), ubicado en el Km. 34 de la carretera central (Huancayo-Jauja), distrito de El Mantaro, provincia de Jauja, departamento de Junín, a una altitud de 3,320 msnm.

-Laboratorio Bioservice SRL. ubicado en la avenida Nicolás de Piérola 1228, distrito de Villa María del Triunfo.

-Laboratorio de Bioquímica, Nutrición y Alimentación Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM.

-Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM.

-Laboratorio de Patología Clínica de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM.

-Laboratorio de Investigación y Desarrollo (LID) de la universidad Cayetano Heredia.

2- OBTENCION DE CEPAS

a- ANIMALES:

Se utilizaron 13 cuyes, entre machos y hembras, de la raza INTI, de 02, 03, 04, 05, 06 días de edad y 2 meses de edad, divididos en tres grupos: dos grupos de cinco animales cada uno, cuyas edades comprendidas fueron entre 2 a 6 días y un tercer grupo de tres animales, cuyas edades fueron de 2 meses; nacidos de reproductores aparentemente sanos, (Tabla 4). Éstos animales provenían de la Estación Experimental El Mantaro.

Los animales fueron divididos en tres grupos porque fueron tres envíos diferentes en tiempos diferentes,

Tabla 4: Identificación de los animales de la Estación Experimental IVITA – Huancayo usados en el estudio.

GRUPOS	NÚMERO DE ANIMALES	EDADES
GRUPO 1	5	2,3,4,5,6 días cada animal
GRUPO 2	5	2,3,4,5,6 días cada animal
GRUPO 3	3	2 meses

b- TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS:

A cada animal, luego de su sacrificio por dislocación cervical, realizado en la Estación Experimental El Mantaro, se le practicó una laparotomía abdominal con máxima asepsia, teniendo cuidado de no lesionar sus intestinos u otros órganos.

Se les extrajo el intestino haciendo cortes a la altura del yeyuno (intestino delgado) y colon mayor (intestino grueso), previo ligado de ambos extremos intestinales con hilo de sutura aséptico y estéril.

Se depositaron las secciones cortadas en bolsas plásticas individuales, se colocaron en una caja térmica con bloques de hielo y se enviaron al laboratorio Bioservice (ubicado en Lima) para trabajarse el mismo día de su toma.

c- PROCESAMIENTO DE MUESTRAS:

c.1 CULTIVOS PARA AISLAMIENTO:

Se realizó la toma de muestra tanto del contenido intestinal como del epitelio intestinal por medio de un raspado de la mucosa intestinal, ya que las bacterias probióticas se encuentran asociadas íntimamente al epitelio de la mucosa intestinal, colonizando nichos determinados para mantener el ecosistema intestinal estable (Rosmini, 2004).

Se tomaron muestras del intestino delgado e intestino grueso (ciego y colon). A nivel del intestino delgado, los raspados de la mucosa intestinal fueron las pertenecientes a la región yeyunal (último tercio del intestino delgado) e ileal (representada por aproximadamente 2 a 3 cm de largo anteriores a la válvula ileocecal). A nivel del intestino grueso, los raspados de la mucosa fueron las pertenecientes al ciego y colon mayor.

Se prepararon los diferentes medios de cultivo sólidos selectivos correspondientes de acuerdo al género bacteriano:

-Agar Peptona de caseína – peptona de harina de soja (agar Trypticase de Soya) (agar CASO): Flora aerobia mesófila esporulada y no esporulada, este medio es bastante bueno para microorganismos que no presentan exigencias particulares, no es diferencial. Disolver 40 g en un litro de agua desmineralizada en baño de agua hirviendo y luego autoclavar por 15 minutos a 121°C.

-Agar Mac Conkey.: Enterobacterias (para el aislamiento de Salmonella, Shigella y bacterias coliformes). Disolver 50 g en un litro de agua desmineralizada en baño de agua hirviendo y luego autoclavar por 15 minutos a 121°C.

-Agar MRS (agar de Man Rogosa y Sharpe): Lactobacillus, Bifidobacterias. Disolver 68.2 g en un litro de agua desmineralizada en baño de agua hirviendo y luego autoclavar por 15 minutos a 121°C.

-Agar Leche: Lactobacillus sp. Preparar el agar Trypticase de soya (cada 100 ml de agua desmineralizada, 5g de agar), dejar enfriar hasta 35°C aproximadamente y luego agregar leche pasteurizada (10 ml de leche por cada 100 ml de agar).

-Agar clostridium: Múltiples bacterias de tipo anaerobias. Preparar el agar Trypticase de Soya (cada 100 ml de agua desmineralizada, 5g de agar), luego agregar: glucosa 0.2g cada 100ml, fosfato de sodio 0.5g cada 100 ml, sulfato de magnesio 20ul cada 100 ml, extracto de levadura granulado 0.5g cada 100 ml, luego autoclavar de la misma manera que la preparación de los otros agares y una vez tibio el preparado agrego 10 ml de yema de huevo cada 100 ml de la preparación.

Una vez preparados los medios y vertidos en placas petri fueron llevados a la estufa a 37°C por 24 horas para su posterior utilización, con la finalidad de evitar el uso de placas contaminadas.

En las placas conteniendo los medios de cultivo ya controlados se procedió a la siembra de los raspados de mucosa intestinal en los diferentes medios sólidos. La técnica de siembra utilizada fue el estriado por agotamiento.

Se incubaron las placas sembradas a 37°C de la siguiente manera:

Placas con agar Mc Conkey, agar Trypticase de Soya: incubadas a 37°C en la estufa.

Placas con agar MRS: colocadas en cámaras de anaerobiosis con una vela encendida para simular un medio de microaerofilia, incubadas a 37°C en la estufa.

Placas con agar leche y agar clostridium: colocadas en cámaras de anaerobiosis con sobre de Gaspar para conseguir una atmósfera de anaerobiosis, incubadas a 37°C en la estufa.

Luego del crecimiento de las colonias, se procedió a la elección de las colonias a resembrar, para ello se tomó en cuentas las características fenotípicas típicas del crecimiento de colonias pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* (Donald, 2000; Rosmini, 2004, Rodríguez 1994; Pryde, 1999) *Bifidobacterium* (Rosmini, 2004; Isay, 2006), *Streptococcus* (Linaje, 2004; Rodríguez, 1994; Rosmini, 2004), *Enterococcus* (Donald, 2000; Rosmini, 2004; Salminen, 1999; Zootendal, 2004), *Bacillus* (Donald, 2000) de conocido potencial probiótico.

Las características consideradas en la diferenciación de una colonia bacteriana son las siguientes según Rogriguez (2009):

Forma: puntiforme, circular, irregular, alargada, fusiforme, filamentosa, rizoide, etc.

Tamaño: estimar el diámetro en milímetros.

Superficie: lisa, rugosa, cerebriforme, en anillos concéntricos, etc.

Elevación: aplanada, elevada, pulvinada, convexa, umbonada, umbilicada, etc.

Borde: continuo, ondulado, lobulado, erosionado, festonado, filamentoso, etc.

Estructura interna: amorfa o granulosa.

Color: según sea observado por la luz reflejada o por la luz transmitida, puede ser blanco, amarillo, rojo ladrillo, anaranjado, etc.

Opacidad: transparente, opaca.

Consistencia: dura, viscosa, membranosa, gelatinosa, mucosa, etc.

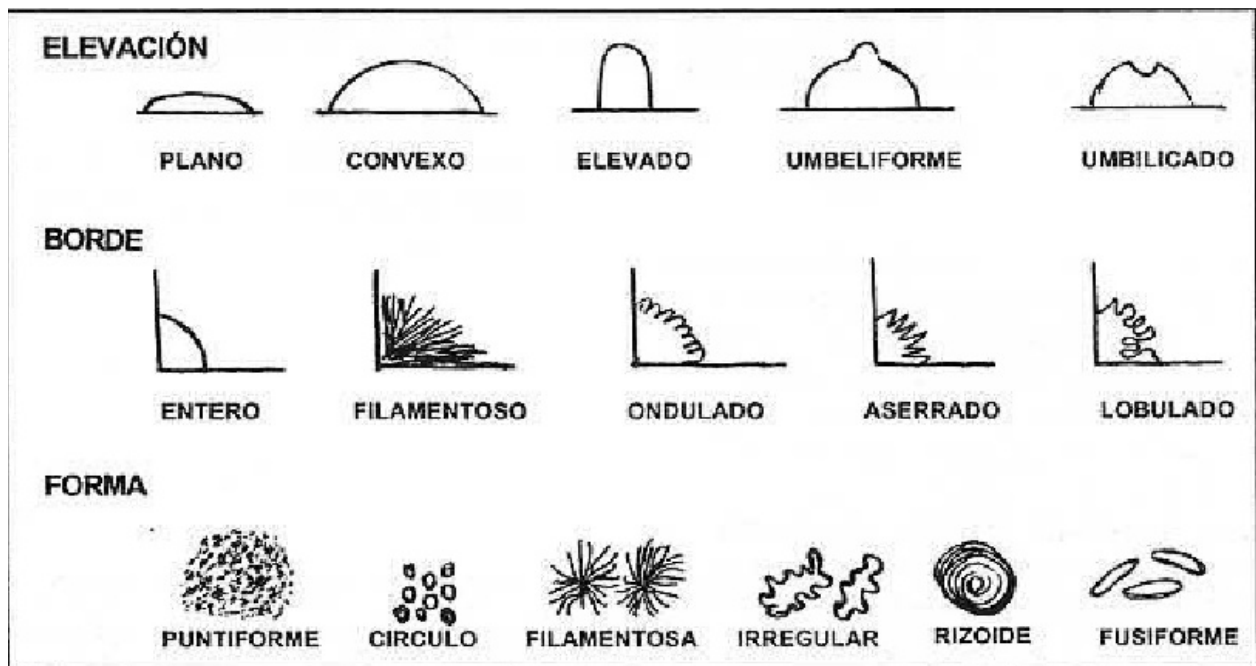


Figura 3 : Morfología de las Colonias en Placa. Fuente: Lodish y col (2002).

En el caso de los géneros bacterianos con potencial probiótico, los patrones fenotípicos de las colonias elegidas a sembrar fueron:

-Lactobacillus, aspecto circular, ligera elevación, convexas, borde entero (Jaweltz, 2002).

-Streptococcus, colonias discoides, generalmente de 1 a 2 mm de diámetro, colonias brillantes mucoides; el crecimiento tiende a ser escaso en medio sólido siendo las no patógenas las menos exigentes (Jaweltz, 2002).

-Enterococcus, colonias blancas cremosas que presentan 2 a 3 mm de diámetro a los 2 días de incubación, elevación umbeliforme, borde ondulado, forma circular (Schlegel, 1997).

-Bacillus, redondeadas, translúcidas (Schlegel, 1997).

-Bifidobacterium, colonias de color crema a blanco, olor ácido (Schlegel, 1997).

Se sembraron las colonias elegidas (probablemente pertenecientes a géneros probióticos) en sus respectivos medios de cultivo sólidos.

Se procedió a elegir entre todos los sembrados a las 30 posibles cepas de género probiótico para realizarles la tinción de gram como un segundo método de identificación, con

éste método se buscó clasificar por su tinción sólo bacterias de tipo gram+ (color violeta) puesto que las bacterias probióticas buscadas son de tipo gram+.

c.2 TINCIÓN DE GRAM:

Procedimiento:

-Colocar una gota de agua en el portaobjetos e inocular con un ansa de siembra la colonia (secar al aire)

-Fijar el material inoculado al portaobjetos de modo que no sea arrastrado en el proceso de tinción (pasarle 4 – 5 veces por la llama).

-Colocar el portaobjetos sobre la cubeta de tinción y cubrir su superficie con el cristal violeta.

-Dejar actuar el cristal violeta durante 1 minuto y después lavar con agua.

-Coger el porta entre los dedos pulgar e índice y lavar con alcohol hasta que no se arrastre más color violeta (15 a 20 segundos como máximo).

-Lavar con agua y dejar una fina capa sobre el preparado. A continuación cubrir con el colorante de contraste (fucsina), aproximadamente por 30 segundos.

-Lavar con agua y dejar escurrir el exceso en posición vertical.

-Secar al aire.

-Poner una gota de aceite de inmersión y observar al microscopio.

Luego de realizar la tinción de gram a las 30 colonias clasificadas, se procedió a su identificación molecular por medio de la utilización de la técnica: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se eligieron sólo 30 cepas por razones económicas.

c.3 IDENTIFICACION MEDIANTE EL SECUENCIAMIENTO Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO:

c.3.1 Extracción de ADN bacteriano:

De las cepas elegidas; aisladas mediante el cultivo; se extrajo el ADN genómico utilizando el Kit Promega Wizard Genomic ADN Isolation estandarizando el protocolo de extracción según fue conveniente para obtener DNA de mayor calidad. El ADN extraído se colocó en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL de capacidad y se almacenaron en una congeladora a -20° C (Ver Protocolo de Extracción Modificado en anexos).

c.3.2 Cuantificación del ADN bacteriano:

Se procedió a su cuantificación, permitiendo determinar la calidad (tamaño del fragmento) y también la cantidad del ADN (concentración de la muestra). Este proceso se realizó en una cámara de electroforesis, mediante la comparación con diluciones seriadas de un marcador de peso molecular (fago lambda digerido con la enzima de restricción *Haemophilus influenzae Rd*) λ DNA Hind III[®] (FERMENTAS) en un gel de agarosa a concentración del 1 %.

c.3.3 Amplificación del gen 16S rRNA:

Diez nanogramos de ADN genómico bacteriano fue utilizado para amplificar una región altamente conservada de 720 pares de bases de los genes 16S rRNA mediante PCR. Se utilizaron dos cebadores universales descritos para bacterias por Pryde (1999) : 5'- CGC GCC GCA TTA GAT ACC CTG GTA GTC C -3' (posición 787 – 814 primer de avance, P3mod) y 5' GCG GCC GCT ACC TTG TTA CGA CTT - 3'.(posición 1492 – 1515, primer de reversa, PC5). Se utilizaron como condiciones del PCR (desnaturalización, hibridación y extensión o polimerización, las cuales forman cada ciclo del PCR) las descritas por Pryde (1999).

Tabla 5: Condiciones de la PCR para un volumen final de 20 ul

Componentes	Concentración	Cálculo en ul para 1X
ADN	10 ng	2 ul
PCR buffer	1X (20mM Tris HCl pH 8.4, 50mM KCl)	2 ul
MgCl ₂	2 mM	1.6 ul
dNTPs	0.2 mM de cada uno	1.6 ul
Taq ADN polimerasa	0.5 U	0.1 ul
Primer F	5 pmol	0.25 ul
Primer R	5 pmol	0.25 ul
H ₂ O		12.2 ul

*Observación: Se preparó un tubo de PCR control

Tabla 6: Calibración del Termociclador.

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95°C	5 minutos
30	95 °C	30 segundos
	55 °C	45 segundos
	72 °C	45 segundos
1	72 °C	10 minutos

c.3.4 Secuenciamiento del gen 16S rRNA bacteriano:

Los productos de PCR obtenidos fueron purificados utilizando Wizard PCR product purification kit (Promega) y secuenciados en ambas direcciones (5' - 3' y 3' - 5') utilizando ABI PRISM Big Dye Terminador Cycle Sequencing Ready Reaction Kit y un secuenciador automático ABI PRISM 3130 Genetic Analyser®. La edición de los extremos de las secuencias se realizó mediante el programa Seqscape v 1.0 (Applied Biosistem) y Clustal W (Thompson, 1994).

c.3.5 Análisis de secuencias del gen 16S rRNA bacteriano:

Las secuencias de ADN fueron comparadas directamente con las bases de datos nucleotídicas reportadas en el Gen Bank mediante el uso del Blast server for bacterial identification (<http://bioinfo.unice.fr/blast/>), Ribosomal database project (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp) y BiBi database (<http://umr5558-mql.univ-lyon1.fr/qm?page=BibiDataBases>) para identificar el género y especie bacteriana en base a la identidad de secuencia ($\geq 98\%$), e-value (e^{-140}) y a su origen filogenético.

IV RESULTADOS

Aislamiento Bacteriano:

Se remitieron las muestras de intestinos de los 13 animales en tres grupos, dos grupos conformados por cinco animales cada uno de 2 a 6 días de edad y el último grupo conformado por tres animales de 2 meses de edad cada uno. Los resultados de la siembra de dichos grupos fueron los descritos en las tablas 7, 8 y 9.

Los signos positivo (+) indican la existencia de crecimiento de colonias con características macroscópicas de los géneros buscados ya descritos (potenciales probióticos), la cantidad de signos positivos (por ejemplo: ++) indican la cantidad de colonias; posibles probióticas; aisladas luego de la siembra. Los signos negativos (-) indican la inexistencia de colonias con probables características probióticas.

Tabla 7 / Grupo1: Existencia y cantidad de colonias con probables características probióticas, aisladas en los diferentes medios de cultivo sólido a partir del intestino de 5 cuyes neonatos.

Órganos	Edades (días)	*Mc Conkey	Trypticasa de Soya	MRS	Clostridium	Leche
Intestino Delgado	2	-	-	-	-	-
	3	-	-	+	-	+
	4	-	-	++	+	-
	5	-	-	+++	-	++
	6	-	+	+	+	++
Intestino Grueso	2	-	-	-	-	+
	3	-	-	+	-	+
	4	-	-	++	-	+
	5	-	+	+	-	+
	6	-	+	+++	+	+
Ciego	2	-	-	-	-	-
	3	-	+	+++	++	-
	4	-	-	++	-	-
	5	-	++	++	-	++
	6	-	++	+++	-	++

54 resultados +

Tabla 8 / Grupo 2: Existencia y cantidad de colonias con probables características probióticas, aisladas en los diferentes medios de cultivo sólido a partir del intestino de 5 cuyes neonatos.

Órganos	Edades (días)	*Mc Conkey	Trypticosa de Soya	MRS	Clostridium	Leche
Intestino Delgado	2	-	+	+	++	++
	3	-	-	+	+	++
	4	-	+	+	+++	++
	5	-	++	++	++	+
	6	-	+	++	+	+
Intestino Grueso	2	-	-	-	-	++
	3	-	+	+	+	++
	4	-	+	+	+	++
	5	-	+	+	++	++
	6	-	++	+++	+	++
Ciego	2	-	++	+	++	++
	3	-	+	+	++	++
	4	-	+	+	+	+
	5	-	++	++	+++	++
	6	-	+	++	++	++

88 resultados +

Tabla 9 / Grupo3: Existencia y cantidad de colonias con probables características probióticas, aisladas en los diferentes medios de cultivo sólido a partir del intestino de 3 cuyes de dos meses de edad.

Organos	Edades (meses)	*Mc Conkey	Trypticosa de Soya	MRS	Clostridium	Leche
Intestino delgado	-	+	+	+	+	+
	-	+	+	+	+	+
	-	-	+	+	+	+
Intestino grueso	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+
	-	+	+	+	+	+
Ciego	-	-	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+
	-	+	+	+	+	+

37 resultados +

*Observación: el agar Mc Conkey es referencial, ya que es específico para enterobacterias (gram -), no para aislar bacterias de nuestro interés (gram +), la razón de uso de éste agar fue conocer el tipo de bacteria (gram+ o gram -) que predomina en la primera semana de vida (importante para cuyes neonatos), vale decir que, otros agares también tienen la facultad de aislar bacterias gram -.

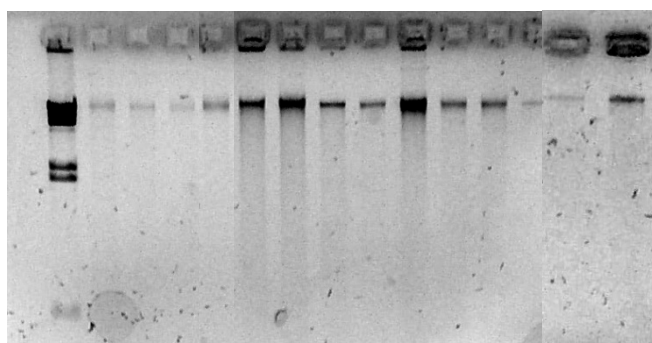
Se aislaron 179 colonias bacterianas de todos los medios, las cuales fueron resembradas en sus respectivos medios de cultivo sólido, realizándose 54 resiembras para el primer grupo, 88 resiembras para el segundo grupo y 37 resiembras para el tercer grupo. De ellas se escogieron las 30 más representativas a las cuales se les realizó la tinción de gram para sólo a las gram + pasarlas a identificar molecularmente.

Tinción de gram:

Las 30 colonias sometidas a éste método de tinción, sólo 27 se colorearon violeta, significando ello positivas a la tinción de gram; por lo tanto; se procedió a la identificación por métodos moleculares de sólo éstas 27 colonias bacterianas.

Identificación Molecular de las Bacterias:

Una vez realizada la extracción del ADN, se cuantificó su calidad y cantidad mediante la Electroforesis (figura 4), obteniéndose ADN de buena calidad de aproximadamente 23 Kb.



ADN BACTERIAS
COBAYO STOCK
GEL AGAROSA 1% TBE 0.5X 40V 45
MIN
2 ul ADN Y LAMDBA HIND III (100
ng)

Figura 4: Electroforesis de ADN de microbiota intestinal de cobayo visualizada por luz ultravioleta.

A partir del ADN obtenido de las 27 colonias presentes en los diversos medios de cultivo de 24 horas de incubación, se procedió a su identificación molecular a través del gen 16S rDNA de 720 bp en base a la identidad de secuencias mayor o igual a 98%, e-value mayor a e^{-140} (Blast server for bacterial identification), coeficiente de asociación (S-ab score) de 0.950 a 1.000 (Ribosomal database Project) y origen filogenético (Bibi database). Se obtuvieron los resultados descritos en la tabla 10 y 11 (ver en anexos las tablas 12, 13 y 14, para observar los resultados detallados).

Tabla 10: Tabla resumen de todos los géneros con sus respectivas especies identificadas en cada tracto del tubo digestivo para las diferentes edades de cuyes.

Edad	Intestino delgado	Ciego	Intestino grueso
2 días		<i>-Staphylococcus sp</i>	
3 días		<i>-Enterococcus faecalis</i>	
4 días	<i>-Lactobacillus frumenti</i> <i>-Enterococcus faecalis</i> <i>-Bacillus pumilus, sp</i>	<i>-Lactobacillus johnsonii</i>	
5 días	<i>-Enterococcus faecalis</i>	<i>-Lactobacillus sp</i> <i>-Enterococcus hirae</i> <i>-Staphylococcus sp</i>	
6 días	<i>-Enterococcus sp</i> <i>-Lactobacillus reuteri</i>	<i>-Enterococcus hirae</i> <i>-Staphylococcus equorum</i>	<i>-Enterococcus hirae</i> <i>-Streptococcus thoralensis</i> <i>-Lactobacillus reuteri</i>
2 meses		<i>-Lactobacillus reuteri, sp</i> <i>-Staphylococcus equorum</i>	<i>-Lactobacillus reuteri</i>

Tabla 11: Relación de bacterias identificadas con probable potencial probiótico. (objetivo del estudio)

GÉNERO	ESPECIE	% IDENTIDAD
<i>Enterococcus</i>	<i>hirae</i>	100
	<i>faecalis</i>	99
	<i>sp</i>	99
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	100
	<i>frumenti</i>	99
	<i>johnsoni</i>	98
	<i>sp</i>	99
<i>Streptococcus</i>	<i>thoraltensis</i>	99
<i>Bacillus</i>	<i>pumilus</i>	99
	<i>sp</i>	100

V DISCUSIÓN

Se discute la importancia y posibilidad de aislar en medios de cultivo bacterianos específicos e identificar por secuenciamiento del gen 16S RNAr, géneros bacterianos con posible potencial probiótico a partir del mismo nicho ecológico en el cual se podrán aplicar (intestino de cuy).

En éste estudio se utilizaron preferentemente neonatos (animales de 2 a 6 días de edad) debido a que en la vida intrauterina, su tubo digestivo es estéril, comenzando la colonización de éste a las pocas horas del nacimiento a partir de la microbiota de la madre y medio ambiente, ésta se clasifica en microbiota indígena y transitoria, es la microbiota indígena (gram positiva) la que mayor importancia tiene ya que está presente en todos los integrantes de una comunidad, es la primera en colonizar el tubo digestivo asociándose íntimamente al epitelio de la mucosa gastrointestinal para manter estable el ecosistema gastrointestinal, todas ellas son características de bacterias probióticas; por lo tanto; es en ésta primera semana de vida la mayor posibilidad de encontrar variedad y cantidad de bacterias probióticas (Donald, 2000; Rosmini, 2004).

Se utilizaron además, animales adultos sanos de 2 meses de edad; puesto que en ellos la microbiota intestinal indígena es muy estable (Rosmini, 2004), pero; a diferencia de los neonatos; hay mayor población bacteriana tipo gran negativa, por lo que, disminuye la probabilidad de encontrar fácilmente bacterias con posible potencial probiótico, además de ello, el utilizar neonatos de edades consecutivas nos permite tener somero conocimiento acerca de la dinámica de colonización de la microbiota indígena y la microbiota en general del tubo digestivo.

Por otro lado, para que un probiótico sea efectivo debe provenir de especies semejantes y ser utilizado en el mismo lugar donde actúa en el huésped, además de ello la administración de probióticos es más efectiva cuando se administra a neonatos en etapas de estrés antes y después del destete; por lo tanto; si la administración de probióticos es ideal en neonatos, entonces, se tendrá que producir probióticos a partir de la microbiota de neonatos cuyo nicho ecológico de la microbiota sea el tracto digestivo (Donald, 2000; Rosmini, 2004).

Dicho lo anterior, el identificar los mismos géneros bacterianos con posible potencial probiótico en animales de 2 meses de edad y en neonatos, garantizaría más aún que dichas bacterias son indígenas (probióticas) y no transitorias.

Se tomaron muestras haciendo raspados debido a que hay mayor probabilidad de encontrar microorganismos endógenos adheridos al epitelio intestinal, Los microorganismos a nivel de yeyuno e ileon representan en cantidad $10^6 - 10^5$ UFC/g de contenido intestinal. Por el contrario, en los dos tercios anteriores del intestino delgado son en abundancia no mayor a 10^4 a 10^5 UFC/g de contenido intestinal debido a la mayor velocidad de peristaltismo, limitando de ésta manera mayor colonización (Rodríguez, 1994). En el intestino grueso hay un cambio brusco en la importancia y composición de la flora, siendo en abundancia mayores a 10^{11} UFC/g del contenido intestinal (Rodríguez, 1994).

Por lo expuesto, puede indicarse que existe mayor cantidad de microorganismos hacia la zona caudal del tubo digestivo, siendo ésta una de las razones para la elección de aquellas regiones anatómicas a muestrear (yeyuno, ileon, ciego, colon mayor).

Según Tissier (1900) el tracto gastrointestinal del feto es estéril, se encuentra en lo que se denomina estado axénico fisiológico. Sin embargo, la colonización microbiana es extremadamente precoz y rápida, de modo que a las 24 a 48 horas del nacimiento se alcanzan concentraciones de $10^9 - 10^{11}$ microorganismos/gramo de heces, cifras cercanas a las observadas en el adulto, detectándose *Lactobacillus*, cocos gram – positivos, *Clostridium perfringes* y *Escherichia coli*, apareciendo más tarde cocos gram – negativos y Bacteroides (Lejeune *et al.*, 1981).

Similar presencia de bacterias fue hallada a partir de la microflora intestinal del cuy durante la primera semana de vida, identificándose en éste estudio bacterias gram positivas a partir del ciego del cuy de dos días de vida, ésta fue *Staphylococcus sp*, el cual no es utilizado como probiótico.

Al día 5 y 6 de vida se continuó identificando *Staphylococcus sp*, *equorum*, a partir del ciego del cuy, por último, a los 2 meses de edad se identificó *Staphylococcus equorum* a partir del ciego, como se mencionó anteriormente, se logró obtener somero conocimiento acerca de la existencia de algunas bacterias que siendo gram positivas **no** son motivo ni finalidad de éste estudio pero aportan conocimiento en la identificación bacteriana intestinal en la primera semana de vida y a los 2 meses de edad.

Es importante señalar que en la primera semana de vida hubo nulo crecimiento en el agar Mc Conkey, que es específico para enterobacterias (salmonella, shiguella, coliformes); sin embargo, éste agar no es el único medio para el crecimiento de bacterias gram negativas, ya que ellos crecieron en agar Trypticase de soya y Clostridium.

Según Smith y Crabb (1961), el desarrollo de la microflora intestinal en las primeras etapas de la vida es análogo para las distintas especies animales, siendo la flora láctica la que primeramente coloniza el aparato digestivo del lechón (Premi, 1974), ternero (Smith, 1967) y pollo (Sarra *et al.*, 1992). Sin embargo, en el gazapo de conejo, Kandler y Weiss (1992) indican que el estómago e intestino delgado están libres de microorganismos durante la lactancia, contrastando con el ciego y colon que albergan una abundante flora a la semana de vida, pero con ausencia de lactobacilos, también Ducha *et al.* (1990) afirma que los lactobacilos normalmente no forma parte de la microflora intestinal y su presencia está relacionada al tipo de alimento como cereales y forraje frente a su ausencia en los que reciben pienso granulado.

Siendo el cuy una especie de digestión cecal al igual que el conejo, se esperaría encontrar microbiana intestinal análoga; no obstante; en la primera semana de vida de los cuyes evaluados se identificaron géneros gram positivos del tipo *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, todos ellos con probable potencial probiótico puesto que éstos géneros son utilizados como insumos en la elaboración de probióticos comerciales; como se observa, se identificaron *Lactobacillus*, los cuales no son normalmente encontrados en conejos gazapos (similar digestión a la de cuyes).

Interés de éste estudio fue la identificación de géneros bacterianos con probable potencial probiótico, resultando lo siguiente:

A nivel del intestino delgado se identificó *Lactobacillus frumenti*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sp*; en neonatos de 4 días de edad. A los 5 días se identificó *Enterococcus faecalis*. A los 6 días se identificó *Enterococcus sp* y *Lactobacillus reuteri*.

A nivel del ciego se identificó en animales de 3 días de edad *Enterococcus faecalis*, a los 4 días *Lactobacillus johnsonii*, a los 5 días *Lactobacillus sp*, *Enterococcus hirae*, a los 6 días de vida se identificó *Enterococcus sp*, a los 2 meses se identificó *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus sp*.

A nivel de intestino grueso en animales de 6 días de edad se logró identificar *Enterococcus hirae*, *Streptococcus thoraltensis*, *Lactobacillus reuteri*.

Tanto el género *Lactobacillus* como *Enterococcus* fueron hallados en el intestino delgado, intestino grueso y dentro de éste, el ciego.

De las 27 bacterias aisladas e identificadas, 4 de ellas no pertenecen a géneros con probable potencial probiótico, por tanto, no son de interés en éste estudio, las 23 restantes si son géneros con probable potencial probiótico (objetivo de éste estudio), de éstas el 43,47% son

del género *Enterococcus*, el 39,13% del género *Lactobacillus*, el 13,04% son del género *Bacillus* y el 4.3% restante son del género *Streptococcus*.

De las bacterias identificadas con probable potencial probiótico, el 43.47% fueron reconocidos a partir del ciego, el 34.78%; a partir del intestino delgado y el 21.73%; a partir del intestino grueso. Según Kandler y Weiss (1992), en condiciones fisiológicas normales, la colonización intestinal es más importante donde existe períodos de éstasis prolongado (ciego) y más débil donde la motilidad es más activa (duodeno, yeyuno), existiendo una relación recíproca entre el peristaltismo y la flora intestinal, de manera que si bien el peristaltismo intestinal es uno de los factores que controla las poblaciones microbianas, éstas a su vez estimulan la motilidad intestinal. De este modo, es fácil comprender que el animal axénico, la velocidad de tránsito esté disminuido en todos los tramos del tubo digestivo con la finalidad de dar tiempo al proceso de colonización (Ducluzeau y Raibaud, 1979). Por ésta razón la población bacteriana en el ciego del cuy es mayor que en el resto de tramos evaluados.

Kandler y Weiss (1992) mencionan que la flora que coloniza el estómago en las diversas especies animales es muy distinta de la localizada en la parte final del intestino delgado o del intestino grueso. No obstante puede indicarse que en términos cuantitativos existe, en general, una graduación creciente en el sentido oral – anal. Por otro lado, Bhat y col (1980) mencionan que existe predominio de especies anaerobias estrictas en la flora bacteriana del ileon (tercio caudal del intestino), identificándose de modo habitual estreptococcus y enterobacterias y en los dos tercios proximales; predominio de gram positivos. Esto avala la mayor diversidad de géneros bacterianos (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus*) identificados a nivel de ésta porción del tubo digestivo (donde hay mayor probabilidad de encontrar gram positivos) hallados en la presente investigación.

Una vez pasada la válvula ileocecal, hay un cambio brusco en la composición de la flora, en la que predominan las bacterias anaerobias estrictas y facultativas, compuestas fundamentalmente por bacterias gram + y gram -, predominando éstas últimas en el ciego (Rodríguez, 1994). Es así que tras la identificación de la flora bacteriana del ciego y resto de intestino grueso del cuy se reconocieron *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, además de *Staphylococcus*. Debido a que sólo se identificaron 27 cepas de las 179 aisladas, no se logró obtener una mayor variedad o frecuencia de géneros con probable potencial probiótico, pero se alcanzó el objetivo del estudio.

En el presente estudio se secuenció el gen 16S RNAr de 27 cepas entre las constituyentes de la flora intestinal del cuy con probable potencial probiótico categorizadas como tal en base a los estudios fenotípicos previos tales como la utilización de medios de cultivo sólidos que tiene

por finalidad aislar o purificar una especie bacteriana a partir de una muestra (en éste caso es fecas y raspado epitelial de intestino) formada por muchos tipos de bacterias, donde las células que se multiplican no cambian de localización; tras muchos ciclos reproductivos, cada bacteria individual genera por escisión binaria una colonia macroscópica compuesta por decenas de millones de células similares a la original. Si ésta colonia individual se siembra a su vez en un medio nuevo crecerá como cultivo puro, clon o colonia de un solo tipo de bacteria que es genéticamente homogénea (Madigan y col. , 2005).

La secuencia de la pequeña subunidad (30S) del gen RNA ribosomal que posee una sola molécula de rRNA 16S, es altamente conservada debido a que los ribosomas son críticos para la función celular e interaccionan con un gran número de otras moléculas, incluyendo el ARN de transferencia y mensajero, las secuencias de las moléculas de rRNA están altamente obligadas y se han conservado notablemente a través de la evolución (Herrera, 2002). Además, las secuencias de los genes que codifican para el rRNA, se encuentran dentro de las mas altamente conservadas ya identificadas por eso se ven claramente las diferencias entre los distintos microorganismos pudiéndose realizar árboles filogenéticos y esquemas evolutivos (Herrera, 2002).

La estructura del 16S RNAr está compuesta por regiones alternadas de alta y baja variabilidad. Las regiones con secuencias variables contienen información de bajo nivel filogenético, mientras que las regiones con secuencias preservadas contienen información de los eventos evolutivos más tempranos (Herrera, 2002; Rodicio y col., 2004). Así mismo, existe una gran cantidad de copias de rRNA en una bacteria que esté en fase de crecimiento, de esta forma el rRNA es un excelente marcador molecular (Herrera, 2002).

Este gen 16S RNAr posee 1542 nucleótidos, la precisión de las inferencias filogenéticas de las secuencias del rRNA, depende en el número de bases comparadas; y para ser completamente efectivas, al menos deben ser consideradas 1000 bases para cada organismo (Herrera, 2002).

Sin embargo, la secuenciación de éste gen tiene varias limitaciones, la primera es el pobre poder de discriminación que proporcionan algunos géneros, los fracasos en la identificación a nivel de especie son atribuibles fundamentalmente a las mismas secuencias compartidas. La segunda limitación es la necesidad de una secuencia de buena calidad, secuencias de mala calidad poseen bases ambiguas que puede interferir en la interpretación de la secuencia. La tercera limitación es la ausencia de un consenso universal acerca del porcentaje de similitud requerido para asignar una determinada especie o género a una secuencia, se han sugerido

similitudes que van desde el 97% para el nivel de género y 99% para el nivel de especie (Mignard, 2006).

Según Rodicio (2004), hay que tener en cuenta, no obstante, que es la comparación de genomas completos, y no la comparación de los 16S RNAr, la que aporta una indicación exacta de las relaciones evolutivas. En su ausencia, la especie bacteriana se define, en taxonomía, como el conjunto de cepas que comparten una similitud del 70% o más, en experimentos de reasociación ADN – ADN. Stackebrandt (2002) demostró que cepas con éste nivel de relación presentan típicamente una identidad del 97% o más entre sus genes 16S ARNr. Así, cepas con menos del 97% de identidad en las secuencias de sus 16S ARNr es improbable que lleguen a estar relacionadas a nivel de especie. Sin embargo, existen cepas que comparten una similitud inferior al 50% en experimentos de reasociación, y son por tanto clasificadas en especies diferentes, pero presentan una identidad del 99 a 100% a nivel de 16S ARNr (Stackebrandt, 2002). Por ello, en taxonomía, actualmente se recomienda la identificación polifásica, que utiliza criterios fenotípicos junto con datos de secuenciación, esto implica que la secuenciación de 16S RNAr no aportará siempre una identificación definitiva a nivel de especie (Rodicio, 2004). Es por ello que en éste trabajo se busca identificar géneros bacterianos y no especies, los cuales fueron identificados en tres diferentes bases de datos, cuyos criterios de inclusión fueron una identidad igual o mayor al 98%, e – value mayor a e^{-140} y análisis filogenético según Mignard y Flandrois (2006).

En el presente estudio, de los 179 aislamientos, sólo 27 de ellos fueron analizados y secuenciados, de ellos el 100% presentan el mismo género en las tres diferentes bases de datos para cada animal, no obstante, en algunos casos, las especies varían. El porcentaje de la frecuencia de los diferentes géneros bacterianos fue: *Lactobacillus* 9 (33.33%), *Bacillus* 3 (11.11%), *Enterococcus* 10 (37.03%), *Streptococcus* 1 (3.7%), *Staphylococcus* 4 (14.81%).

Se utilizaron tres diferentes herramientas bioinformáticas para facilitar y mejorar la identificación: Blast server for bacterial identification, Ribosomal database Project, BIBI database, las cuales fueron altamente concordantes en la identificación de los géneros bacterianos. Éstas bases pueden consultarse libremente para realizar una comparación estadística de las secuencias obtenidas de un aislamiento, contra las que ya están publicadas y así poder elaborar dendogramas, en los que se indique la posición del nuevo microorganismo recién identificado (Herrera, 2002).

El uso de las tres bases de datos representan un alto nivel de confianza sobre los resultados y el cruce de resultados sobre especie y género (éste último es objetivo de estudio) garantizan las secuencias descritas.

Por otro lado, cabe señalar que no hay antecedentes de estudio de la microbiota intestinal del cuy, ni mucho menos su identificación molecular, siendo ésta una investigación pionera, encontrándose dinámicas de colonización bacteriana intestinal propias para el cuy, identificándose bacterias únicas para el cuy a pesar de la similitud digestiva que comparte con el conejo, debido probablemente a la fisiología específica de su ciego.

Para finalizar, éste estudio no sólo identificó bacterias de género con probable potencial probiótico, sino que logró identificar otras bacterias que no necesariamente podrían tener potencial probiótico pero que su hallazgo contribuyen en parte a la identificación del conjunto de bacterias que constituyen el ecosistema intestinal del cuy, cuyo estudio aún es limitado o desconocido.

VI CONCLUSIONES

Se logró la identificación de cuatro de los cinco géneros bacterianos buscados: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, de probable potencial probiótico, a partir de la microbiota intestinal de cuyes.

VII RECOMENDACIONES

A partir de las bacterias identificadas se recomienda:

Evaluar el potencial probiótico in vivo e in vitro para seleccionarlas, producirlas, reintroducirlas a la dieta del animal y evaluar sus beneficios para luego producirlas a escala industrial.

VIII ANEXOS

Tabla 1: Rango óptimo de separación en geles de agarosa.

Agarosa	Rango óptimo de separación (Kb)
0.3%	60 – 5.0
0.6%	20 – 1.0
0.7%	10 – 0.8
0.9%	7 – 0.5
1.2%	6 – 0.4
1.5%	4 – 0.2
2.0%	3 – 0.1

Fuente: Modificado de Hays y col (2008).

Tabla 2: Migración del colorante marcador en geles de agarosa.

% Gel	Tamaño ADN* (Kb) que co- migran con el tinte	
	Azul de Bromofenol	Xilene Cianol
0.6	0.7 – 1.2	9.0 – 10.0
0.7	0.6 – 0.8	6.0 – 7.0
0.9	0.3 – 0.4	3.0 – 4.0
1.2	0.18 – 0.21	1.4 – 1.9
1.5	0.12 – 0.14	0.8 – 1.4
2.0	Menor a 0.1	0.8 – 0.9

*ADN doble cadena

Fuente: Modificado de Wilson y col (1996).

Tabla 3: Composición de las distintas soluciones tampón de carga.

Tipo de solución	Solución tampón	T° almacenamiento
I	0.25% Azul de bromofenol 0.25% Xilene cianlo FF 40% w/v sucrosa en H ₂ O	4°C
II	0.25% Azul de bromofenol 0.25% Xilene cianlo FF 15% Ficoll (tipo 400)en H ₂ O	Temperatura ambiente
III	0.25% Azul de bromofenol 0.25% Xilene cianlo FF 30% Glicerol en H ₂ O	4°C

Fuente: Modificado de Wilson y col (1996).

KIT: PROMEGA WIZARD GENOMIC ADN ISOLATION

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN MODIFICADO

1. Colocar una colonia bacteriana (usar mondadiente o ansa descartable) en un tubo de microcentrífuga de 1.5ml conteniendo 600ul de solución de lisis nuclear
2. Mezclar hasta homogenizar la colonia bacteriana (puede utilizar vortex por 20 segundos).
3. Incubar el homogenizado a 80°C por 15 minutos
4. Una vez terminado el tiempo transferir inmediatamente a 4°C (Bloque frío/hielo) y mantener por 5 minutos (Shock térmico a 4°C por 5 minutos)
5. Adicionar 3ul de ARNasa e incubar a 37°C por 30 minutos.
6. Una vez terminado el tiempo transferir inmediatamente a 4°C (Bloque frío/hielo) y mantener por 5 minutos (Shock térmico a 4°C por 5 minutos)
7. Adicionar 300ul de buffer de precipitación de proteína y vortexear por 20 segundos.

8. Una vez terminado el tiempo transferir inmediatamente a 4°C (Bloque frío/hielo) y mantener por 5 minutos (Shock térmico a 4°C por 5 minutos)
9. Centrifugar a 13000 rpm por 8 minutos.
10. Transferir el sobrenadante conteniendo el DNA a un nuevo tubo de micro centrifuga de 1.5 ml. conteniendo 600 ul de isopropanol.
11. Mezclar por inversión y observar el pellet de ADN (precipitación del ADN genómico)
12. Centrifugar a 13000 rpm por 4 minutos.
13. Eliminar sobrenadante sin resuspender el pellet de ADN.
14. Adicionar 600ul de etanol al 70% y mezclar suavemente.
15. Centrifugar a 13000 rpm por 4 minutos.
16. Eliminar sobrenadante sin resuspender el pellet de ADN.
17. Adicionar nuevamente 600 ul de etanol al 70%.
18. Centrifugar a 13000 rpm por 4 minutos.
19. Eliminar el sobrenadante y dejar secar a temperatura ambiente (25°C) toda la noche.
20. Resuspender el DNA con 100 ul de TE e incubar a 60°C por 1 hora ó 4°C toda la noche.
21. Almacenar el DNA resuspendido a -20°C.

Tabla 12: Identificación de la microflora intestinal según 3 diferentes bases de datos utilizadas a partir de cuyes neonatos del grupo 1.

Región Anatómica	Edad en días	Agar	Blast server for bacterial identification	Ribosomal database project	Bibi database
Intestino Delgado	4	MRS	<i>Lactobacillus frumenti</i> e-value:0 identidad:99%	<i>Lactobacillus</i> sp S_ab score: 0.950	<i>Lactobacillus frumenti</i>
		Clostridium	<i>Enterococcus faecalis</i> e-value:0 identidad:99%	<i>Enterococcus faecalis</i> S_ab score: 0.978	<i>Enterococcus faecalis</i>
	5	Leche	<i>Enterococcus faecalis</i> e-value:0 identidad:99%	<i>Enterococcus faecalis</i> S_ab score: 1.000	<i>Enterococcus faecalis</i>
	6	Clostridium	<i>Enterococcus faecalis</i> e-value:0 identidad:99%	<i>Enterococcus faecalis</i> S_ab score: 0.980	<i>Enterococcus</i> sp
Ciego	3	Clostridium	<i>Enterococcus faecalis</i> e-value:0 identidad:99%	<i>Enterococcus faecalis</i> S_ab score: 0.983	<i>Enterococcus faecalis</i>
		Clostridium	<i>Enterococcus faecalis</i> e-value:0 identidad:98%	<i>Enterococcus faecalis</i> S_ab score: 0.960	<i>Enterococcus faecalis</i>
	4	MRS	<i>Lactobacillus johnsonii</i> e-value:0 identidad:98%	<i>Lactobacillus</i> sp S_ab score: 0.978	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
	5	MRS	<i>Lactobacillus</i> sp e-value:0 identidad:99%	<i>Lactobacillus johnsonii</i> S_ab score: 0.956	<i>Lactobacillus</i> sp
		MRS	<i>Enterococcus hirae</i> e-value:0 identidad:99%	<i>Enterococcus hirae</i> S_ab score:0.978	<i>Enterococcus hirae</i>
	6	Tripticasa de soya	<i>Enterococcus hirae</i> e-value:0	<i>Enterococcus</i> sp S_ab	<i>Enterococcus hirae</i>

			<i>identidad:99%</i>	<i>score:0.978</i>	
		MRS	<i>Enterococcus hiraie</i> <i>e-value:0</i> <i>identidad:99%</i>	<i>Enterococcus hiraie</i> <i>S_ab</i> <i>score:0.978</i>	<i>Enterococcus hiraie</i>
		Tripticasa de soya	<i>Enterococcus sp</i> <i>e-value:0</i> <i>identidad:100%</i>	<i>Enterococcus sp</i> <i>S_ab</i> <i>score:</i> <i>1.000</i>	<i>Enterococcus hiraie</i>
Intestino Grueso	6	MRS	<i>Enterococcus hiraie</i> <i>e-value:0</i> <i>identidad:99%</i>	<i>Enterococcus hiraie</i> <i>S_ab</i> <i>score:</i> <i>0.980</i>	<i>Enterococcus hiraie</i>
		Clostridium	<i>Streptococcus thoraltensis</i> <i>e-value:0</i> <i>identidad:99%</i>	<i>Streptococcus sp</i> <i>S_ab</i> <i>score:</i> <i>0.971</i>	<i>Streptococcus thoraltensis</i>

Tabla 13: Identificación de la microflora intestinal según 3 diferentes bases de datos utilizadas a partir de cuyes neonatos del grupo 2.

Región anatómica	Edad en días	Agar	Blast server for bacterial identification	Ribosomal database project	Bibi database
Intestino Delgado	4	MRS	<i>Bacillus sp</i> <i>e-value:0</i> <i>identidad:99%</i>	<i>Bacillus pumilus</i> <i>S_ab score:</i> <i>0.978</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
		Clostridium	<i>Bacillus pumilus</i> <i>e-value:0</i> <i>identidad:99%</i>	<i>Bacillus pumilus</i> <i>S_ab score:</i> <i>0.978</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
		Clostridium	<i>Bacillus sp</i> <i>e-value:0</i> <i>identidad:100%</i>	<i>Bacillus sp</i> <i>S_ab score:</i> <i>1.000</i>	<i>Bacillus sp</i>
	6	MRS	<i>Lactobacillus reuteri</i> <i>e-value:0</i> <i>identidad:99%</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i> <i>S_ab score:</i> <i>0.978</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
Ciego	2	Clostridium	<i>Staphylococcus sp</i> <i>e-value:0</i> <i>identidad:99%</i>	<i>Staphylococcus sp</i> <i>S_ab score:</i> <i>0.983</i>	<i>Staphylococcus sp</i>
	5	Leche	<i>Staphylococcus sp</i> <i>e-value:0</i> <i>identidad:99%</i>	<i>Staphylococcus sp</i> <i>S_ab score:</i> <i>0.978</i>	<i>Staphylococcus sp</i>
	6	Leche	<i>Staphylococcus equorum</i> <i>e-value:0</i> <i>identidad:100%</i>	<i>Staphylococcus equorum</i> <i>S_ab score:</i> <i>1.000</i>	<i>Staphylococcus equorum</i>
Intestino Grueso	6	MRS	<i>Lactobacillus reuteri</i> <i>e-value:0</i> <i>identidad:99%</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i> <i>S_ab score:</i> <i>0.978</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>

Tabla 14: Identificación de la microflora intestinal según 3 diferentes bases de datos utilizadas a partir de cuyes de 2 meses del grupo 3.

Región anatómica	Edad en meses	Agar	Blast server for bacterial identification	Ribosomal database project	Bibi database
Ciego	2	MRS	<i>Lactobacillus johnsonii</i> e-value:0 identidad:98%	<i>Lactobacillus</i> sp S_ab score: 0.962	<i>Lactobacillus</i> sp
		Tripticasa de soya	<i>Staphylococcus equorum</i> e-value:0 identidad:99%	<i>Staphylococcus equorum</i> S_ab score: 0.956	<i>Staphylococcus equorum</i>
		Clostridium	<i>Lactobacillus reuteri</i> e-value:0 identidad:100%	<i>Lactobacillus reuteri</i> S_ab score: 0.977	<i>Lactobacillus reuteri</i>
Intestino grueso	2	Leche	<i>Lactobacillus reuteri</i> e-value:0 identidad:99%	<i>Lactobacillus reuteri</i> S_ab score: 0.987	<i>Lactobacillus reuteri</i>
		Leche	<i>Lactobacillus reuteri</i> e-value:0 identidad:99%	<i>Lactobacillus reuteri</i> S_ab score: 0.974	<i>Lactobacillus reuteri</i>

*la identificación a nivel de especie es referencial, para identificar a nivel de especie con niveles de confianza del 100% es necesario secuenciar todo el gen 16S RNAr

IX BIBLIOGRAFÍA

1. **Abecia L, Fondevila M, Balcells J, Edwards J, Newbold J, McEwan N. 2005.** Molecular profiling of bacterial species in the rabbit caecum. *FEMS Microbiology Letters* 244: 111–115.
2. **Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M. 2001.** *Biología Molecular de la célula*. Tercera Edición. Pp. 237 – 246.
3. **American Veterinary Medical Association. 2001.** Report of the American Veterinary Medical Association. Panel on Euthanasia. *J. Am. Vet. Med. Assn.* 218: 669-695.
4. **Baker F. J. 1970.** *Manual de Técnicas Bacteriológicas*. Pp. 72 – 81.
5. **Bengmarck S. 1998.** Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic microbiota. 42, 2 – 7.
6. **Bhat P, Albert M, Rajan D, Ponniah J, Baker S, 1980.** Bacterial flora of the jejunum: a comparison of luminal aspirate and mucosal biopsy. *Journal of Medical Microbiology*, 13: 247 – 256.
7. **Blum S, Alvarez S, Haller D, Péres P, Achiffrin J. 1999.** Intestinal microbiota and the interaction with immunocompetent cells. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 199-205.
8. **Burrows W. 1969.** *Tratado de Microbiología*, décimo novena edición. Pp. 424 – 442.
9. **Chauca de Zaldivar L. 1997.** Producción de cuyes (*Cavia porcellus*). Capítulo 7 Sanidad de cuyes pag. 1-2.
10. **Collins C. H. 1972.** *Métodos Microbiológicos*. Pp. 261 – 264.
11. **Cooper, 2000.** *La Célula*. Segunda edición. Pp 90 – 100.
12. **Cummings J & MacFarlane G. 1997.** Colonic microflora: nutrition and health. *Nutrition* 13:476-478.
13. **Davis E.T. 1989.** *Manual de Investigación Veterinaria, Técnicas de Laboratorio*, vol. I. pp 55 – 70.
14. **Donald Mc. 2000.** *Nutrición Animal*, sexta edición, 523-534
15. **Ducha J, Lara C, Rodriguez A. 1990.** Correlation between airborne aerobic flora and intestinal flora in young rabbits bred in rabbitries. *Journal of Applied Rabbit Research*, 12: 228 – 230.
16. **Ducluzeau R, Raibaud P. 1979.** *Ecologie microbienne du tube digestif*. Actualités Scientifiques de l'I. N.R.A. Masson Ed., París.
17. **Embley T, Smida J, Stackebrandt E. 1988.** Nucleotide reverse transcriptase sequencing of 16S ribosomal RNA from *Faenia rectivirgula*, *Pseudonocardia*

- thermophila and *Saccharopolyspora hirsute*, three wall type IV Actinomycetes which lack mycolic acids. *J. Gen. Microbiol.* 134: 961–966.
18. **Felsenstein J. 1993.** **PHYLIP** – phylogeny inference package (Version 3.2). *Cladistics* 5: 164–166.
 19. **Frisk CS, 1982.** Guinea Pig Anesthesia Using Various Combinations and Concentrations of Ketamine, Xylazine, and/or Acepromazine. *Lab. Anim. Sci.* 32:434.
 20. **Fuller R. 1989.** Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66, 365-378.
 21. **Fuller R. 1997.** Introduction. En: *Probiotics: 2. Applications and Practical Aspects*, R. Fuller Ed. Londres, Chapman & Hall. Pp 1-9.
 22. **García R. 1999.** Manual Ilustrado de Técnicas de Laboratorio utilizadas en Bacteriología y Micología Veterinaria. Pp 45 – 54.
 23. **Gibson G. R. 1995.** Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of probiotics. *Journal of Nutrition* 125, 1401 – 1402.
 24. **Gish W & States D. 1993.** Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat. Genet.* 3:266-272.
 25. **Gots V. 1979.** Prophylaxis against ampicillin associated diarrhea with a *Lactobacillus* preparation. *American Journal Hospital Pharmacologic*, 36:754-757.
 26. **Gustafson R. 1991.** Sepsis: Antibiotic residues in meat and milk. *Journal of Dairy Science*, 74: 1428-1432.
 27. **Havenaar R, Ten B. 1992.** Selection of strains for probiotic. *The Scientific Basis*. Pp. 209 – 224.
 28. **Hays J, Belkum A, Pelt E, 2008.** Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. Pp 1 – 22.
 29. **Herrera C. 2002.** Use of the 16S rRNA for identification of bacterial isolates in the routine clinical microbiology service. *Journal of Microbiology* 43: 615 – 619.
 30. **Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA). 1994.** Investigaciones en Cuyes, Informe Técnico número 6. Pp 127.
 31. **Isay S. 2006.** Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista de Ingeniería Química*, México. vol 42. Pp.181 - 191
 32. **Jawetz A, 2002.** *Microbiología Médica*. 17a. edición. Pp 251 – 254.
 33. **Joseph E, Prattrick J. 1976.** *The Biology of the Guinea Pig*. Pp 3 -12, 24, 58.
 34. **Kandler O, Weiss N. 1992.** Regular non-sporing, Gram positive rods. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Ed. P. Sneath, Baltimore, Williams and Wilkins, pp. 1209 – 1234.

35. **Kontula P. 1999.** In vitro and in vivo characterization of potencial probiotic carbohydrates. Finnish Journal of Dairy Science 54, 1 – 142.
36. **Koolman J, Heinrich K, 2005.** Color Atlas of Biochemistry. 2da edition.pp 301 – 302.
37. **Lejeune C, Boussougant Y, De Pailleretes F, F Ghnassia J, Gallet J. 1981.** Séquence d'installation de la flore intestinale du nouveau-né. Etude para analyse differentiale quantitative. Revue de Pédiatrie, 4: 223 – 242.
38. **Leninger 1987.** Bioquímica. Segunda Edición. Pp. 871 – 880.
39. **Linaje R. 2004.** Characterization of faecal enterococci from rabbits for the selection of probiotic strains. J Appl Microbiol. 96(4):761-71.
40. **Lindgren S, Dobrogosz W. 1990.** Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbiology Review, 87:149-164.
41. **Llapasca O. 1976.** Estudio Anátomo descriptivo del sistema digestivo del cuy. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
42. **Lodish, Berk, Ziswisky, Matzudaira. 2002.** Biología Celular y Molecular. Cuarta edición. Pp. 101 – 108.
43. **Lubert 1995.** Fundamentos de Bioquímica, tomo I. Cuarta Edición. Pp. 739 – 752.
44. **Madigan M. T. Brock T. 2005.** Microbiología de los microorganismos, sexta edición. Pp. 180 – 219.
45. **Massi M. 2006.** Effects of probiotic bacteria on gastrointestinal matily in guinea – pig isolated tissue, vol 12. 5988-5994.
46. **Mateos G. G, Lázaro R & Mendel. P. 2000.** El manejo de la alimentación animal sin antibióticos promotores de crecimiento. III conferencia, salón de fabricantes de piensos del mediterráneo. Revs. Pp. 174 – 178.
47. **Mignard S, Flandrois J. 2006.** 16S RNAr sequencing in routine bacterial identification: A 30 month experiment. Journal of Microbiological Methods 67: 574 – 581.
48. **Page R. 1996.** TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer applications in the Biosciences 12:357-358.
49. **Parker R. 1974.** Probiotics, the other half of the antibiotics story. Animal Nutrition and Health, Journal of Nutrition 29: 4-8.
50. **Parker R.B.1990.** Manipulation of the funtional activity of gut by dietary and other means (antibiotics/probiotics). Journal of Nutrition 120, 639-648.
51. **Pascual M, Garrega M, Monfort J. M. 1996.** Los probióticos en la alimentación animal. Eurocarne 44, 91 – 96.
52. **Premi L. 1974.** Seminario Internazionale su il ruolo terapeutico dei lactobacilli. Roma. Journal of Applied Bacteriology, 69: 177 – 188.

53. **Prescott H, Klein. 1999.** Microbiología, cuarta edición. Pp. 264 – 283.
54. **Pryde S, 1999.** Molecular analysis of the microbial diversity present in the colonic wall, colonic lumen and cecal lumen of a pig. Appl. Environ. Microbiol. 65:5372-5377.
55. **Raibaud P. 1992.** Bacterial interactions in the gut. En: Probiotics: Scientific Basis, R. Fuller Ed. Chapman & Hall, Londres, Pp. 9 – 28.
56. **Robertis. 2003.** Biología Celular y Molecular. Pp. 287 – 304.
57. **Rodicio M, Mendoza M, 2004.** Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Revista de Biología, España. Pp 81 - 87
58. **Rodríguez M. 1994.** Bacterias Productoras de Acido Láctico: Efectos sobre el Crecimiento y la flora intestinal de pollos, gazapos y lechones. Tesis Doctoral, Madrid. Universidad Complutense de Madrid.
59. **Rodríguez M. 2009.** Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora. Tesis doctoral. Madrid. Universidad Complutense de Madrid.
60. **Rosmini M. 2004.** Producción de prebióticos para animales de abasto: Importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. Revista de Ingeniería Química. vol 3: 181-191.
61. **Saitou N, Nei M, 1987.** The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, Mol. Biol. Evol. 4:406–425.
62. **Salminen S, Bouley C, Boutron – Ruault M. 1999.** Functional food science and gastrointestinal physiology and function. British Journal of Nutrition 80, 147 – 171.a
63. **Salminen S, 1999.** Probiotics: how should they be defined. Trends in Food Science and Technology. Journal 10, 107-110.b
64. **Sarra P, Morelli L, Bottazzi V. 1992.** The lactic microflora of fowl in the Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. Ed. B. Wood, Elsevier Applied Science, London, pp. 4 - 19.
65. **Schlegel H, 1997.** Microbiología General, séptima edición p 32- 42.
66. **Schneider R, Rosmini M, Gherman M, Vogel R. 2000.** Aplicación de técnicas de RAPD y análisis de 16S RNAr para la identificación de bacterias lácticas componentes de la microbiota aislada de terneros criados en condiciones artificiales. VI Congreso Latinoamericano de Microbiología de Alimentos. Buenos Aires (Argentina) pp 75.
67. **Smith H. 1967.** The effect of the use of antibacterial drugs, particularly as food additives, on the emergence of drug resistant strains of bacteria in animals. New Zealand Veterinary Journal, 15: 153 – 166.
68. **Smith H, Crabb W. 1961.** The faecal bacterial flora of animals and man. Its development in the young. J. Pathol. Bacteriol, 82: 53 – 66.

69. **Stackebrandt E. 2002.** Report of the ad hoc committee for the re evaluation of the species definition in bacteriology. *Journal of Microbiology*, 52: 1043 – 1047.
70. **Tannock G.W. 1995.** Microecology of the gastrointestinal tract in relation to acid lactic bacteria. *International Dairy Journal* 5, 1059 – 1070.
71. **Teuber M, Perretn V, Wirsching F. 1996.** Antibiotikumresistente Bakterien: eine neue Dimension in der Lebensmittelkrobiologie. *Lebensmittel-Technologie* 29, 182-199.
72. **Thompson J, 1994.** CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* 22: 4673–4680.
73. **Tissier H. 1900.** Recherches sur la flore intestinales du nourrisson. These Paris. *Poultry Science* 52: 197 – 203.
74. **Vanhoutte T, Huys G, De Brandt E, Fahey GC Jr, Swings J. 2005.** Molecular monitoring and characterization of the faecal microbiota of healthy dogs during fructan supplementation. *FEMS Microbiol Lett.* 1;249(1):65-71.
75. **Vasek P, Pot B, Kersters K. 2002.** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiology Rev..* 60: 407 – 430.
76. **Vaughan E.E, Hilig H.G, Zoetendal E.G, Sato R, Collins J. K. 1999.** Molecular approaches to study probiotic bacteria. *Trends in Food Science and Technology* 10, 400 – 404.
77. **Wilson K, Blichington R. 1996.** Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2273-2278.
78. **Zoetendal EG. 2004.** Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr.* Feb ; 134(2):465-72.