

EFFECTO *in vitro* DE *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* SOBRE EL CRECIMIENTO DE UN
AISLADO DE *Helicobacter pylori*.

ANDREA DEL ROCIO MONTES CEBALLOS

AYDA DEL PILAR SANTACRUZ BERNAL

JESSIE NADENKA SAÑUDO DIAZ

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICAS

PROGRAMA DE BIOLOGIA ENFASIS EN MICROBIOLOGIA

SAN JUAN DE PASTO

2003

EFFECTO *in vitro* DE *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* SOBRE EL CRECIMIENTO DE UN
AISLADO DE *Helicobacter pylori*.

ANDREA DEL ROCIO MONTES CEBALLOS

AYDA DEL PILAR SANTACRUZ BERNAL

JESSIE NADENKA SAÑUDO DIAZ

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de Biólogo con
énfasis en Microbiología

Asesor: ALVARO PAZOS MONCAYO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICAS

PROGRAMA DE BIOLOGIA ENFASIS EN MICROBIOLOGIA

SAN JUAN DE PASTO

2003

NOTA DE ACEPTACIÓN

MARIA CLARA YEPES
Jurado

MARIA ELENA ERASO
Jurado

BENJAMÍN SAÑUDO
Jurado

ALVARO PAZOS MONCAYO
Asesor

San Juan de Pasto _____

AGRADECIMIENTOS

Alvaro Pazos Moncayo. M.Sc. Microbiología, Director Departamento de Biología, Universidad de Nariño. Asesor de la Investigación.

Maria Elena Eraso. Bacterióloga, Jefe de Laboratorio Clínico, Hospital Departamental.

Maria Clara Yépes. M.Sc. Ciencias Biomédicas, Directora del Centro de Estudios Superiores, Universidad de Nariño. CESUN.

Benjamín Sañudo Sotelo. Ingeniero Agrónomo. Universidad de Nariño.

Dr. Pelayo Correa. M.D. Department of Pathology Louisiana state University.

Luis Eduardo Bravo. M.D. Director Departamento de Patología. Universidad del Valle.

Mario Emilio Ruano. Medicina Interna. Gastroenterólogo, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
Consultorio Clínica Los Andes. Departamento de Nariño.

Jose Luis Realpe. Gastroenterólogo. Universidad Nacional Autónoma de México. Consultorio Convida. Departamento de Nariño.

Harold Bolaños. Médico Histopatólogo. Universidad del Cauca. Patólogos Asociados. Departamento de Nariño.

Martha Sofía Gonzalez. M.Sc. Sistemática vegetal, Universidad de Nariño.

Maria Elena Solarte. M.Sc. Jefe sección de laboratorios. Universidad de Nariño.

Arsenio Hidalgo Troya. M.Sc. Matemáticas Aplicadas, Vicerrector de Investigaciones Postgrados y Relaciones Internacionales, VIPRI.

Ignacio Erazo. Director Aula de Informática. Universidad de Nariño.

Guido Ernesto Villota Calvache. Biólogo con énfasis en Microbiología Industrial, Universidad de Nariño.

Jairo España. Zootecnista. Universidad de Nariño.

Angel Alirio Rodríguez. Auxiliar de laboratorio de Histología e Histopatología. Universidad de Nariño.

Universidad de Nariño, VIPRI y todo el personal de los consultorios de Gastroenterología, Instituto de los Seguros Sociales, Fundación Valle de Atriz, Cruz Roja Colombiana, Convida, Patólogos Asociados y a todas las personas que de una u otra manera colaboraron en el desarrollo del trabajo.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCION	29
OBJETIVOS	31
OBJETIVO GENERAL	31
OBJETIVOS ESPECIFICOS	31
ANTECEDENTES	32
MARCO TEORICO	34
1. <i>Helicobacter pylori</i>	34
1.1 PERSPECTIVA HISTORICA	34
1.2 ETIOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGIA	36
1.3 MECANISMOS PATOGENICOS EN LA INFECCION POR <i>Helicobacter pylori</i>	37
1.3.1 Estructura espiral	37
1.3.2 Movilidad	38
1.3.3 Actividad mucolítica	38
1.3.4 Adherencia a la mucosa gástrica	38
1.3.5 Ureasa	39
1.3.6 Enzimas destoxificantes	39
1.3.7 Lipopolisacáridos	40

1.3.8 Tóxina vacuolizante	40
1.3.9 Proteína CagA	41
1.4 MICROBIOLOGIA Y TAXONOMIA DE <i>Helicobacter pylori</i>	41
1.5 ESTRATEGIAS PARA LA DETECCION DE <i>Helicobacter pylori</i>	43
1.5.1 Pruebas invasivas	43
1.5.1.1 Cultivo	43
1.5.1.2 Histología	44
1.5.1.3 Prueba rápida de la ureasa	46
1.5.1.4 Reacción en cadena de la polimerasa	46
1.5.2 Pruebas no invasivas	47
1.5.2.1 Serología	47
1.5.2.2 Prueba de aliento con urea marcada con carbono isotópico (C ¹⁴ , C ¹³)	48
1.5.2.3 Otros métodos	48
1.6 ASOCIACION ENTRE <i>Helicobacter pylori</i> Y ENFERMEDADES GASTRICAS	49
1.7 TRATAMIENTO POR LA INFECCIÓN DE <i>Helicobacter pylori</i>	50
1.7.1 Esquemas terapéuticos	51
2. BALANCE GASTROINTESTINAL	51
2.1 FUNCIONES DE LA FLORA INTESTINAL	52
2.1.1 Metabólicas y nutricionales	53
2.1.2 Protectoras	53
2.2 MICROBIOTA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL	54
2.3 BACTERIAS ACIDO LACTICAS	58
2.3.1 La microflora intestinal y efecto de barrera	59

2.3.2 El epitelio y la mucosidad	59
2.3.3 Inmunidad no específica y específica	59
2.4 CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y FISIOLOGICAS	60
2.5 METABOLISMO DE LAS BACTERIAS ACIDO LACTICAS	61
2.5.1 Homofermentación	61
2.5.2 Heterofermentación	62
2.6 CLASIFICACION DE LAS BACTERIAS ACIDO LACTICAS	62
2.6.1 <i>Lactobacillus</i>	64
2.6.1.1 <i>Lactobacillus casei</i>	66
2.6.1.1.1 <i>Lactobacillus casei subsp rhamnosus</i>	68
2.7 AGENTES INHIBITORIOS DE LAS BACTERIAS ACIDO LACTICAS	68
2.7.1 Peróxido de hidrógeno	69
2.7.2 Diacetil	69
2.7.3 Reuterina	69
2.7.4 Acido láctico	70
2.7.5 Bacteriocinas	71
2.8 COLONIZACION	74
2.9 ACCION ANTAGONICA	75
2.10 PROBIOTICOS	76
2.10.1 Características de los probióticos	77
2.10.2 Efectos benéficos de los probioticos	78
3. METODOLOGIA	80
3.1 FASES DE EJECUCION	80

3.1.1 Fase I	81
3.1.1.1 Aislamiento de <i>Helicobacter pylori</i>	81
3.1.1.2 Identificación de <i>Helicobacter pylori</i>	82
3.1.1.3 Preservación y activación de <i>Helicobacter pylori</i>	84
3.1.2 Fase II	85
3.1.2.1 Activación y conservación de <i>Lactobacillus casei subsp rhamnosus</i>	85
3.1.2.2 Cultivo del inóculo	86
3.1.2.3 Fermentación en matraz	88
3.1.3 Fase III	90
3.1.3.1. Ensayo de antagonismo <i>in Vitro</i>	90
3.1.3.1.1 Diseño experimental estadístico	90
4. ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS	92
4.1 FASE I	92
4.2 FASE II	97
4.3 FASE III	103
5. CONCLUSIONES	105
RECOMENDACIONES	106
BIBLIOGRAFIA	108
ANEXOS	124

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas.	72
Cuadro 2. Número de muestras de biopsias obtenidas desde 1999 a 2001	92
Cuadro 3. Número de aislamiento de <i>Helicobacter pylori</i> .	93
Cuadro 4. Porcentaje de aislamientos de <i>Helicobacter pylori</i> .	95
Cuadro 5. Porcentajes de correlación de aislados con el diagnóstico histológico.	96

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Morfología macroscópica de <i>Helicobacter pylori</i> .	94
Figura 2. Microfotografía de <i>Helicobacter pylori</i>	94
Figura 3. Pruebas de identificación para <i>Helicobacter pylori</i> .	95
Figura 4. Morfología macroscópica de <i>Lactobacillus casei subsp rhamnosus</i> .	97
Figura 5. Microfotografía de <i>Lactobacillus casei subsp rhamnosus</i> .	98
Figura 6. Cinética de crecimiento de <i>Lactobacillus casei subsp rhamnosus</i> en medio Melaza con leche en polvo. Ln (logaritmo natural), D.O. (densidades óptica).	99
Figura 7. Producción de proteína de <i>Lactobacillus casei subsp rhamnosus</i> en Medio melaza con leche en polvo.	100
Figura 8. Formación de biomasa de <i>Lactobacillus casei subsp rhamnosus</i> medio Melaza con leche en polvo.	100
Figura 9. Consumo de azúcares totales de <i>Lactobacillus casei subsp rhamnosus</i> en medio Melaza con leche en polvo.	101
Figura10. Cambios de pH de <i>Lactobacillus casei subsp rhamnosus</i> .	101
Figura 11. Inhibición de <i>Lactobacillus casei subsp rhamnosus</i> sobre <i>Helicobacter pylori</i>	103

Figura 12. Promedio de halos de inhibición antagónica de *Lactobacillus casei* subsp
rhamnosus sobre *Helicobacter pylori* y prueba de Tukey.

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Composición de sustratos de medios de cultivo.	125
Anexo B. Determinación de proteínas – método de Lowry.	127
Anexo C. Determinación del consumo de azúcares – método de Dubois o antrona.	130
Anexo D. Determinación de biomasa por recuento en placa.	132
Anexo E. Ficha técnica de datos de pacientes.	133
Anexo F. Resultado del muestreo de biopsias obtenidas en los años 1999, 2000, 2001.	134
Anexo G. Resultado de las pruebas de identificación de <i>Helicobacter pylori</i> en los cultivos.	140
Anexo H. Resultado de la comparación de los aislados de <i>Helicobacter pylori</i> con el diagnóstico histológico de los años 1999, 2000, 2001.	142
Anexo I. Resultados de parámetros de fermentación de <i>Lactobacillus casei subsp rhamnosus</i> en medio Melaza con leche en polvo.	144
Anexo J. Diámetro de halos de inhibición del crecimiento de <i>Helicobacter pylori</i> por diluciones de <i>Lactobacillus casei subsp rhamnosus</i> . (Técnica de los micropocillos).	145
Anexo K. Análisis de Varianza y prueba de Tukey.	146

GLOSARIO

ADENOCARCINOMA: tumor maligno que se origina del epitelio glandular.

ADP: adenosina difosfato, nucleósido que se forma generalmente tras la hidrólisis del ATP, cuando suministra energía para el metabolismo.

AGENTE ANTIMICROBIANO: agente que destruye o inhibe el crecimiento de microorganismos.

AGENTES PROBIOTICOS: monocultivos o mezclas de microorganismos vivos que al ser ingeridos por el hombre o los animales actúan benéficamente, mejorando el balance microbiano y las propiedades de la microflora del intestino.

ANTIGENO: sustancia extraña (externa al individuo, como una proteína, nucleoproteínas, polisacáridos o, a veces, un glucolípido) frente a la que responde los linfocitos; se denomina también inmunógeno porque induce la respuesta inmunitaria.

ANTIBIÓTICO: agente químico producido por un organismo que es dañino para otro microorganismo.

ATP: adenosina 5- trifosfato, molécula muy energética que posee un potencial de transferencia del grupo fosfato elevado, constituyendo la principal "moneda " de energía de la célula.

AXENICO: sin microbiota intestinal.

BACTERICIDA: que produce la muerte de las bacterias.

BACTERIOCINA: moléculas de naturaleza proteica, co-agregados de proteínas o bien glicoproteínas producidas por las bacterias lácticas que poseen una marcada acción inhibitoria sobre otras cepas bacterianas muy similares.

BACTERIOFAGO: virus que infecta células procarióticas.

BACTERIOSTATICO: que inhibe el crecimiento de las bacterias sin causar su muerte.

BIOMASA: o masa celular, se puede estimar mediante diversos métodos dependiendo del microorganismo de que se trate.

BIOPSIA: acto quirúrgico consistente en la extirpación de parte de un tejido u órgano de un ser vivo, con fines de diagnóstico; el material así obtenido y convenientemente preparado es sometido a estudio para ver si presenta anomalías en su anatomía.

BIOTA INTESTINAL: microorganismos vivos que se encuentran colonizando el tracto gastrointestinal humano.

CANCER: tumor maligno que se extiende localmente, invadiendo los tejidos adyacentes, y sistemáticamente, por metástasis.

CANCERIGENO: calificativo que reciben los factores que se sabe producen algún tipo de cáncer y que pueden ser de naturaleza física, química, bacterial o viral.

CARCINOGENO: sustancia que inicia la formación de un tumor, suele ser también un mutágeno.

CARCINOMA: tumor maligno constituido por la proliferación indefinida de células epiteliales, con tendencia a la infiltración de tejidos vecinos y a extenderse lejos del foco primario por metástasis.

CATALASA: enzima del grupo de las cromo proteínas porfirínicas, cuya molécula contiene ión férrico y que interviene en la descomposición del agua oxigenada. Su acción catalítica es extraordinariamente rápida; existe en los tejidos vegetales y animales y también en algunos géneros de bacterias.

CEPA: población de organismos que descienden de un único organismo o de un cultivo puro.

CITOCROMO: anillos porfirínicos con hierro que forman complejos con proteínas, y que actúan como portadores de electrones en el sistema de transporte de electrones.

COLONIA: grupo o conjunto de microorganismos que se multiplican sobre una superficie sólida como la de un medio de cultivo con agar. La colonia se observa a menudo directamente, pero también puede verse solamente con microscopio.

COLONIZACION: establecimiento de una zona de multiplicación microbiana sobre una superficie inanimada u organismo, sin que tenga como consecuencia necesariamente la invasión o daño tisular.

CULTIVO DISCONTINUO: cultivo de microorganismos producido al inocular un medio de cultivo en un sistema cerrado, es decir, sin una renovación de los nutrientes ni eliminación de los residuos durante la incubación.

CULTIVO INICIADOR: inóculo compuesto por una mezcla de microorganismos seleccionados cuidadosamente que se emplea para comenzar una fermentación.

ENDOSCOPIA: exploración visual del interior de una cavidad o de un conducto del organismo mediante el uso de endoscopio, que es un tubo hueco, más o menos flexible, en cuya punta hay un haz luminoso que permite ver el órgano en cuestión y en ocasiones un sistema óptico que permite ampliar las imágenes.

EFECTOS ANTIMICROBIANOS: actividad antagonista contra patógenos por parte de una bacteria láctica, incluyendo la utilización de compuestos antimicrobianos específicos producidos por ésta.

ENFERMEDAD INFECCIOSA: cualquier cambio producido en el estado de salud de un organismo en el que parte o la totalidad del huésped no pueden desempeñar sus funciones normales por la presencia de un agente infeccioso o de sus productos.

ENTEROPATOGENOS: bacterias entéricas entre las que están muchas cepas patógenas para el humano, animales y plantas.

ERRADICACION: supresión, mediante medidas terapéuticas y profilácticas, de una enfermedad generalmente contagiosa.

ESPECIE: grupo de cepas con muchas propiedades estables en común, que difieren significativamente de otro grupos de cepas.

FAGOCITOSIS: ingestión de material particulado como bacterias, ya sea por protistas o por células fagocíticas de organismos superiores

FERMENTACION: proceso liberador de energía en el cual las moléculas orgánicas actúan tanto de donadores como de aceptores de electrones.

FERMENTACION ACIDO LACTICA: fermentación que produce ácido láctico como uno o principal producto final.

FLORA EXOGENA: las bacterias provenientes del exterior, mayormente de las manos y de los alimentos. Son transitorias. Las bacterias patógenas son exógenas.

FOSFORILACION: síntesis de enlaces fosfato de alta energía, como el ATP.

GASTRINA: hormona polipeptídica secretada por la mucosa gástrica que estimula la secreción de ácido clorhídrico por el estómago y también la secreción del jugo pancreático.

GASTRITIS: inflamación aguda o crónica del estómago, en especial de su capa mucosa.

GNOTOXENICO: portador de solo una o unas pocas especies identificadas. Hospedero de microorganismos mono-di-, trigénicos: porta uno, dos o tres microorganismos seleccionados respectivamente.

GLICEROL: es un líquido soluble en agua y cuando se añade al 20% de concentración final, penetran en las células y las protegen previniendo la formación de cristales de hielo que pueden ocasionar lesiones en las bacterias. Disminuyendo así la capacidad biológica. De hecho, la adición de este agente llamado crioprotector, es la forma de conservar los cultivos microbianos a temperatura muy bajas (usualmente -70 , -196°C).

GLUCOLISIS: conversión anaeróbica de glucosa en ácido láctico por la vía de Embden Meyer-Hoff Parnas.

HUESPED: cuerpo de un organismo que aloja a otro. Se puede considerar, como un micro ambiente que protege y mantiene el crecimiento y la multiplicación del organismo parásito.

in batch: fermentación discontinua que puede ser considerada como un "sistema cerrado".

INHIBICION: fenómeno por el cual el funcionamiento de una actividad biológica disminuye o cesa completamente por la acción de un agente de naturaleza variable denominado inhibidor. La inhibición de contacto es una acción que se manifiesta en los cultivos *in vitro* de células sanas. Las células proliferan y ocupan zonas cada vez mayores del sustrato hasta que sus prolongaciones entran en contacto con las membranas de otras células.

INMUNIDAD: capacidad general de un huésped para resistir una enfermedad particular; condición de ser inmune.

INOCULO: crecimiento optimizado de células microbianas que va a dar origen a un proceso fermentativo, reconocido como el "material iniciador".

INOCULACION: introducción de un agente patógeno en un animal o planta para producir un forma benigna y hacer inmune al individuo. Pasar microorganismos a la superficie o en la masa de un medio de cultivo.

in vitro: locución latina que significa en vidrio. En general, se aplica a los procesos biológicos cuando se producen experimentalmente aislados del conjunto del organismo.

LINFOIDE: tejido constituido por una malla de tejido conjuntivo, en cuyo interior se encuentra los linfocitos y sus células antecesoras. Se encuentra muy repartido por el organismo; por sí solo forma los ganglios linfáticos.

LIPOPOLISACARIDO LPS: estructura lipídica compleja que contiene azúcares poco frecuentes y ácidos grasos, y que se encuentra en muchas bacterias Gram negativas, donde constituye la estructura química de la membrana externa de la pared celular.

METAPLASIA: transformación de las células de un tejido adulto en células de otro tipo.

METASTASIS: transferencia de una enfermedad, como el cáncer, de un órgano a otro sin que exista comunicación entre ellos.

MICROAEROFILICO: un organismo aeróbico que puede crecer solamente cuando la tensión de oxígeno es inferior a la del aire.

MICROBIOTA: microorganismos asociados normalmente con un tejido o estructura particular, población microbiana autóctona.

MORBILIDAD: incidencia de la enfermedad en una población incluyendo casos mortales y no mortales.

MORTALIDAD: incidencia de muertes de una población.

NISINA: péptido de 3500 Daltons de peso molecular, producida por *Streptococcus lactis*, utilizada como agente de conservación en la industria alimentaria y como agente inhibidor de microorganismos patógenos.

OXIDASA: enzima que cataliza la oxidación de un sustrato por eliminación de hidrógeno que se combina con oxígeno molecular.

PATOGENO: se refiere a un organismo o material que produce una enfermedad.

PLASMIDO: molécula de DNA circular de doble cadena, que puede existir y replicarse independientemente del cromosoma o estar integrado en el mismo. Un plásmido se hereda de forma estable, pero no es necesario para el crecimiento y la reproducción de la célula huésped.

RECIDIVA: reaparición de los signos y síntomas de una enfermedad, tiempo después de que ésta haya finalizado, consecuencia de un nuevo brote o de una nueva infección.

SUSPENSIÓN CELULAR: se le denomina así a una concentración de células presentes en un cultivo líquido, el cual aparece turbio porque las células dispersan la luz que atraviesa la suspensión. Cuantas más células halla más luz se dispersa y más turbia aparece la suspensión.

TIEMPO DE DUPLICACION: tiempo necesario para que una población microbiana duplique su número.

TINCION DE GRAM: método de tinción usada en bacteriología. Permite diferenciar muchos tipos de bacterias que se tiñen (Gram +) por ejemplo: *Staphylococcus*, de otras que no lo hacen (Gram. -) por ejemplo: bacterias tifoideas. La tinción se debe a la presencia de las bacterias de una nucleoproteína.

TOXINA: sustancia microbiana perjudicial para el hospedador.

TURBIDIMETRIA: método aplicado para realizar el seguimiento del crecimiento microbiano en medios totalmente solubles, la absorbancia de suspensiones celulares se determina en espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

ULCERA GASTRICA: se asocian con un exceso de secreción de ácido, y el dolor constituye el resultado de la erosión superficial de la capa de células que revisten la cara interna del estómago.

UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC): número de microorganismos que pueden formar colonias cuando se cultiva en medios de cultivos sólidos; indican el número de microorganismos viables en una muestra.

UREASA: enzima que cataliza la degradación de la urea en amoníaco y dióxido de carbono.

VIA DE EMBDEN MEYER-HOFF: vía que degrada la glucosa a piruvato; en la fase de seis carbonos convierte la glucosa en fructosa 1,6 bifosfato y en la fase de tres carbonos produce ATP, transformándose el gliceraldehído 3-fosfato en piruvato.

VIA DE DICKENS O PENTOSAS: otro esquema importante para el catabolismo de la glucosa. Esta vía es motivo de la biosíntesis de los azúcares de cinco carbonos encontrados en los nucleótidos (ATP, NAD⁺, NADP⁺ coenzima A, FAD), RNA y DNA genera NADPH el cual puede utilizarse en la biosíntesis de ácidos grasos.

Mi aprendizaje, esfuerzo y dedicación
se ve reflejado en este trabajo que
quiero dedicar a Dios, compañero incondicional
que me lo ha dado todo, a mis padres por su amor,
compresión y apoyo, a mis hermanos por su
entendimiento, cariño y alegría, a mis familiares
por su gran afecto, a mi esposo por su gran amor,
aliento y tolerancia y a la memoria de mi hijo por
darme esperanza y fortaleza.

Muchas Gracias

ANDREA MONTES C.

Es un reto más de mi vida, un escollo muy difícil de lograr si no fuera con la ayuda, amor y comprensión de mis padres y en especial el de mi madre, amiga y confidente que ha compartido mis tristezas y alegrías durante todo este camino, a mis hermanos por su cariño, paciencia y animo, a mis familiares por su aprecio y confianza.
A mi gran amigo que siempre me ha guiado y no me abandona Dios...Y a la memoria de mi gran amor.

A quienes se los quiero dedicar.

Muchas Gracias

AYDA sANTACRUZ BERNAL.

Con frecuencia la ignorancia
engendra más confianza que el
conocimiento. Son los que saben poco
y no los que saben mucho los que aseveran
positivamente que éste o aquel problema
nunca será resuelto por la ciencia.

Charles Darwin (1871).

Mi trabajo lo dedico a Dios, mi compañía
en todo momento y lugar.
A mis padres por su constante apoyo y dedicación.
A mi familia por su cariño y comprensión.
Y a ese ser magnífico por su amor,
paciencia y fuente de inspiración.

Danke.....

JESSIE NADENKA.

RESUMEN

En el Departamento de Nariño se presenta una alta incidencia de cáncer gástrico asociado a la infección por *Helicobacter pylori*. Las políticas de salubridad propuestas por las entidades oficiales encargadas del control de ésta enfermedad no muestran resultados alentadores, pues la respuesta del microorganismo a la acción de la alternativa quimioterapéutica es la multirresistencia y en este sentido la infección asociada a enfermedades gastrointestinales siguen en aumento, reflejándose en el incremento de la tasa de incidencia en nuestro Departamento.

Ante esta realidad este trabajo evaluó el efecto *in vitro* de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* sobre el crecimiento de un aislado de *Helicobacter pylori*.

Helicobacter pylori es una bacteria enteropatógena Gram negativa de forma bacilar pleómorfica que se aísla a partir de la mucosa gástrica humana observándose su asociación con úlceras gástricas y duodenales; así como gastritis crónica superficial hasta un posible cáncer gástrico.

Se evaluaron 257 biopsias de pacientes que presentaban síndrome ulceroso, obtenidas por endoscopia del tracto digestivo superior. Las enfermedades más frecuentes encontradas por endoscopia con prueba de ureasa positiva fueron: Gastritis crónica superficial, Gastritis crónica atrófica y no atrófica.

Los fragmentos de tejido se llevaron a cultivo en agar columbia con sangre desfibrinada de cordero al 8%; obteniéndose 61 aislados positivos para *H. pylori* representado en un 23.73 % de éxitos

sobre el total de intentos. Los aislados se identificaron con pruebas bioquímicas de ureasa, oxidasa, catalasa, y la identificación de su morfología por tinción de Gram igualmente el resultado de dichos aislados se comparó con el diagnóstico histológico dando un porcentaje de correlación del 63.46 %.

Finalmente se realizaron pruebas de antagonismo *in vitro* con *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*, bacteria ácido láctica Gram positiva aislada del tracto gastrointestinal humano cuyo crecimiento y desarrollo se logró en un medio base Melaza con leche en polvo el cual inhibió el crecimiento del patógeno de mejor manera en la dilución 10^{-2} con una densidad celular de 98×10^5 bact lácticas /ml, así lo demostró la prueba de significancia de Tukey con un 95 % de confiabilidad y 5% de error.

Los estudios llevaron a concluir que *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* ejerce capacidad antagonica *in vitro* sobre los aislados de *Helicobacter pylori* , sugiriendo la posibilidad de su uso como probiótico en el control y prevención de la infección por *Helicobacter pylori* asociada a enfermedades gastrointestinales.

ABSTRACT

In the Department of Nariño a high incidence of gastric cancer associated to the infection is presented by *Helicobacter pylori*. The health politicians proposed by the official entities in charge of the control of this illness don't show encouraging results, because the answer of the microorganism to the action of the alternative chemotherapeutic is the multiresistance and in this sense the infection associated to gastrointestinal illnesses continues in increase, reflecting in the increment of the rate of incidence in our Department.

In the face of this reality this work evaluated the effect *in vitro* of *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* about the growth of an isolated one of *Helicobacter pylori*.

Helicobacter pylori is a bacteria enteric pathogen negative Gram in way bacilar pleomorphics that you isolate starting from the mucous one gastric human being observed its association with you ulcers gastric and duodenals; as well as superficial chronic gastritis until a possible gastric cancer.

257 biopsies of patients were evaluated that presented syndrome ulcerous, obtains for endoscopy of the tract digestive superior. The most frequent illnesses found by endoscopy with test of positive urease were: superficial chronic Gastritis, Gastritis chronic atrophic and non atrophic.

The fragments of tissue were taken to cultivation in agar Columbia with blood of lamb desfibrinates to 8%; being obtained 61 isolated positive for *H. pylori* represented in 23.73% of successes on the total of intents. The isolated ones were identified with biochemical tests of urease, oxidase, catalase, and

the identification of their morphology for tint of Gram Equally the result of isolated statements was compared with the diagnostic histologic giving a percentage of correlation of 63.46%.

Finally they were carried out tests of antagonism *in vitro* with *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*, bacteria lactic acid isolated positive Gram of the human gastrointestinal tract whose growth and development was achieved in a half base Molasses with powdered milk which inhibited the growth of the pathogen in a better way in the dilution 10^{-2} with a cellular density of 98×10^5 bact/ml, it demonstrated this way it the test of significance of Tukey with 95% of dependability and 5 error%.

The studies took to conclude that *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* exercises antagonistic capacity *in vitro* on the isolated of *Helicobacter pylori*, suggesting the possibility of its use as probiotics in the control and prevention of the infection for *Helicobacter pylori* associated to gastrointestinal illnesses.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas han sido utilizadas en control y prevención de enfermedades gastrointestinales (Renner, E. 1991). Hoy en día son bien conocidos los beneficios en la salud que se derivan de la utilización de alimentos fermentados por bacterias ácido lácticas, entre ellos: - Control de las infecciones entéricas. - Immunopotenciadores en malnutrición. - Favorecimiento de la utilización de lactosa - Acción inhibitoria de algunos tipos de tumores intestinales y urinarios. - Acción hipocolesterolemica. Nuestra actividad investigativa se enfoca en encontrar cierto tipo de bacterias lácticas para ser usadas como probióticos vehiculados en alimentos fermentados. Se consideran varias las sustancias que producen las bacterias lácticas inductoras de capacidad antagonica contra bacterias saprófitas y patógenas entre otras se conocen: Peroxido de hidrógeno, diacetil, bacteriocinas, ácido láctico, reuterina entre otros. Además la inhibición del crecimiento esta sujeta a la competencia de nutrientes y espacio entre los microorganismos (Barney, C.E. 1996).

Helicobacter pylori coloniza la mucosa del estómago de al menos la mitad de la población mundial. La mayoría de los individuos infectados son asintomáticos, sin embargo, en un número importante de individuos, la infección por *Helicobacter pylori* está asociada al desarrollo de gastritis, atrofia glandular gástrica y duodenal, adenocarcinoma gástrico, patologías éstas con alta prevalencia en la zona Andina en el Departamento de Nariño. (Correa P. 1991).

Considerando los aspectos anteriores, el presente trabajo evaluó el efecto *in vitro* de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* sobre la bacteria enteropatogena Gram negativa *Helicobacter pylori in vitro*.

Para lograr dicho objetivo se trabajó con *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*, bacteria ácido láctica, cuyo aislado se obtuvo del tracto gastrointestinal humano en el estudio "Bacterias lácticas bacteriocinogénicas y su efecto sobre bacterias patógenas" (Barney, C.E. 1996), y con un aislado de *Helicobacter pylori* obtenido de biopsias de mucosa gástrica en el presente estudio. Se desarrolló un medio base de melaza con leche en polvo para realizar las fermentaciones *in batch*. Finalmente se realizaron ensayos de inhibición *in vitro* para verificar el efecto antagónico de la bacteria ácido láctica sobre *Helicobacter pylori*.

El fermento láctico inhibió el crecimiento del patógeno de mejor manera en la dilución 10^{-2} , con una densidad celular de 98×10^5 bact/ml respecto al sustrato puro y a las diluciones 10^{-1} y 10^{-3} así lo demostró la prueba de significancia de Tukey. Se pudo concluir finalmente que la bacteria láctica es capaz de inhibir el crecimiento de *Helicobacter pylori*, por tanto se proponen estudios encaminados a probar el efecto probiótico *in vivo*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Comprobar *in vitro* el efecto antagónico de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* sobre el crecimiento de un aislado de *Helicobacter pylori*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Aislar *Helicobacter pylori* a partir de mucosa gástrica humana.
- Determinar parámetros de fermentación *in batch* como producción de proteínas, consumo de azúcares, formación de biomasa y pH de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* en medio melaza con leche en polvo.
- Establecer la cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* en medio melaza con leche en polvo.
- Evaluar la capacidad antagónica *in vitro* de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* sobre el crecimiento de *Helicobacter pylori*.

ANTECEDENTES

La infección por *Helicobacter pylori*, microorganismo que coloniza la mucosa del estómago en el humano es asintomática y cuando el individuo presenta síntomas, puede ser desde una gastritis crónica superficial hasta un cáncer gástrico. Esta bacteria fue descubierta por primera vez en 1983 y debido a su alta prevalencia a nivel mundial ocupa el segundo lugar de todas las enfermedades infecciosas que se conocen lo que ha motivado a los investigadores a realizar estudios que contribuyan a los conocimientos necesarios para controlarla, prevenirla, así como erradicarla (Correa, P. 1991).

Varios son los factores etiológicos que incluyen en la evolución de esta neoplasia como *Helicobacter pylori*, el excesivo consumo de sal en la dieta, la proliferación de bacterias anaeróbicas que producen un exceso de nitritos como parte de un proceso precanceroso que se relacionan entre sí y determinan el comportamiento de la enfermedad (Correa, P. 1992)

El cáncer gástrico es el segundo tumor más frecuente en el mundo después del cáncer de pulmón con 682.000 casos nuevos, a pesar de los últimos avances tecnológicos continua siendo un tumor letal. En Colombia es, por amplio margen, el cáncer de mayor incidencia y de mayor mortalidad y es reconocido en sus zonas montañosas (regiones andinas) tiene un alto índice de prevalencia, llegando a ser en el departamento de Nariño a un índice de 160 x 100.000 habitantes dato este de los más altos informados en el mundo (Correa, P. 1976).

En las tasas de mortalidad en Colombia por cáncer, el del estómago supera ampliamente en hombres al de cualquier otra localización y en mujeres esta muy paralelo, este índice de mortalidad con el de cérvix-uterino; por esto, en cuanto a cáncer se refiere, el del estómago en ciertos países, como en Colombia es un verdadero problema de salud pública (Delgado, D.A. 1983).

Se ha propuesto un plan dietario para la prevención del cáncer gástrico basado en la reducción de la ingesta de alimentos con alto contenido de sal y el incremento de la ingesta de frutas y vegetales. Se llevo a cabo en el Departamento de Nariño un ensayo clínico que pretende averiguar si la suplementación dietética con micronutrientes antioxidantes (beta-caroteno y vitamina C) y el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori* que retarda o detiene el proceso de las lesiones precancerosas (Correa, P. 1992).

Helicobacter pylori ha sido reconocido como importante patógeno del tracto digestivo superior y considerado por la organización mundial de la salud como factor carcinogénico probado - tipo I - causante de la gastritis crónica tipo B así como un factor decisivo en el desarrollo de la úlcera péptica, sobre todo la duodenal, en el linfoma gástrico de células B y en el desarrollo de cáncer gástrico. Por lo tanto este trabajo demuestra el efecto *in vitro* de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* sobre el crecimiento de un aislado del enteropatógeno *Helicobacter pylori* pudiéndose observar que la bacteria láctica es capaz de inhibir el crecimiento del enteropatógeno, en éste sentido se propone su utilización en un futuro en el control y prevención de enfermedades gastrointestinales asociadas al patógeno.

1. *Helicobacter pylori*

1.1 PERSPECTIVA HISTÓRICA

Los más recientes avances en gastroenterología han llevado a un cambio radical en el enfoque y el tratamiento de las alteraciones previamente conocidas como "ácido pépticas", el viejo concepto de que la hipersecreción de ácido clorhídrico era la causa fundamental de la úlcera gástrica y duodenal, ha sido renovado por una visión más amplia en la que la hipersecreción ocupa un lugar secundario y en cambio, una enfermedad infecciosa causada por *Helicobacter pylori* desempeña un papel protagónico (Peura, D.A 1995).

Los intentos para comprender el efecto sobre la mucosa gástrica de los nuevos fármacos antiulcerosos pero no antiseoretos (por ejemplo, sucralfato y carbenoxolona sódica), comenzaron a restaurar el interés por la mucosa gástrica (Graham, D.Y. 1998)

Warren (1983) no fue el primer patólogo moderno que observó e investigó la relación entre las bacterias espirales y la gastritis (Graham, D.Y. 1998). A mediados de la década de 1970 Steer, comenzó a publicar datos sobre la asociación entre las bacterias espirales y la inflamación de la mucosa (Steer, H.W. 1985). En Australia, Robin Warren, aparentemente desconocedor del elegante trabajo de Steer, observó también la asociación entre las bacterias de la mucosa y la gastritis. Warren efectuó la observación crítica de que éstas bacterias se parecían morfológicamente a *Campylobacter jejuni*, que había sido descrito hacía muy poco tiempo como una causa importante de

diarrea en los humanos (Graham, D.Y. 1998).

Warren fue capaz de convencer a Barry Marshall, un residente de Medicina, para que intentara aislar el microorganismo a partir de biopsias de la mucosa gástrica. Marshall, trabajando en el laboratorio de microbiología de Stewart Goodwin, llevó a cabo esta tarea con la ayuda de la suerte y de una excelente técnica (Marshall, B.J. 1984), demostrando en 1983 que casi la totalidad de pacientes con úlcera duodenal y por lo menos el 80% de los que tenían úlcera gástrica tenían un bacilo espiral en la mucosa gástrica (Graham, D.Y. 1998).

Posteriormente, la bacteria se clasificó como perteneciente al género *Helicobacter* hoy se conoce como *Helicobacter pylori* (López B., M. 2002) . La contribución de los científicos fue más allá, debido a que además lograron definir el medio apropiado para su cultivo (agar sangre en un medio microaerófilico) y obtuvieron el crecimiento de la bacteria a partir de biopsias tomadas de pacientes con úlcera. La explosión de investigaciones que siguieron a este hallazgo condujo a la obtención de suficientes datos que permitieron establecer la relación causal entre la presencia de *H. pylori* y de úlcera gástrica y duodenal, así como de gastritis crónica antral (o de tipo B) (Ramos, F.J. 1997).

Finalmente, el hallazgo más reciente en el cúmulo de conocimientos sobre el tema es la asociación entre presencia de *H. pylori* y mayor proclividad al desarrollo de adenocarcinoma gástrico o tumores malignos de origen linfoide. Tal información ha convertido este germen en uno de los microorganismos más estudiados como factor medioambiental determinante en el origen de las neoplasias (Correa, P. 1991).

1.2 ETIOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGIA

La úlcera péptica gastroduodenal ha sido considerada hasta hace pocos años, como una enfermedad de causa desconocida y de origen multifactorial. Desde el descubrimiento de la frecuente asociación con *Helicobacter pylori*, la etiología de la enfermedad ulcerosa se ha simplificado notablemente, siendo ésta la causa más frecuente ya que se presenta más del 90% de las úlceras duodenales y el 80-85% de las úlceras gástricas; un segundo grupo, mucho menos numeroso (5-15%), lo constituyen las relacionadas con el consumo de fármacos antiinflamatorios no esteroides (AINES) y finalmente una causa muy infrecuente, es la relacionada con la hipersecreción gástrica (Síndrome de Zollinger-Ellison) y otras patologías afines (Hanson, L.E. *et al* 1995).

Algunos factores epidemiológicos de la infección por *Helicobacter pylori* son ciertamente reveladores de la trascendencia que ha tenido sobre determinadas afecciones digestivas. *Helicobacter pylori* presenta una distribución mundial y existen dos patrones claramente diferenciados. Uno que se presenta en los países subdesarrollados que se caracteriza por una elevada prevalencia junto con una rápida adquisición en la infancia y otro patrón característico de los países desarrollados en que la prevalencia es media y la infección se adquiere más tardíamente en la vida. En el primero parece predominar la transmisión oral-fecal y en el segundo el mecanismo fundamental parece ser el oro-oral (Megraud, F. 1993). La prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* se relaciona básicamente con la influencia de factores medioambientales como el nivel higiénico-sanitario y la edad del individuo (Ferrándiz, S.J. *et al* 1999).

1.3 MECANISMOS PATOGENICOS EN LA INFECCIÓN POR *Helicobacter pylori*

Las bacterias patógenas que infectan a los organismos superiores han desarrollado numerosas estrategias para sobrevivir en ellos, y a su vez estos organismos, a través de su evolución, han formado mecanismos de defensa sofisticados. Esta claro que *Helicobacter pylori* no es un comensal que forme parte de la flora normal de la mucosa gástrica de los humanos; generalmente las personas infectadas por *H. pylori* tienen un proceso inflamatorio crónico superficial y difuso que incluye el antro y el cuerpo del estómago. Por tal motivo se ha reconocido que *H. pylori* es un patógeno y en la actualidad está considerado como el patógeno más importante en los humanos (Pérez P., G.I. 1998).

Las enzimas metabólicas que poseen pueden ser utilizadas por *H. pylori* para producir daño en los tejidos y para defenderse de las condiciones adversas del ambiente en el que debe sobrevivir pero además, *H. pylori* posee otras características que le permiten colonizar la mucosa gástrica del estómago, inducir daños en los tejidos o liberarse de los mecanismos de defensa del huésped (López B., M. 2000).

Entre estas características podemos destacar:

1.3.1 Estructura Espiral. La propia estructura de la bacteria le permite introducirse a través de la capa de moco gástrico actuando de forma similar a un sacacorchos y favoreciendo por lo tanto el acercamiento a las células epiteliales gástricas (López B., M. 2002).

1.3.2 Movilidad. *Helicobacter pylori* es una bacteria extremadamente móvil y de rápidos movimientos en forma de tirabuzón. Presenta un grupo de cuatro a seis flagelos en uno de los polos, que le permiten mantener la movilidad en medios viscosos como la capa de moco que recubre el epitelio gástrico. La bacteria es capaz de responder a estímulos quimiotácticos gracias a la presencia de estos flagelos (Pérez P., G.I. 1998).

1.3.3 Actividad mucolítica. Como consecuencia de la actividad ureasa de *Helicobacter pylori*, el moco procedente de estómagos infectados, tiene una concentración de amoníaco unas cuatro veces superior a la del moco no infectado. El amoníaco puede ser un lesionante directo, pero también es el causante del aumento de pH lo que puede alterar la interacción entre las fracciones lipídicas y proteica del moco responsable de la estabilización de la estructura micelar del mismo. Como consecuencia, se produce una alteración de la viscosidad que puede contribuir a una disminución de la capacidad para retrasar la difusión de H⁺ (Delgado B., J.D. 1992)

1.3.4 Adherencia a la mucosa gástrica. La adherencia es un requisito indispensable en muchas bacterias para que se lleve a cabo la colonización de las mucosas. Sin adhesión las bacterias que intentan colonizar las mucosas serían fácilmente eliminadas por la simple acción mecánica del órgano afectado. Las adhesinas, además de ser importantes en la colonización, en el caso específico de *H. pylori*, también pueden ser importantes en la inducción del proceso inflamatorio (Rozalski, A G. et al 1997).

La adhesión bacteriana está mediada por moléculas que reconocen proteínas o glicoproteínas presentes en la superficie de las células epiteliales. Las cepas de *H. pylori* tienen diferente afinidad

para aglutinar eritrocitos de mamíferos, lo cual indica la presencia de distintos tipos de adhesinas. Las adhesinas de *H. pylori*, están constituidas por una hemaglutinina radiante desde la superficie de la bacteria con estructura de tipo fimbrial que es antigénica para humanos y se asocia a la capacidad de *H. pylori* para adherirse a células adrenales (Pérez P., G.I. 1998).

1.3.5 Ureasa. Todos los aislamientos de *Helicobacter pylori*, producen grandes cantidades de la enzima ureasa, aunque ésta aparentemente no tiene un papel importante en la producción del daño celular o en la producción de síntomas, es claro que su presencia es esencial para *H. pylori*, pues le permite sobrevivir en el ambiente hostil de la cavidad gástrica, en donde la actividad de la ureasa le va permitir generar iones amonio que neutralizan la acidez. Por otra parte, la producción de amonio puede ser un factor citotóxico para las células epiteliales de la mucosa gástrica de los pacientes infectados y puede exacerbar el daño de la mucosa gástrica asociada a los neutrófilos (Pérez P., G.I. 1998).

1.3.6 Enzimas destoxificantes. La colonización de la mucosa por *H. pylori*, induce una vigorosa respuesta local y sistémica por parte del huésped, en la cual destaca la infiltración con numerosos leucocitos polimorfonucleares y mononucleares en el sitio de la infección. A pesar de ello *H. pylori* es capaz de persistir en la mucosa gástrica, lo que sugiere la existencia de mecanismos que le protegen de la fagocitosis (Pérez P., G.I. 1998).

Entre estas proteínas están la catalasa y la superóxido bismutasa. La enzima catalasa de *H. pylori* es una proteína de 50 KD de peso molecular que se produce en grandes cantidades. Sin embargo, su papel en la inhibición de la fagocitosis no está bien definida; la superóxido bismutasa es otra

enzima que se ha propuesto como posible mecanismo de defensa contra la fagocitosis y que se detecta en todos los aislamientos de *H. pylori* (Pérez P., G.I. 1998).

1.3.7 Lipopolisacáridos. En el caso particular de lipopolisacáridos (LPS) de *H. pylori*, la presencia de ácidos grasos de cadena larga (18-20 carbonos) explica en parte la poca actividad biológica del lípido A. Aunque la actividad biológica del LPS de *H. pylori* es escasa, induce la producción de factor de necrosis tumoral (TNF) y de interleucina 1 (IL 1), entre otras (Pérez P., G.I. 1998). Recientemente Sakagami y cols, han demostrado la importancia del LPS en la regulación de la gastritis y la atrofia de la mucosa antral mediada por el huésped, usando el ratón como modelo experimental (Sakagami, T. *et al* 1997).

Por otra parte, hay una marcada diversidad en la longitud y antigenicidad de las cadenas polisacáridas en *H. pylori* aunque no está bien estudiado. La diversidad del LPS pudiera estar relacionada con la virulencia del microorganismo, por su interacción con los neutrófilos o por la habilidad que presenta para adherirse a las células epiteliales (Pérez P., G.I. 1998).

1.3.8 Toxina vacuolizante. Fue descrita originalmente por Leunk y cols (1998), la citotoxina induce la formación de vacuolas ácidas en el citoplasma de las células eucariotas, y éstas vacuolas acumulan el colorante rojo neutro, lo que hace fácil su demostración y cuantificación (Pérez P., G.I. 1998).

La citotoxina es activa para un gran número de células eucariotas y causa ulceración de la mucosa gástrica en el ratón. El mecanismo de la citotoxina no está completamente claro. Sin embargo, se

sabe que su actividad es restringida por sustancias que inhiben la ATPasa vacuolar en células eucariotas. El gen que codifica para la citotoxina vacuolizante (vac A), produce una proteína con un peso molecular estimado de 139 KD, mientras que la toxina purificada experimentalmente tiene un peso molecular de 87 KD (Pérez P., G.I. 1998).

1.3.9 Proteína CagA. Además de la actividad citotóxica, las cepas de *Helicobacter pylori* también varían en la expresión de una proteína antigénica de alto peso molecular denominada CagA. Aproximadamente 60% de los aislamientos de *Helicobacter pylori* producen ésta proteína, y su presencia se asocia con la expresión de la actividad vacuolizante de la citotoxina. El gen *cagA* no está presente en las cepas que no expresan CagA y hasta ahora éste es el único gen que se ha identificado que no está presente en todas las cepas de *H. pylori*. El gen *cagA* no es esencial para la supervivencia de *H. pylori*, ya que el 40% de las cepas carecen de él, su interrupción no elimina la actividad citotóxica a pesar de la asociación tan estrecha entre esos dos genes. En realidad la proteína CagA presenta un rango de 105 a 140 KD (Pérez P., G.I. 1998).

1.4. MICROBIOLOGIA Y TAXONOMIA DE *Helicobacter pylori*

Diferentes especies del género *Helicobacter* se pueden encontrar en los humanos y otros mamíferos. El número de especies de *Helicobacter* descritas hasta ahora y a que huéspedes afectan, se observan a continuación (Hirschl, A.M. 1998).

Nombre de la especie de <i>Helicobacter</i> y huéspedes descritos hasta el momento actual.	
ESPECIE	HUÉSPED
<i>H. pylori</i>	Hombre
<i>H. mustelae</i>	Hurones
<i>H. felis</i>	Perro, gato
<i>H. nemestrinae</i>	Macaco
<i>H. acinonyx</i>	Leopardo
<i>H. heilmannii</i>	Hombre, gato
<i>H. bizzozeroni</i>	Perro
<i>H. muridarum</i>	Ratón, rata
<i>H. cinaedi</i>	Hombre
<i>H. fennelliae</i>	Hombre
<i>H. rappini</i>	Hombre, perro
<i>H. hepaticus</i>	Ratón
<i>H. bilis</i>	Ratón
<i>H. pametensis</i>	Pájaros, cerdo
<i>H. pullorum</i>	Hombre, aves de corral
<i>H. trogontum</i>	Rata
<i>H. westmeadii</i>	Hombre

Fuente: Pajares G., J.M.

Helicobacter pylori: Se describe como un bacilo Gram negativo en forma de S o de bastón curvado, con una anchura de 0.5-0.9 μ m y una longitud de 2-4 μ m y con uno ó tres espirales. Se han observado, en cultivo o *in vivo*, otras formas de *H. pylori*, como cocoide, en forma de V o de U y también de forma recta; en los cultivos en medios sólidos predomina la forma de bastón. Al microscópico óptico normalmente muestra entre 4 y 6 flagelos polares. Las células bacterianas son en su mayoría móviles (Hirschl, A.M. 1998).

En los cultivos viejos predominan habitualmente las formas cocoides. Estas no se pueden cultivar con los métodos tradicionales en el laboratorio, pero existen evidencias de que éstas formas pueden ser viables e incluso infecciosas (Hirschl, A.M. 1998).

Desde su cultivo en 1983 ha recibido diferentes denominaciones hasta adquirir el nombre definitivo (López B., M. 2002):

CLO (*Campylobacter like organism*),

GCLO (*Gastric Campylobacter like organism*),

Campylobacter pyloridis,

Campylobacter pyloric,

Campylobacter pylori.

Helicobacter pylori: (1989) especie tipo de un nuevo género.

1.5 ESTRATEGIAS PARA LA DETECCIÓN DE *Helicobacter pylori*

La presencia de *Helicobacter pylori* puede ser demostrada por métodos directos e indirectos. Los primeros requieren, en general, de técnicas invasivas, con toma de muestra de mucosa gástrica o duodenal para su análisis. En los segundos se obtiene muestras del aire exhalado, de la materia fecal o del suero, ya sea para cultivar el germen o para detectar la presencia de metabolitos producidos por el, o de anticuerpos dirigidos contra proteínas específicas del *Helicobacter pylori*. (Marshall, B.J. 1993).

1.5.1 Pruebas invasivas

1.5.1.1 Cultivo. Es el sistema de mayor especificidad y el más difícil de realizar por las dificultades microbiológicas. Además desde el punto de vista técnico es una prueba laboriosa ya que la muestra

requiere condiciones especiales de transporte e incubación. Por otro lado el cultivo de las colonias de *Helicobacter pylori* presenta un difícil crecimiento (3-10 días) que lo inhabilita para el diagnóstico rápido (Pajares G., J.M. 1998), y precisa ciertas condiciones de cultivo como: Una atmósfera microaerofílica, con una baja concentración de oxígeno y alta concentración de anhídrido carbónico (5-10%). Un medio de cultivo rico en nutrientes y que contenga sangre de carnero, caballo o humana o productos derivados de la sangre (López B., M. 2002).

Requiere de un periodo de incubación extraordinariamente prolongado con una temperatura de 35° - 37° C comparado con el resto de las bacterias Gram negativas (López B., M. 2002). El medio de cultivo no puede ser selectivo basado en sangre, o selectivo, siendo el de Skirrow muy usado. Para conseguir un buen crecimiento de *H. pylori* se aconseja que se utilicen en el cultivo los dos medios (selectivo y no selectivo) preparados recientemente. El cultivo es el método con menor sensibilidad, ya que es variable en los diferentes laboratorios microbiológicos según el interés y la experiencia del microbiólogo (Pajares G., J.M. 1998).

1.5.1.2 Histología. Es muy útil y práctico por que permite hacer el diagnóstico de las lesiones de la mucosa gastroduodenal y a la vez que el de la infección por *Helicobacter pylori*. No es necesario orientar la biopsia para la identificación de *H. pylori* si bien aumenta la sensibilidad y la especificidad del método y es aconsejable para el análisis histopatológico (Pajares G., J.M. 1998).

Se han establecido parámetros para informar la presencia de *H. pylori* clasificándola en cuanto a su densidad, en leve, moderada e intensa (Sarmiento Q., F. *et al* 1998). Para su identificación existen

numerosos métodos especiales de tinción, todos con un índice de sensibilidad del 85 al 90 % mientras que la especificidad es casi del 100% dependiendo en alguna medida de la experiencia del patólogo y de la biopsia, del tamaño, fijación y la tinción apropiada (Pajares G., J.M. 1998), las más utilizadas son:

- **Tinción de Hematoxilina-eosina:** Es adecuada para identificar la bacteria, aunque exige una especial atención del patólogo (Pajares G., J.M. 1998), es la más económica, además de identificar al *H. pylori*, simultáneamente da información sobre el grado de compromiso inflamatorio y en adultos la evolución de procesos atróficos o malignos, es la de menor sensibilidad y especificidad para detectar *Helicobacter pylori* y la experiencia del patólogo es más determinante (Kolts, B.E. *et al* 1998).
- **Tinción de Giemsa:** Tiene una excelente sensibilidad, permite una correcta identificación del microorganismo es barata y rápida de ejecutar (Ferrándiz S., J. *et al* 1999), por su facilidad y nitidez de la imagen se ha convertido en el método de rutina en la mayoría de los centros de histopatología (Pajares G., J.M. 1998).
- **Tinción de Plata Warthin-Starry:** Emplea el nitrato de plata, con los que se logra una nítida definición de los cuerpos bacterianos es una técnica de larga duración y delicada de realizar (Pajares G., J.M. 1998), es de mayor costo e implica la manipulación de reactivos de alta toxicidad (Cutter, F.A. 1995).

- **Otras tinciones:** (Naranja de acridina, Carbol-fucsina, Brown-hopps, Acetato de crisil-violeta, Azul de metileno), aunque con buena sensibilidad y especificidad, no superan a las mencionadas previamente (Ferrándiz S., J. *et al* 1999).

- **Otras técnicas.** Inmunohistoquímica o inmunofluorescencia con anticuerpos mono/policlonales frente a *Helicobacter pylori* se utilizan en estudios de investigación por su laboriosidad, complejidad y costos (Ferrándiz S., J. *et al* 1999).

1.5.1.3 Prueba rápida de la ureasa. Se fundamenta en que *H. pylori* produce la enzima ureasa en grandes cantidades y de gran potencia (Pajares G., J.M. 1998). Es el método más generalizado por lo práctico, rápido, sensible, específico y poco costoso (Sarmiento Q., F. *et al* 1998). Esta reacción es alcalina, lo que modifica el color del indicador rojo fenol añadido, que cambia de color amarillo a rojo señalando el resultado positivo por el cambio de pH en el medio (Pajares G., J.M. 1998). El tiempo de aparición y la intensidad del color, son directamente proporcionales a la cantidad de bacterias presentes en la muestra (Riegg, S.J. *et al* 1995).

De los preparados comerciales el CLO-TEST (prueba de *Campylobacter like organism*) y el CU-TEST son los más populares, son de sensibilidad y especificidad elevada, puede haber falsos positivos en los casos de intensa aclorhidria por el sobrecrecimiento de bacterias productoras de ureasa (*Proteus, Klebsiella*)(Pajares G., J.M. 1998).

1.5.1.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se puede realizar sobre biopsia gástrica y en cualquier líquido orgánico (heces, saliva y jugo gástrico), es de gran sensibilidad y especificidad,

porque puede detectarse hasta una sola copia de DNA de *H. pylori* (Pajares G., J.M. 1998). Tiene varias limitaciones, es costosa, el resultado no es inmediato, requiere una solución buffer especial para depositar la muestra de tejido y congelarla hasta su determinación y exige un laboratorio de alta tecnología (Megraud, F. 1995).

1.5.2 Pruebas no invasivas. Se llaman así las que no precisan la obtención de muestras de mucosa gástrica por endoscopia, disminuyen el costo de procesamiento y aceleran el resultado esto hace que sean de gran aceptación para detectar la presencia de *H. pylori*, sobre todo en pediatría pero limitadas solo a estudios epidemiológicos y a la confirmación de la erradicación de la bacteria después del tratamiento específico, y no deben utilizarse para el diagnóstico de la enfermedad ácido-péptica (Sarmiento Q., F. *et al* 1998).

1.5.2.1 Serología. Es la de más fácil realización, basada en la detección de anticuerpos específicos frente a antígenos de *H. pylori* como consecuencia de la reacción inmunológica local / sistémica del individuo (Ferrándiz S., J. *et al* 1999). La sensibilidad y especificidad depende del antígeno utilizado, de la mezcla de las cepas empleadas en su preparación y de la respuesta inmunológica que logre generar el huésped. Las numerosas pruebas disponibles, se basan en una técnica de ELISA que detecta niveles de inmunoglobulinas G (Sarmiento Q., F. *et al* 1998). Unos test son cualitativos, muy rápidos porque precisan únicamente unas gotas de sangre total y pueden efectuarse en la consulta del médico, otros requieren más tiempo, con mayor dificultad de realización, pero son más exactos y cuantitativos (Pajares G., J.M. 1998), pero no sirven para confirmar la eficacia del tratamiento antimicrobiano en la erradicación de la bacteria, ya que después

del tratamiento el título de anticuerpos desciende muy lentamente, con una disminución significativa a partir del sexto mes de tratamiento (Hirschl, A.M. *et al* 1993).

1.5.2.2 Prueba de aliento con urea marcada con carbono isotópico (C¹⁴ C¹³). Se basa en la capacidad que tiene *H. pylori* de hidrolizar urea gracias a su ureasa. Después de ingerir urea marcada, con carbono 14 o carbono 13, se puede medir la cantidad de CO₂ marcado liberado mediante espectrofotometría de absorción atómica, que se producirá cuando el paciente está infectado con *H. pylori* (Gasbarrini, G. *et al* 1998). Es una prueba fácil, cómoda, simple de realizar, bien tolerada. El Carbono 13 es un isótopo estable, no radiactivo, aplicable a niños y embarazadas, que no requiere manipulación con licencia, pero que presenta la desventaja de precisar un equipo con espectrofotómetro de masas (Pajares G., J.M. 1998).

El Carbono 14 es más barato, pero es radiactivo (aunque emite una dosis baja), precisa licencia para el manejo y almacenamiento adecuado, no es aplicable a niños y embarazadas (Ferrándiz S., J. *et al* 1999). Su principal uso, fuera de los estudios epidemiológicos, se circunscribe al seguimiento de pacientes después de tratamiento (Sarmiento Q., F. *et al* 1998).

1.5.2.3 Otros métodos. Se ha estudiado los anticuerpos en saliva, frente a *H. pylori* los cuales están a una concentración menor que en la sangre sin embargo la sensibilidad y la especificidad son menores que las de la prueba rápida en sangre total y la de ELISA en suero (Pajares G., J.M. 1998). El cultivo de materia fecal aunque tiene la ventaja de ser un método no invasivo y altamente específico, posee una sensibilidad muy baja que limita su aplicación para el diagnóstico de rutina en medicina clínica (Pajares G., J.M. 1998).

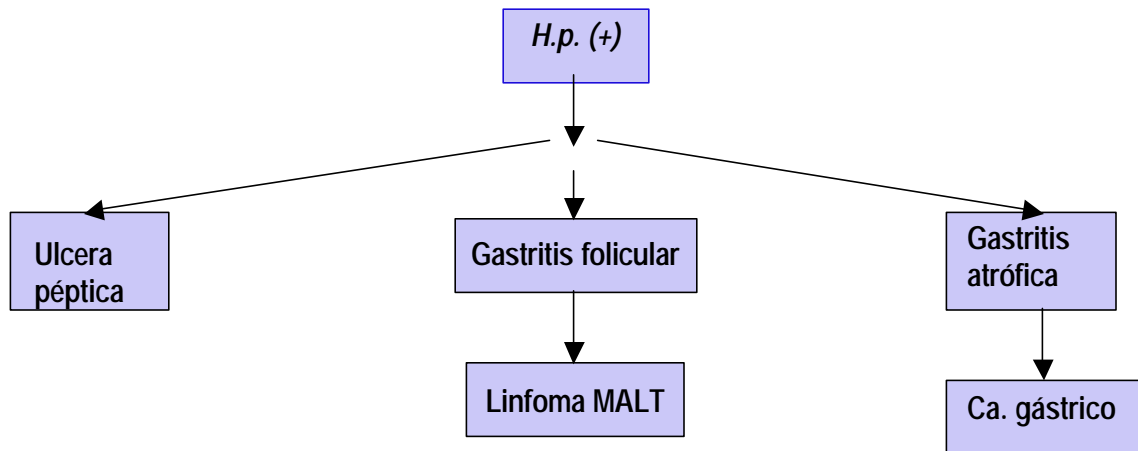
1.6. ASOCIACIÓN ENTRE *Helicobacter pylori* Y ENFERMEDADES GÁSTRICAS

Las especies de *H. pylori* aisladas del estómago humano y animal han sido recientemente objeto de una amplia investigación por su papel causal en el desarrollo de enfermedades gástricas (Marshall, B.J. 1983). En la actualidad se sabe que *H. pylori* produce una gastritis activa crónica y úlceras pépticas en los humanos y se le ha relacionado también con el desarrollo de adenocarcinoma gástrico y de linfoma asociado a la mucosa gástrica (Correa, P. *et al* 1990). *H. pylori* se ha aislado también de la mucosa gástrica inflamada de algunas especies seleccionadas de primates no humanos (Baskervill, A. *et al* 1998), y muy recientemente en gatos domésticos (Handt, L.K. 1995), entre otros trabajos.

Raramente se encuentra una mucosa gástrica normal en pacientes con infección asociada a *H. pylori* lo que sucede a lo sumo en el 4% de los pacientes lo más habitual es que presenten una gastritis crónica activa asintomática la prevalencia en úlcera duodenal es muy elevada del orden del 95% de los casos y en la úlcera gástrica incluyendo la toma de AINES esta alrededor del 70%, pero excluyendo estos, pueden alcanzar valores del 80 al 85% de los casos en la dispepsia funcional no ulcerosa, la prevalencia de infección por *H. pylori* es similar a la de la población general y se sitúa alrededor del 50% de los casos (Talley, N.J. 1991).

La historia natural de la infección por *H. pylori* en relación con la patología gastroduodenal benigna y maligna viene aquí representada esquemáticamente (Correa, P. 1991).

HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR *Helicobacter pylori*



Fuente: Correa, Pelayo 1991.

La gastritis crónica antral frecuentemente se asocia con la aparición de folículos linfoides y en algunos individuos susceptibles puede al cabo de muchos años, dar lugar a la aparición de linfomas. La infección por *H. pylori* aunque silente en la mayor parte de los casos, por ser completamente sintomática, a lo largo de su historia puede manifestarse como una úlcera péptica que la vienen a desarrollar uno de cada seis infectados. Su asociación con el cáncer gástrico se establece según la teoría del Dr. Pelayo Correa, a través del paso de gastritis crónica activa a gastritis atrófica, metaplasia intestinal, displasia y el desarrollo de adenocarcinoma (Correa, P. 1991).

1.7 TRATAMIENTO POR LA INFECCIÓN DE *Helicobacter pylori*.

La indicación de tratamiento la constituyen todos los pacientes sintomáticos en que se ha demostrado la infección y preferiblemente con la realización previa de endoscopia con toma de biopsia y cultivo microbiológico (López B., M. 2002). Los factores básicos que deben considerarse en la instauración de un tratamiento son la mejoría de la cicatrización ulcerosa, la reducción de las

recidivas, la prevención de las complicaciones, la mejoría del sustrato histológico gástrico. La relación costo-efectividad y muy especialmente, la adherencia al tratamiento por parte del paciente (McCarthy, C.J. 1992).

1.7.1 Esquemas terapéuticos. El tratamiento por la infección de *H. pylori* en niños al igual que en adultos se puede presentar en los siguientes esquemas (Katz, U. *et al* 1998):

- **Doble terapia con un fármaco antisecretor:** consiste en un inhibidor de la bomba de protones o un antagonista H² y amoxicilina o claritromicina. Durante 14 días.

- **Terapia triple convencional:** incluye la administración de bismuto, nitroimidazol y amoxicilina o tetraciclina. El tratamiento triple convencional puede complementarse con un fármaco antisecretor. Durante 7 días.

- **Terapia triple con un fármaco antisecretor:** consiste en un inhibidor de la bomba de protones o un antagonista H₂ y dos de los tres antibióticos: amoxicilina, claritromicina, o nitroimidazol. Durante 7 días.

2. BALANCE GASTROINTESTINAL

La microbiota del aparato intestinal humano es un complejo ecosistema, el cual desarrolla una variedad de actividades únicas que son importantes para la salud. Hay más de cuatrocientas especies distintas de bacterias en el tubo digestivo; su densidad aumenta paulatinamente desde el

estómago, hasta el colon donde alcanza su máxima. Estas bacterias se encuentran perfectamente adaptadas al ser humano como hábitat natural desde hace millones de años y por otra parte, el hombre no podría sobrevivir sin su biota intestinal (González M., Blanca *et al* 2001).

La mayor parte de estas bacterias son microorganismos que mejoran la salud, de los que depende el portador para su bienestar. Otras pueden ser dañinas pero las mismas se encuentran en cantidades suficientes para causar daño, posiblemente por su competencia con otras bacterias asociadas no patógenas de la biota (Zetterstrom, R. 1994), adicionalmente las toxinas bacterianas y los componentes celulares producidos por algunas especies de bacterias, modifican sus respuestas inmunológicas, promoviendo o inhibiendo dichas funciones. La biota benéfica protege el tracto gastrointestinal de la proliferación o infección por bacterias patógenas, mientras que algunas cepas manifiestan patogenicidad solo cuando la resistencia del huésped se ve disminuida (Torres, R 1992).

El desarrollo de la microbiota intestinal ocurre en estadios a lo largo de la vida, y es influenciado por la dieta, el estado clínico, las condiciones ambientales. Luego de pocas horas seguidas del nacimiento el tracto gastrointestinal del recién nacido, antes estéril, adquiere un balance parejo entre bacterias aeróbicas y anaeróbicas (Zetterstrom, R. 1994).

2.1 FUNCIONES DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

La microbiota ejerce múltiples funciones que se pueden clasificar en dos categorías principales: metabólicas y nutricionales y protectoras (Saloff-Coste, C.J. 1996).

2.1.1 Metabólicas y nutricionales

- Regulación de la acidez (pH) del contenido intestinal.
- Metabolismo de los ácidos y pigmentos biliares y de esteroides.
- Degradación del colesterol.
- Metabolismo de numerosos medicamentos.
- Síntesis de algunas vitaminas particularmente B12, K y ácido fólico.
- Rescate colónico de nutrientes (esencialmente hidratos de carbonos y proteínas), que no han sido degradados y absorbidos por el intestino delgado y que llegan al colón. Este fenómeno resulta en la producción de ácidos grasos de cadena corta, también llamados volátiles, que son absorbidos por el colon. Este mecanismo limita la pérdida de energía que representaría la excreción de estos nutrientes por las deposiciones.

2.1.2 Protectoras

- Estimulación del sistema inmune del intestino.
- Protección frente a bacterias patógenas, limita el crecimiento del microorganismo potencialmente patógeno en el intestino e interactuando con sustratos no absorbidos de la dieta.

La biota intestinal es vulnerable a determinadas condiciones. En adultos varía notablemente ya que depende de varios factores como la alimentación, los genes, el medio que habita, tratamientos con antibióticos, estrés, medicamentos, infecciones, edad, clima, intervenciones quirúrgicas en estómago o intestino, enfermedades hepáticas, renales, cáncer. Tener una biota estable y bien equilibrada es

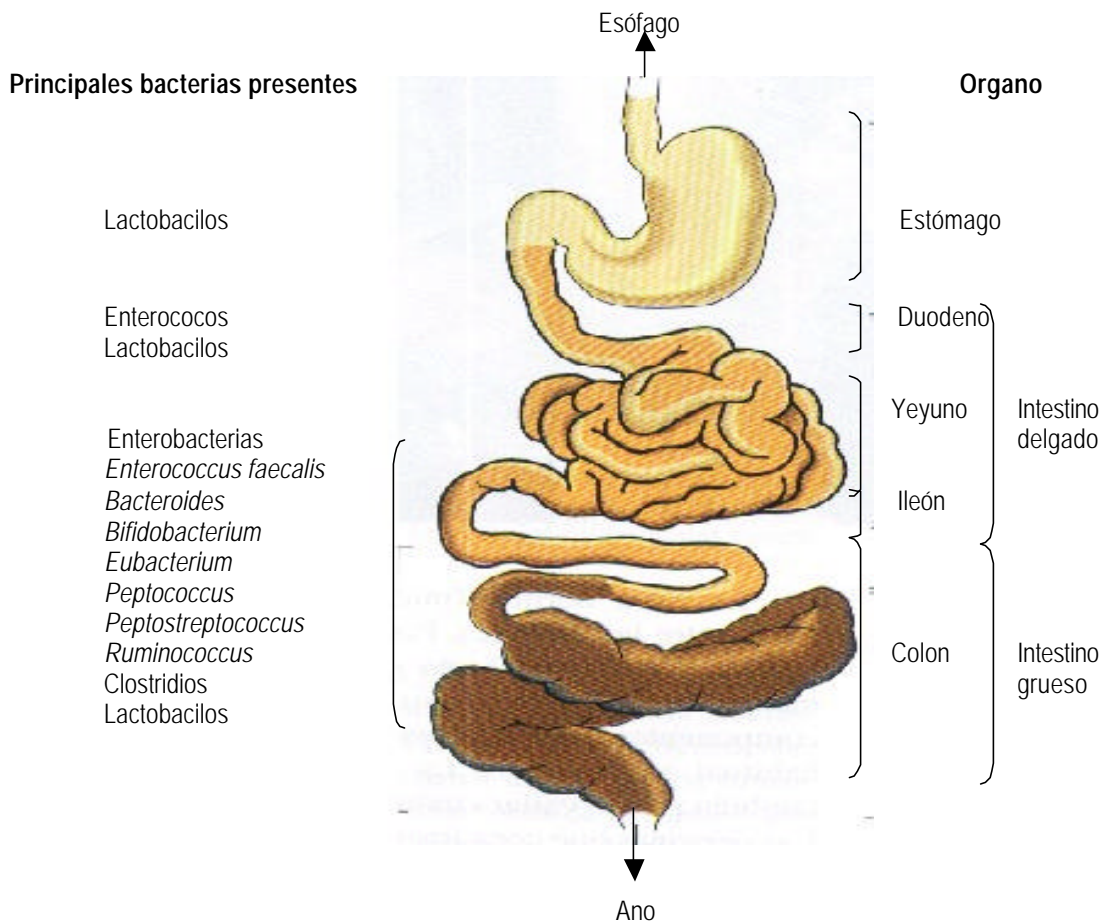
una garantía de buena salud ya que evita la colonización y sobre-desarrollo de microorganismos patógenos mediante varios mecanismos como la competencia y la síntesis de bacteriocinas y bacteriófagos (Pujato, D. 2002).

La actividad investigativa enfoca sus esfuerzos en lograr por medio del uso de bacterias lácticas, restaurar o mantener el equilibrio y el balance microbiótico intestinal con diversos propósitos y desarrollarlos empleando bacterias entéricas humanas (Morelli, L. 1992).

2.2 MICROBIOTA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL

El desarrollo de la microbiota intestinal ocurre en estadios a lo largo de la vida, y es influenciado por la dieta, el estado clínico y las condiciones ambientales. El tipo de alimentación influye significativamente sobre el desarrollo de la microbiota, particularmente la del colon. La microbiota es en un todo mucho menos compleja de lo que aparenta, es muy sensible a su entorno y tiene una tendencia muy grande a fluctuar. A pesar de que la microbiota es derivada de la biota de la madre, la misma no es una réplica exacta de la de ésta; la del lactante contiene aquellas bacterias apropiadas para el niño, y esta compuesta primeramente por *Enterococci*, *E. coli* no patógena, *Bifidobacterias* y *Bacteroides* (Zettersom, R. 1994). A los dos años de edad, la composición del metabolismo del niño se asemeja a la de los adultos en muchos aspectos y se vuelve más estable. Aún cuando la biota se mantiene estable, cambios transitorios en su composición pueden modificar sus funciones (Guerin, C. 1997)

La población total y la composición de la microbiota bacteriana varían mucho en las diferentes partes del tracto digestivo, y dependen del pH y el oxígeno. La concentración de microbiota es más baja en el estómago y la concentración más alta se encuentra en el colon, donde se halla niveles muy elevados, como se observa en el esquema (Madigan, M. *et al* 1999).



En el tracto gastrointestinal humano, el lugar de la digestión de los alimentos, se compone de estómago, intestino delgado e intestino grueso. El pH de los fluidos del estómago es bajo, aproximadamente pH 2. El estómago puede considerarse, por tanto, como una barrera microbiológica contra la entrada de bacterias extrañas en el tracto intestinal. Aunque el recuento de

bacterias del contenido gástrico es generalmente bajo, las paredes del estómago a menudo se encuentran intensamente colonizadas por bacterias. Estas son primariamente *Lactobacillus* y *Streptococcus* tolerantes a los ácidos y pueden observarse en grandes cantidades en las secciones histológicas o mediante la microscopía electrónica de barrido del epitelio gástrico. Estas bacterias aparecen muy precozmente después del nacimiento y se asientan hacia la primera semana (Madigan, M. *et al* 1999).

El intestino delgado está dividido en tres partes, el duodeno, yeyuno y íleon. El primero, adyacente al estómago, es ligeramente ácido y recuerda al estómago en cuanto a su biota, de los microorganismos presentes. La mayoría son cocos y bacilos Gram positivos como *Streptococcus*, *Lactobacillus sp.* *Clostridium perfringens*. Desde el duodeno al íleon el pH se hace progresivamente menos ácido y aumenta el número de bacterias. En el yeyuno se encuentran especies de Enterococos, Lactobacilos, Corinobacterias, *Eubacterium sp.*, *Streptococcus.*, *Clostridium perfringens*. También puede encontrarse la levadura *Candida albicans*. (Mateos, P.). En el íleon última parte del intestino delgado, las bacterias se encuentran en la cavidad intestinal (lumen) mezcladas con material digestivo, aquí la microbiota es más abundante y parecida a la del intestino grueso. En el íleon crecen bacterias anaerobias como *Bacteroides* y aerobios facultativos como *Escherichia coli*, otras bacterias como *Streptococcus.* *Lactobacillus sp.*, *Clostridium perfrngens* (Mateos, P.).

En el intestino grueso existen grandes cantidades de bacterias, tanto más cuanto que esta región puede considerarse como un recipiente de fermentación especializado. Muchas bacterias viven en el interior de su luz utilizando probablemente algunos nutrientes de la digestión de los alimentos.

La naturaleza de la microbiota del colon, no es constante. Un número de factores la pueden influenciar; drogas como los antibióticos, enfermedades o la naturaleza de la dieta pueden alterar el número y la variedad de bacterias en el colon. Sin embargo, en ausencia de cualquiera de estos factores, el patrón general de la microbiota en cualquier individuo tiende a permanecer medianamente constante, los individuos se inclinan a mostrar un patrón característico (Tannock, G. W. 1999). En el colon podemos encontrar aerobios facultativos como *E. coli.*, que se encuentra en cantidades mucho más pequeñas que otras bacterias. Las actividades de los aerobios facultativos es consumir todo el oxígeno presente, convirtiendo el ambiente del intestino grueso en estrictamente anaerobio y favorable para el crecimiento de anaerobios obligados. Muchos de estos anaerobios son bacilos largos, delgados Gram negativos con extremos en forma de huso (llamados fusiformes), y están fijados por su extremo a las pequeñas indentaciones de pared intestinal otros anaerobios obligados incluyen especies de *Clostridium* y *Bacteroides*, además, *Enterococcus faecalis* esta casi siempre presente en cantidades significativas (Madigan, M. et al 1999).

En ausencia de la microbiota cambian las condiciones microambientales del intestino grueso, y pueden establecerse microorganismo oportunistas tales como *Staphylococcus*, *Proteus* o la levadura *Candida albicans*. Estos organismos habitualmente no crecen en el tracto intestinal porque no son capaces de competir con la microbiota, ocasionalmente su establecimiento puede llevar a una alteración perjudicial de la función digestiva o incluso la enfermedad (Madigan, M. et al 1999). Se calcula que un adulto secreta alrededor de 30 billones de células bacterianas diariamente a través de la defecación. Se han aislado alrededor de 300 especies bacterianas de las heces humanas (Mateos, P.).

2.3 BACTERIAS ACIDO LACTICAS

Las bacterias ácido lácticas se han empleado para fermentar o crear cultivos de alimentos durante al menos cuatro milenios. Su uso más corriente se ha aplicado en todo el mundo a los productos lácteos fermentados, como el yogurt, queso, la mantequilla, la crema de leche, el kéfir y el koumiss (Stanier, R. *et al* 1986).

Las bacterias ácido lácticas constituyen un vasto conjunto de microorganismos benignos, dotados de propiedades similares, que fabrican ácido láctico como producto final de la fermentación. Se encuentran en grandes cantidades en la naturaleza, flora normal de la superficie de material vegetal (frutas y verduras), alimentos ricos en azúcares, leche y derivados, así como en nuestro tracto nasofaríngeo y gastrointestinal. Aunque se las conoce sobre todo por su labor de fermentación de productos lácteos, se emplean así mismo para encurtir vegetales en el horneado, en la panificación del vino, y para curar pescado, carne y embutidos (Stanier, R. *et al* 1986).

Obtienen energía exclusivamente por fermentación de azúcares, carecen de ciclo de Krebs funcional, el rendimiento de su cultivo es muy bajo: forman colonias muy pequeñas, en ciertos casos pueden usar azúcares para formar polímeros extracelulares de dextrano, requieren una gran cantidad de factores nutritivos (aminoácidos, bases nitrogenadas, algunas vitaminas): tienen unas posibilidades anabólicas muy limitadas lo que contribuye a reducir el rendimiento de su crecimiento, toleran bien concentraciones relativamente altas de ácidos y valores de pH más bajos que el resto de las bacterias por lo que pueden desplazarlas de los hábitats que colonizan (Stanier. R. *et al* 1966).

Varios estudios realizados en animales y humanos sugieren que las bacterias del ácido láctico o las leches fermentadas producen un efecto benéfico sobre las defensas naturales del organismo, por medio de tres líneas de defensa: La microbiota intestinal y su efecto barrera, el epitelio y la mucosidad, la inmunidad específica y no específica (Kato, Y., *et al* 1985).

2.3.1 La microbiota intestinal y efecto de barrera. El equilibrio de la microbiota intestinal puede ser moldeada por la ingestión de bacterias lácticas ya que aumenta el número de lactobacilos en diferentes partes del intestino; la ingesta de estas bacterias puede cambiar la función de la biota intestinal así como su composición. Estas defensas proveen una efectiva respuesta para la mayoría de los desafíos habituales e invasiones que el cuerpo tenga que sortear y que bajo circunstancias normales no afectan el sistema sistémico (Goldin, B.R. *et al* 1984).

2.3.2 El epitelio y la mucosidad. El mejor modelo a observar en la interacción de la biota intestinal del epitelio es el modelo gnotoxénico. En el animal axénico la mucosa intestinal y la capa de moco son muy finas. Tan pronto se agrega algo de flora al animal, el tamaño de la mucosa intestinal aumenta y la cantidad de moco se incrementa. El ácido butírico producido durante la fermentación de las colonias actúa como combustible para los colonocitos, y es capaz de modular su metabolismo. Es el responsable del efecto conocido como "trópico" sobre las células epiteliales. Se ha demostrado recientemente que las bacterias exógenas pueden modular la secreción del moco del portador (Thoreux, K. 1996).

2.3.3 Inmunidad específica y no específica. La estimulación del sistema inmunológico no específico se ha medido a través de: el índice de fagocitosis, la actividad de las células asesinas

naturales, la inducción de diversas citosinas. Las respuestas del sistema inmunológico específico han sido medidas mediante: La secreción de inmunoglobulina en la sangre, la concentración de linfocitos B y T, y algunas citosinas. Ambos sistemas pueden ser estimulados por diversos probióticos y se han utilizado varias clases de *Lactobacillus casei* en diversos estudios con humanos (Perdigón, G. *et al* 1990) y con animales (Perdigón, G. *et al* 1986).

2.4 CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y FISIOLÓGICAS

Son un grupo de bacterias en forma de cocos o bacilos Gram positivos inmóviles y no esporulados, no tiene citocromos, catalasa y porfirinas; no realizan fosforilación por transporte de electrones y por lo tanto, obtienen la energía solo por fosforilación a nivel del sustrato. Todas las bacterias de ácido láctico crecen anaeróticamente. No obstante, a diferencia de muchos anaerobios, la mayoría no son sensibles al oxígeno, y pueden crecer tanto en su presencia como en ausencia del mismo; son, por tanto, anaerobios aerotolerantes. Además son tolerantes a la acidez y algunos son termófilos, sin embargo pueden desarrollar crecimiento entre 30-35° C. (Madigan, M. *et al* 1999).

Algunas cepas pueden usar oxígeno con la mediación de sistemas de flavoproteína oxidasa, produciendo peróxido de hidrógeno, aunque la mayoría de las cepas no poseen catalasa y eliminan el peróxido de hidrógeno mediante enzimas alternativas, conocidas como peroxidasas. En la reacción de flavoproteína oxidasa no se forma ATP pero el sistema oxidasa puede utilizarse para reoxidación del NADH generado durante la fermentación (Madigan, M. *et al* 1999).

La mayor parte de las bacterias del ácido láctico obtienen energía sólo del metabolismo de los azúcares y compuestos relacionados fermentables; están, por tanto, restringidos a habitats ricos en azúcares. Normalmente, su capacidad biosintética es limitada y sus complejos requerimientos nutritivos incluyen aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas (Madigán, M. *et al* 1999).

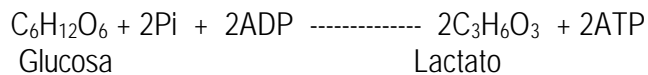
2.5 METABOLISMO DE LAS BACTERIAS ACIDO LACTICAS

Orla Jensen (1920) clasificó a las bacterias lácticas, atendiendo a sus características bioquímicas en dos grupos: Homofermentativas y heterofermentativas (Mateus, G.P.F.).

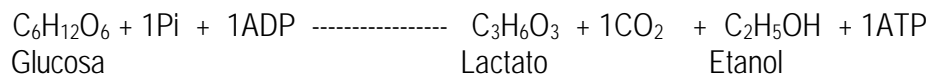
2.5.1 Homofermentación. Tiene prácticamente un solo producto de fermentación, el ácido láctico. La realiza todo los miembros del género *Streptococcus*, *Pediococcus* y muchas especies de *Lactobacillus*. Es la principal ruta del catabolismo de la glucosa, conocido como glucólisis, o vía de Embden-Meyerhof-Parnas donde una mol de glucosa, o cualquier sustrato glicosídico es degradado a dos moles de ácido láctico, sin oxígeno molecular (Madigán, M. *et al* 1999).

Consta de dos fases: En la primera la glucosa es fosforilada por ATP y actividad para formar gliceraldehido fosfato en la segunda, el gliceraldehido fosfato es convertido en ácido láctico en una serie de reacciones de oxido-reducción que están acopladas por medio de moléculas de NADH y NAD a la fosforilación del ATP, para permitir el desarrollo de los ciclos de fermentación subsiguientes. En esta vía se produce doble masa celular y muy poco CO₂ o nada (Willett, H.P. 1989)

El piruvato es reducido a ácido láctico por la enzima deshidrogenasa láctica. En esta vía se forma en total cuatro moléculas de ATP por molécula de glucosa fermentada, pero como se consumen dos moléculas la producción neta son dos moléculas de ATP por molécula de glucosa fermentada, como lo muestra en la reacción (Willett, H.P. 1989):



2.5.1 Heterofermentación. Da otros productos, principalmente etanol y CO₂, así como Lactato; La realizan algunos tipos de bacterias ácido lácticas como *Leuconostoc* y algunas especies de *Lactobacillus*. Este tipo de fermentación se lleva a cabo por la vía de las pentosas-fosfato o vía de Dickens; se caracteriza por que la glucosa vía pentosa-fosfato es fermentada a ácido láctico en un 50% y el resto a CO₂, alcohol, ácido acético o ácido fórmico, paralelamente con una molécula de ATP y de NADH₂ – NAD para permitir que el proceso de fermentación continúe, como lo indica la reacción (Willett, H.P. 1989).



2.6 CLASIFICACION DE LAS BACTERIAS ACIDO LACTICAS

La clasificación e identificación de los diferentes géneros esta basada en sus diferencias morfológicas; en características fisiológicas, agrupamiento y el tipo de fermentación en: (Axelsson, L.T. 1993).

Cocos: Formadores de tétradas: Homofermentadores: *Pediococcus*

Formadores de cadenas Homofermentadores: *Streptococcus*

Heterofermentadores: *Leuconostoc*

Bacilos: Grupo de *Lactobacillus*: Homofermentadores: *Termobacterium*

Streptobacterium

Heterofermentadores: *Betabacterium*

Grupo de *Carnobacterium*

Otras bacterias relacionadas que no pertenecen al grupo láctico pero que comparten con él muchas características son:

Listeria: bacteria móvil por flagelos peritricos capaz de multiplicarse a bajas temperaturas y con algunas especies patógenas.

La clasificación de las bacterias lácticas basada en sus relaciones filogenéticas se sustentan en el análisis comparativo de secuencias de RNAr de las subunidades 16S o 23S ribosomales (Schleifer, K.H. 1991).

Teniendo en cuenta datos de secuencias RNAr de 16S y 23S, las bacterias Gram positivas forman dos líneas descendientes, una con un % molar de guanina + citosina (G + C) menor del 50 % llamado phylum *Clostridium* y otra con un % molar de (G + C) mayor del 50 % llamado phylum *Actinomycetal*. Las típicas bacterias lácticas como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium* y *Streptococcus* pertenecen al phylum *Clostridium*, mientras que

Bifidobacterium y otras bacterias Gram positivas que son importantes en la producción de alimentos como *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium* y *Propionibacterium* son miembros del phylum *Actinomycetal*. De los anteriores los más importantes géneros de bacterias ácido lácticas son *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium* y *Bifidobacterium*. Sin embargo existen otros géneros como *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus* que se relacionan filogenéticamente a las bacterias ácido lácticas (Schleifer, K.H. 1991).

2.6.1 *Lactobacillus*. El nombre lactobacilo etimológicamente proviene de lacto que significa leche o lácteo y bacilo, barra o bastón pequeño, donde *Lactobacillus*: Bastón de la leche. Son típicamente bacilares, variando desde bacilos largos y delgados a cortos y curvados que comúnmente forman cadenas, inmóviles, aunque pueden presentar flagelos peritricos (Kandler, U. *et al* 1990).

Algunas cepas exhiben cuerpos bipolares o granulaciones internas, comprenden especies que son homofermentativas en su mayor parte aunque algunas especies son heterofermentativas, microaerofilicos, crecen en medios sólidos como MRS- De Man –Rogosa et Sharper (1960) a baja presión de oxígeno y con un 5-10% de CO₂ en un rango de temperatura entre 2-53 ° C, óptima entre 30-40°C (De Man J.C. *et al* 1960).

El género ha sido dividido en tres principales subgrupos, y se reconocen más de 70 especies. Los lactobacilos se encuentran normalmente en productos lácteos y algunas cepas se usan en la preparación de derivados fermentados en la leche. Por ejemplo, *Lactobacillus delbrueckii* se usa en la preparación del yogurt (Madigán, M. *et al* 1998).

Normalmente, los lactobacilos resisten mejor las condiciones de acidez que las restantes bacterias del ácido láctico; pueden crecer bien a valores de pH alrededor de 4 o 5 lo que le permite su aislamiento selectivo a partir de muestras naturales empleando medios de cultivo de pH ácido que contengan carbohidratos. Su resistencia a la acidez les permite seguir creciendo durante las fermentaciones lácticas, cuando el valor del pH ha descendido demasiado para que otras bacterias del ácido láctico puedan crecer. Por consiguiente, los lactobacilos llevan a cabo las últimas fases de la mayoría de las fermentaciones ácido-lácticas. Estos microorganismos casi nunca son patógenos. (Madigán, M. *et al* 1999).

El género *Lactobacillus* conforma un apreciado porcentaje del total de la microbiota intestinal, muchas especies de ellos están distribuidos a lo largo del intestino tenue y craso (Fuller, R. 1989). Citemos a continuación 7 de las especies que se han aislado del tracto intestinal humano (Willians, E.S. 1979):

- *L. acidophilus* *
- *L. casei* *
- *L. fermentum*.
- *L. cellobiosus*.
- *L. plantarum*.
- *L. salivarius*.
- *L. bifidus* *

*Utilizados como coadyuvantes dietéticos.

2.6.1.1 *Lactobacillus casei*. El grupo de *Lactobacillus casei* consiste en diversas especies de bacterias mesofílicas ácido lácticas, anaerobias facultativas y homo o heterofermentativas. Su metabolismo proporciona cualidades organolépticas a diversas leches fermentadas, quesos, y más recientemente, a las nuevas leches fermentadas. Su habilidad para sobrevivir en cantidades adecuadas al tránsito a lo largo del tracto intestinal, además de tener un efecto fisiológico asociado con sus beneficios potenciales sobre la salud, hacen que *Lactobacillus casei* sea un candidato ideal para considerarlo como probiótico (Gaon, D. *et al* 1995).

Lactobacillus casei, además de ser la especie modelo del género *Lactobacillus*, tiene gran importancia como bacteria intestinal (algunas cepas se utilizan como probióticos) y como cultivo iniciador de productos lácteos. En estos momentos, existen herramientas genéticas y conocimientos suficientes sobre regulación génica para tratar de descifrar los procesos genéticos y ambientales que controlan la expresión de los genes de la ruta glucolítica, así como de las rutas alternativas del piruvato, siendo estas últimas responsables de la formación de compuestos volátiles importantísimos en alimentos (Pérez M., G 2001).

Diversos estudios clínicos y controlados con placebos han demostrado que el consumo oral de *Lactobacillus casei* reduce la duración de la diarrea y, en particular las gastroenteritis por rotavirus en niños (Saxelin, M. *et al* 1992). Además de lo anterior, el *Lactobacillus casei* puede ayudar a reducir la duración de la diarrea en los niños en guarderías (Pedone, C.A. *et al* 1999), en la antibioterapia y en la diarrea del viajero (Salminén, S. *et al* 1993).

Se han llevado a cabo estudios en ratones para observar la prevención y el tratamiento de cáncer (Kato, Y. *et al* 1994), donde observaron una importante disminución en el desarrollo de tumores secundarios previamente alimentados con *Lactobacillus casei* (Perdigón, G. *et al* 1993), reconocieron que el consumo de *Lactobacillus casei* inhibía el crecimiento de un fibrosarcoma implantado subcutáneamente; estos autores enfatizaron la importancia de la concentración y frecuencia de la ingestión de *L. casei* en el desarrollo de estos efectos.

La toma de leche fermentada con cultivos de yogurt y *L. casei* (DN-114 001) modificó en forma benéfica la composición de la microbiota intestinal en niños pequeños y el mismo tipo de probiótico restauró a normales los niveles del indicador inflamatorio, TNF-alpha, liberado por células inflamadas de la mucosa en pacientes con la enfermedad de Crohn (Guerin-Danan, C. 1998).

Las leches fermentadas con diversas clases de *L. casei* producen un efecto sobre la tasa de supervivencia de las ratas infectadas con *Salmonella typhimurium* luego de siete días de recibir una dieta complementada con diferentes leches fermentadas comparada con leche común, se mostró que la leche fermentada aumenta la supervivencia de las ratas a las cuales se les había aplicado un shock séptico inducido por *Salmonella typhimurium* (Paubert-Braquet, M. *et al* 1995).

Los resultados de un reciente y prometedor experimento sugirieron que las leches fermentadas con *Lactobacillus casei* pueden mejorar la respuesta adquirida contra un antígeno viral. Este estudio al azar y a ciegas fue para determinar si el consumo de dicha leche estimulaba específicamente la respuesta de las células inmunológicas T a tres grupos significativos de antígenos (metano, cándida, e influenza). Se encontró que los sujetos que tomaban la leche fermentada tuvieron una pequeña

pero más alta respuesta de las células T a los antígenos de la influenza que la de aquellos del grupo placebo. Estos datos garantizan una explicación más amplia acerca de la hipótesis de que las leches fermentadas con *Lactobacillus casei* pueden modular la respuesta inmune específica (Bonavida, B.).

2.6.1.1.1 *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* fue descrito por Hansen (1968). La especie *casei* toma su nombre por la fuente donde fue aislado, el queso; la subespecie *rhamnosus* por la particularidad de asimilar la rhamnosa. Se destaca por ser el único lactobacilo homofermentativo de la especie que desarrolla buen crecimiento de 15 °C a 45 °C. Puede ser aislado de la leche, el queso, productos lácteos, harinas fermentadas, estiércol de vaca, tracto intestinal humano, boca y vagina (Kandler, U. et al 1990).

Lactobacillus casei subsp rhamnosus, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*. *Pediococcus pentosaceus* y *Bifidobacterium bifidus* fueron ensayados por su producción de ácido láctico, pH, e inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* (NCTC 11637), donde seis cepas de *L. acidophilus* y *L. casei subsp rhamnosus* inhiben el crecimiento de *H. pylori* mientras que *Bifidobacterium bifidus*, *Pediococcus pentosaceus* y *L. bulgaricus* no inhiben su crecimiento (Midolo, P.D. et al 1995)

2.7 AGENTES INHIBITORIOS DE LAS BACTERIAS ACIDO LACTICAS

Sustancias de origen proteico o químico, antibacterial, altamente específico, secretada por una determinada cepa y activa contra otras cepas de la misma o de otra especie (Daeschel, M.A. 1989).

2.7.1 Peróxido de Hidrógeno. Ciertas cepas de bacterias lácticas son capaces de tomar oxígeno para formar peróxidos mediante flavoproteína-oxidasa o mediante peroxidasa. El peróxido de hidrógeno producido y liberado al medio resulta extremadamente tóxico para otras bacterias que comparten el hábitat y que son así eliminadas. La acumulación de peróxido de hidrógeno en los productos fermentados ocurre por que los *Lactobacillus* no poseen la enzima catalasa (Daeschel, M.A. 1989). Este compuesto posee actividad antimicrobial cuando se acumula y su efecto es antagónico para el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas sp.*

El peróxido de hidrógeno puede reaccionar con otros componentes para formar sustancias inhibitorias, es así como el tiocinato endógeno reacciona con el peróxido de hidrógeno para formar productos intermediarios de la oxilación siempre y cuando esté presente la enzima lactoperoxidasa. Este proceso es llamado " Sistema antibacterial lactoperoxidasa " (Daeschel, M.A, 1989).

2.7.2 Diacetil. También conocido como 2,3-butanodiol. Es un producto final del ciclo de fermentación butanodiólica, que se lleva a cabo en uno de los destinos del piruvato. Este compuesto es conocido por impartir aroma agradable en alimentos fermentados y por su actividad microbiana, inhibe el crecimiento de levaduras, bacterias Gram negativas y Gram positivas no lácticas (Salminen, S. et al 1993).

2.7.3 Reuterina. Es un compuesto no proteico, de bajo peso molecular, altamente soluble producido por especies heterofermentativas de *Lactobacillus reuteri*. Es producida durante el metabolismo del glicerol y consiste en una mezcla de B-hidroxiacetaldehído en sus formas monomérica y cíclica dimérica. Su mecanismo de acción es inhibiendo la enzima ribonucleótido reductasa que cataliza el

primer paso de síntesis de ADN, lo que explicaría su amplio espectro de actividad. Tiene un espectro antimicrobial especialmente contra Gram negativos, Gram positivos, levaduras, hongos y protozoos, así también contra microorganismos patógenos como: *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Cándida* y *Tripanosoma* (Fernández, C.F. 1987).

2.7.4 Acido Láctico. Las bacterias lácticas que producen este metabolito secundario no lo utilizan y lo secretan al exterior. El ácido láctico contribuye a desarrollo del sabor aroma y textura de los alimentos, pero también a su estabilidad mediante la inhibición de microorganismos alterantes. El mecanismo de inhibición se basa, parte, en la disociación molecular de los ácidos orgánicos en el medio, lo cual da lugar a la aparición de protones y aniones. Se produce un aumento en el gradiente de protones, el cual obliga a las células a transportarlos a su interior mediante bombeo de protones para evitar la desnaturalización de las enzimas presentes en las estructuras celulares expuestas, como pared celular, membrana y espacio periplásmico, pudiendo causar también desnaturalización de permeabilidad de la membrana (Requena, T. 1995).

Además, el ácido láctico en forma no disociada, debido a su naturaleza lipofílica, puede atravesar la membrana celular y disociarse en el citoplasma. Estas moléculas pueden ejercer dos efectos: por un lado, interfieren con funciones celulares, como puede ser la translocación de sustrato y la fosforilación oxidativa; por otro lado, la disociación del ácido láctico, provoca el incremento de protones en el interior de la célula. Cuando la concentración de protones excede la capacidad de tampón del citoplasma se transportan hacia el exterior mediante la bomba de protones, reduciendo de esta manera las reservas energéticas de la célula. Cuando estas reservas se agotan, la bomba de protones se detiene y se provoca el descenso del pH interno, lo cual causa a su vez

desnaturalización de otros componentes estructurales y funcionales de las células, interfiriendo así con la viabilidad (Requena, T. 1995).

Las bacterias lácticas pueden sobrevivir y desarrollarse en presencia de pH relativamente bajo a diferencia de otros grupos microbianos, con metabolismo respiratorio. Las BAL poseen un sistema de transporte simultáneo de ácido láctico y de protones al exterior celular, que además de contribuir a la homeostasis del pH interno, origina energía (Requena, T. 1995).

Se ha observado que la baja de pH debido al incremento de ácido láctico en procesos de fermentación inhibe el crecimiento de microorganismos indeseables. Estudios en este sentido han observado la inhibición antagónica del crecimiento bacteriano por metabolitos ácido lácticos. (Lewus, C.B. *et al* 1991). Los ácidos orgánicos de cadena corta son muy tóxicos para los microorganismos porque atraviesan la membrana bacteriana en la forma no ionizada y se acumulan en la forma ionizada en el interior.

2.7.5 Bacteriocinas. En general son moléculas de naturaleza proteica, co-agregados de proteínas o bien glicoproteínas producidos por las bacterias lácticas (Parada., J.L.1999), las cuales ejercen acción bactericida o bacteriostática en cepas cercanamente emparentadas o susceptibles. Sin embargo se cuenta hoy con evidencias que muchas Bacteriocinas de LAB y otras Gram positivas bacterianas tienen un amplio espectro de actividad, efectivo en cepas no relacionados a la cepa productora (Klaenhammer, T.R. 1988). Las investigaciones sobre las Bacteriocinas han sido enfocadas hacia diferentes áreas: Los genes que las codifican, su expresión, su modo de acción, producción y la caracterización de plásmidos (Muller, E. *et al* 1993).

Las bacteriocinas se pueden dividir en tres clases: Lantabióticos (Nisina A y Z, Lacticina 481); caracterizadas por contener inusuales aminoácidos como la Lantionina, No Lantabióticos, termoestables y pequeñas (Lactococcina A, Lactaccina F), y Bacteriocinas, No Lantabióticos termolábiles (Caseicina 80) (Parada, J.L. 1999). Ver cuadro 1.

Cuadro 1. Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas

MICROORGANISMO	BACTERIOCINA	REFERENCIAS
<i>Lactococcus lactis</i> , subsp. <i>lactis</i> ATCC 11444 NIZO 22186 CNRZ 481	Nisina A Nisina Z Lacticina 481	Rogers (1998) Mulders et al (1991) Piart et al (1990)
<i>Lactococcus lactis</i> , subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> DPC 938	Lactocina D	Morgan & Hill (1993)
<i>Lactococcus lactis</i> , subsp. <i>cremoris</i> LMG 2081	Lactococcina G	Nissen-Meyer et al (1992)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> M 46	Bacteriocina M 46	Ten Brink (1990)
<i>Lactobacillus casei</i> B 80	Caseicina 80	Ramelsberg & Raddler (1990)
<i>Lactobacillus plantarum</i> MI 406	Plantaricina 406	Larsen et al (1993)
<i>Carnobacterium psicicola</i> UI 49	Carnocin UI 49	Stoffels et al (1992)
<i>Pediococcus acidilactici</i> SJ-1	Pediocina SJ-1	Schved et al (1993)
<i>Pediococcus pentosaceus</i> L-7230	Pediocina A	Daeschel & Klaenhammer
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> UL 5	Mesenterocina 5	Daba et al (1991)
<i>Streptococcus thermophilus</i> Sfi 13	Termofilina 13	Maciset & Mollet (1993)
<i>Enterococcus faecalis</i> 226	Enterocina 226 NWC	Villani et al (1993)

Fuente: Parada, José Luis 1999

Los *Lactobacillus* productores de bacteriocinas que inhiben géneros como *Clostridium*, *Listeria* y enteropatógenos son muy importantes en el desarrollo de probióticos (Brink, B.T. 1991).

Entre algunas propiedades moleculares y biofísicas de las bacteriocinas podemos considerar que son péptidos relativamente pequeñas, hidrofóbicas y de acción bactericida o bacteriostática hacia células sensibles. Pueden ser simples o formar complejos con lípidos o carbohidratos. Algunas

pueden ser anfipáticas y se cree que su porción hidrofóbica pueden interaccionar con la membrana del organismo susceptible (Tagg, N.R. *et al* 1976).

Muchas bacteriocinas son estables en medio ácido y neutro pero son inactivadas a pH mayor de 8. Poseen buena solubilidad en metanol-agua (5:1) varias presentan resistencia térmica (20-30 min), variando de 60 a 100° C. Esta resistencia al calor elimina la posibilidad de pensar que se trate de un bacteriófago. Pueden tener aminoácidos insaturados, aminoácidos con unión tíoéter. El peso molecular puede variar considerablemente desde pequeños peptidos de 1700 Da, como lacticina 481, hasta proteínas o agregados Lipido-proteicos con una masa de más de 200000 Da, como en Lactocina 27. Su purificación es bastante complicada: Su estabilidad decrece a medida que aumenta el grado de purificación (Parada, J.L. 1999).

Una hipótesis de su modo de acción es que las bacteriocinas actúan en dos pasos; uno que involucra absorción a un receptor específico o no específico de la superficie celular resultando la muerte de la bacteria o bien actuando bacteriostáticamente. Actúan probablemente sobre la membrana citoplasmática, alterando la permeabilidad y perturbando el transporte; además pueden inhibir la producción de energía y la biosíntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Tagg, N.R. *et al* 1976)

Las bacteriocinas poseen un interés potencial, pudiendo ser utilizadas como marcadores específicos en estudios epidemiológicos, así como instrumentos profilácticos. Se ha sugerido que pueden adoptar la función de señaladoras de la microbiota que inicia la fermentación de numerosos productos comestibles; se cree que son de importancia por la habilidad de las bacterias lácticas de

competir en ecosistemas como el tracto gastrointestinal. Por último, podrían ser utilizadas como aditivos biológicos en nuevos sistemas de preservación de alimentos, el uso de bacteriocinas para inhibir patógenos es particularmente atractivo para aplicar a alimentos mínimamente procesados (Parada, J.L. 1999).

2.8 COLONIZACION

Se han efectuado observaciones de colonización de lactobacilo en intestino humano usando sopa de avena fermentada como vehículo y tomando biopsias a diferentes niveles, en tres tiempos diferentes uno antes de la administración, otro un día después de la administración y finalmente diez días posterior a la administración en voluntarios sanos. Se observó que la mayoría de los *Lactobacillus* administrados colonizó el intestino delgado y grueso de los voluntarios (Johansson, M.L. *et al* 1993).

La naturaleza de los mecanismos de adhesión de las bacterias lácticas no se conoce, ni la localización precisa de las diferentes especies a lo largo del tracto intestinal. Se cree que los lactobacilos compiten con los patógenos por sitios de unión al epitelio intestinal (Farshaw, R. *et al* 1989), gracias a su proliferación por un lado, y reducción de su remoción por peristalsis por el otro. Hay trabajos que apoyan ésta hipótesis (Delves-Broughton, J. 1990), mostrando que en homogenizados de tejido intestinal de cerdos que habían recibido *Lactobacillus lactis* había un número marcadamente más alto de lactobacilos unidos y un conteo de *E. coli* más bajo que en los cerdos control. La composición de la envoltura bacteriana posiblemente involucrada en la adhesión al tejido intestinal también ha sido estudiada (Delves – Broughton, J. 1990).

Después que la colonización ocurre, las bacterias lácticas producen sustancias que inhiben los patógenos (Saito, H. *et al* 1982). Muchas bacteriocinas o sustancias similares a bacteriocinas han sido reportadas en la literatura (Blaskma, N.E. *et al* 1976), algunas de ellas han sido caracterizadas y sus determinantes genéticos clonados en diferentes bacterias (Ianello, D. L. *et al* 1984). Al destete, la inmunidad resultante de la exposición a una variedad de antígenos tales como bacterias patógenas y proteínas de la dieta, se hace importante en la defensa de animales jóvenes contra infecciones entéricas (Blaskma, N.E. *et al* 1979).

2.9 ACCION ANTAGONICA

La fermentación natural ha sido usada durante siglos, como un medio de preservar los alimentos perecederos (Axelsson, L.T. *et al* 1989), porque retarda su descomposición. Las leches ácidas (fermentadas) han constituido parte importante de la dieta de muchas comunidades desde la antigüedad. Las bacterias lácticas poseen un número de propiedades antagónicas, que pueden contribuir al incremento de la sobrevida de alimentos fermentados (Abdel-Bar, N. *et al* 1987):

- Disminución del pH por la producción de ácidos orgánicos (ácido láctico).
- Consumo de los nutrientes disponibles.
- Disminución del potencial redox.
- Producción del peróxido de hidrógeno (bajo condiciones aeróbicas).
- Producción de componentes inhibitorios especiales.

El antagonismo láctico es la actividad de las bacterias lácticas por la que matan o inhiben el crecimiento de otras bacterias estrechamente relacionadas con ellas. Esta actividad de competición puede existir, incluso, entre bacterias de la misma especie. Estudio *in vivo* han demostrado la inhibición de diversas bacterias patógenas en presencia de los *Lactobacillus*; tales como *Helicobacter pylori*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella sonnei*.

2.9 PROBIOTICOS

Los efectos benéficos de las bacterias ácido lácticas (BAL) en la salud humana y animal han interesado a los científicos desde tempranas observaciones de Elie Metchnikoff, hace un siglo; quien postuló que algunas bacterias no son necesariamente perjudiciales para los humanos, y que pueden de hecho ser benéficas para su salud y bienestar. Llegando a concluir que los lácteos fermentados actuaban como defensa contra infecciones, afirmación que lo lleva a recibir el premio Nóbel de inmunología en 1908 (Quan Kiu V., E. 2000).

La evidencia de los beneficios que aporta la modificación de la biota intestinal a través de la ingesta deliberada de probióticos tiene bases cada vez más firmes y esta ganando credibilidad científica (Peitersen, N. 1992).

Los probióticos son microorganismos vivos, que al ser ingeridos en cantidad adecuada producen efectos benéficos para la salud, más allá de su simple aporte nutricional (Havenaar, R. *et al* 1992). Estos efectos en la salud, se relacionan con la mejoría de enfermedades infecciosas, crónicas intestinales como colitis ulcerosa, inmunomodulación, biodisponibilidad de nutrientes, enfermedades

cardiovasculares, diabetes mellitus no insulino dependientes, obesidad, osteoporosis y cáncer (González M., B. *et al* 2001).

Este efecto benéfico es debido a que cuando se ingieren en cantidades adecuadas ocurre la modificación del ecosistema de los millones de microorganismos que habitan en el intestino, generando un equilibrio que se manifiesta por un estado de salud, en donde existe competencia por los nutrientes entre los probióticos y los patógenos ingeridos por accidente así como competencia por los sitios de adherencia, impidiendo la colonización de patógenos, y, reforzando los mecanismos de defensa, estimulando el sistema inmune (González M., B. *et al* 2001).

Un factor a considerar es que el efecto de los probióticos es óptimo cuando se utilizan bacterias aisladas del mismo huésped al que se van a administrar (Pérez M., Gaspar.).

2.10.1 Características de los probióticos. Para ser considerados como probióticos las bacterias deben reunir algunas condiciones (González M., B. *et al* 2001):

- Ser habitante normal del intestino humano.
- No patógena.
- No toxigénica.
- Capaz de sobrevivir y metabolizar en el ambiente intestinal.
- Capaz de ejercer efecto benéfico en el huésped.

Los probióticos son generalmente bacterias lácticas, (Bifidobacterias, Lactobacillus y Streptococcus) los más usados como probióticos humanos son: *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. casei subsp rhamnosus*, *L. delbrueckii subsp bulgarius*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *Lactococcus lactis spp lactis*, *Lactococcus lactis spp cremoris*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. longum* , *B. breve*. *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, entre otros (González M., B. et al 2001). Y algunas levaduras tales como *Saccharomyces boulardi* o *Saccharomyces cerevisiae*.

2.10.2 Efectos benéficos de los probióticos. Son diversas las formas en que los probióticos se utilizan para mejorar la resistencia del huésped contra microorganismos patógenos como (González M., B. et al 2001):

- Resistente a microorganismos patógenos.
- Competencia por los sitios de adhesión (espacio físico) y por nutrientes.
- Producción de sustancias antimicrobianas frente a patógenos como ácido láctico y otros ácidos de cadena corta, metabolitos con peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas entre otros.
- Estimulando el sistema inmune del intestino.
- Modificaciones en el hábitat intestinal por cambios en el pH desfavorable para el crecimiento de patógenos.
- Inactivando ciertas toxinas liberadas por patógenos.
- Efectos sobre membranas celulares de microorganismos patógenos.
- Mejoría en problemas de intolerancia a la lactosa.
- Estimulación del sistema inmune.
- Actividad antitumoral.

- Concentración y metabolismo del colesterol (Efecto hipocolesterolémico).
- Producción de nutrimentos, y vitaminas B6, B12, K, biotina, lisina.
- Reducción de la incidencia y duración de las diarreas, son de gran ayuda en la prevención y durante el tratamiento de una enfermedad intestinal como consecuencia del uso de antibióticos, así como la prevención de la "diarrea del viajero" (Salminén, S. *et al* 1993).
- El estreñimiento y meteorismo, problemas típicos de edad avanzada se puede atenuar por ingestión de probióticos, ya que se favorece el equilibrio: bacterias lácticas/microbiota de putrefacción, posiblemente por la reducción de pH.
- Informaciones especializadas también han dado a conocer que el uso de estas leches fermentadas disminuye la hipertensión y los síntomas provocados por la dermatitis atópica en niños.

3. METODOLOGIA

3.1 FASES DE EJECUCION

El Trabajo se realizó en tres fases:

Inicialmente se aisló *Helicobacter pylori* de fragmentos logrados por biopsias de mucosa gástrica de pacientes que acuden a consulta al Instituto de los Seguros Sociales, Fundación Valle de Atriz, Convida y Cruz Roja Colombiana en el Departamento de Nariño. En un lapso de tiempo entre junio de 1999 hasta agosto del 2001. Luego del aislamiento se identificó el microorganismo inicialmente por morfología y seguidamente por pruebas de identificación. Se estandarizó el proceso de aislamiento, conservación y activación del microorganismo.

En la segunda fase se activó y conservó *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* y se estableció el cultivo del inóculo para los procesos de fermentación, se utilizó un sustrato base de melaza con leche en polvo y se determinó la cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*. Finalmente se evaluó la producción de biomasa, proteínas, pH y consumo de azúcares totales.

En la tercera fase se realizó las pruebas de antagonismo *in vitro* de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* sobre un aislado de *Helicobacter pylori*.

3.1.1 Fase I

3.1.1.1 Aislamiento y Purificación de *Helicobacter pylori*. Se aisló *Helicobacter pylori* de fragmentos obtenidos por biopsia de mucosa gástrica de pacientes que acuden a consulta por síndrome ulceroso.

Estandarizando la siguiente metodología:

- El procedimiento a realizar consistió en tomar tres fragmentos de biopsias de 1 a 2 mm de diámetro que se depositaron en: un fragmento en tubo eppendorf que contiene 1 ml de solución de test de urea, para determinar la presencia inicial de *Helicobacter pylori*; el segundo fragmento en tubo nunc con 1 ml de tioglicolato (BBL, Merck), para su conservación en nitrógeno líquido a -196°C ., y el tercer fragmento en un tubo eppendorf con 1 ml de solución salina fisiológica estéril al 0.9% de NaCl para su cultivo.
- El proceso de aislamiento parte del tercer fragmento, se llevó a maceración en mortero estéril, con 200 μl de solución salina 0.9 % estéril, se sembró el macerado con asa de argolla por el método de estría en agar base columbia (Oxoid) suplementado con sangre desfibrinada de cordero al 8% más suplemento Dent (Oxoid) el cual contiene Vancomicina, Cefsulodin, Lactato de trimetropin y Anfotericina B. Ver anexo A.
- Se incubó las cajas a 37°C en jarra anaeróbica con sobres de Campypack (BBL), al que se le adicionó 10 ml de agua destilada estéril para inducir un ambiente microaerofílico, los sobres se cambiaron en el momento que se hace cada evaluación. Opcionalmente se puede utilizar una gasa estéril humedecida con agua destilada estéril para inducir humedad.

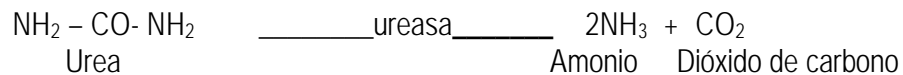
- Se evaluó el crecimiento de 48 a 72 horas y luego se realizó evaluaciones periódicas cada día hasta 7-10 días. Las primeras colonias pueden aparecer de los tres a cuatro días aunque habitualmente, tardan hasta diez días (Hirschl, A.M. 1998).
- Las evaluaciones tendieron a detectar morfología de las colonias compatibles con *Helicobacter pylori*, o sea colonias circulares con una apariencia convexa y translúcida en forma de gotas de rocío, de 1 a 2 mm de diámetro (Hirschl, A.M. 1998). A estas colonias se le realizó tinción de Gram para observar morfología celular compatible con bacterias Gram negativas pleomórficas, espiriladas, curvas y típicas en alas de gaviota.

Para la purificación de las bacterias se tomaron colonias con asa de argolla y se sembraron en agar columbia (Oxoid) con sangre de cordero desfibrinada al 8% sin suplemento, por el método de siembra por estrías, además se sembró en tubos tapa rosca con 10 ml de tioglicolato (BBL; Merck) ó caldo Brusella; al colocar los tubos en la jarra no se deben tapar completamente para proporcionarles la atmósfera adecuada, se incubó a 37° C de 24 a 48 horas en las condiciones antes mencionadas. Los tubos se evaluaron mediante la turbidez del medio en la parte media superior del mismo.

3.1.1.2 Identificación de *Helicobacter pylori*. Para la identificación de *Helicobacter pylori* se realizó las siguientes pruebas:

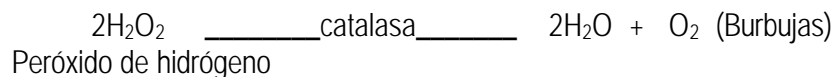
- **Test de urea (Host Test).** Contiene urea al 10% y rojo fenol al 0,1% en agua destilada. Ver anexo A. Se tomó 1 ml de la solución preparada en tubos ependorff, a esta solución se le adicionó una colonia con el asa de transferencia. La ureasa hidroliza la urea para convertirla en amonio y en

dióxido de carbono. Esta reacción es alcalina lo que modifica el color del indicador rojo fenol añadido, que cambia de color amarillo a fucsia señalando un resultado positivo y negativo si permanece del mismo color (Pajares G., J.M. 1998).



- **Prueba de oxidasa.** Se utilizó tiras de oxidasa (Oxoid) con las cuales se tomó una colonia, si el resultado es un cambio a color púrpura, la reacción es positiva. Las bacterias que contienen esta enzima catalizan rápidamente la oxidación de la N, N, dimetil-p-fenilendiamina en un producto coloreado en presencia de oxígeno (López B., M. 2002).

- **Prueba de catalasa.** Se tomó una colonia en un porta objetos con dos gotas de peróxido de hidrógeno, el resultado fue la presencia de burbujas que será una reacción positiva. La catalasa es una enzima capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno y convertirlo en agua liberando oxígeno. Esta liberación de oxígeno se observa como producción de burbujas (López B., M. 2002).



- **Tinción de Gram** Se buscaron bacilos Gram negativos pleomórficos compatibles con *Helicobacter pylori*.

3.1.1.3 Preservación y activación de *Helicobacter pylori*

- Del aislado purificado de *Helicobacter pylori* se tomaron colonias con escobillón estéril que se transfirieron a un tubo nunc con 0.8 ìl de caldo tioglicolato (BBL) estéril, posteriormente se adicionó 0.2 ìl de glicerol (20%) (V/V), se agitó para lograr una buena homogeneización y se llevaron los tubos finalmente a nitrógeno líquido a -196 ° C para su conservación.
- Para la activación se partió del preservado criogénico e inmediatamente con una hoja de bisturí # 11 o una lanceta se raspó una fracción del contenido del tubo realizándolo en el menor tiempo posible para evitar el descongelamiento del contenido del tubo. La fracción se depositó en una caja de petri con agar columbia (Oxoid) y sangre desfibrinada de cordero al 8% sin suplemento, el resto del contenido del tubo se llevó nuevamente a nitrógeno líquido a -196° C para futuras activaciones.
- Posteriormente se hizo un rayado con escobillón estéril por el método de siembra en masa en toda la placa, el mismo escobillón se lo utilizó para transferir las bacterias restantes a un tubo nunc con tioglicolato (BBL,Merck) estéril, a tubos tapa rosca con 10 ml de caldo tioglicolato (BBL, Merck) estéril; y/o caldo Brusella (Merck) se incubó a 37° C en jarra anaeróbica con un sobre Campypack (BBL) al cual se le adicionó 10 ml de agua destilada estéril. Se evaluó el crecimiento de 48 a 72 horas observando la morfología propia de las colonias en las cajas y la turbidez del caldo.

3.1.2. Fase II

3.1.2.1 Activación y conservación de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*

- De un preservado criogénico proveniente de un periodo de almacenamiento a -20° C en nevera y/o a -196° C en nitrógeno líquido; se tomó la totalidad de su contenido, o sea 1 ml y se inoculó directamente en un erlenmeyer que contiene 40 ml de caldo MRS (Merck) Man, Rogosa et Sharpe (1960), en cámara de flujo laminar tipo II. Se llevó a periodo de incubación por espacio de 20 a 24 horas a 35° - 37° C.
- Al día siguiente se evaluó la turbidez del caldo MRS (Merck) y se realizó un repique de 4 ml del erlenmeyer incubado previamente a otro erlenmeyer con la misma cantidad de medio de cultivo, se incubó a las mismas condiciones iniciales. De esta manera se garantizó que la cepa estaba completamente activada.
- Seguidamente se repicó en cajas de agar MRS comercial (Merck) y en agar MRS modificado con azul de anilina. Ver anexo A, Con asa de argolla por el método de estrías y se incubó por 48 horas de 35° a 37° C.
- El proceso de conservación partió de una cepa totalmente activada en MRS glucosa (Merck) 5 g/l, pudiéndose almacenar en glicerol al 25% en alícuotas de 1 ml de servidos en tubos nunc a -20° C en nevera y/o a -196° C en nitrógeno líquido; o de otra manera a partir de colonias aisladas e incubadas de 35° a 37° C por 48 horas en MRS agar; se inoculó con asa recta y en

profundidad tubos inclinados que contienen MRS glucosa o glicerol 5 g/l más agar al 1.5% para construir un stock reciente, las cepas previamente incubadas en iguales condiciones se almacenaron a 4° C.

- Estos procesos permitieron conservar por varios meses la cepa en estas condiciones. Antes de cualquier proceso de conservación debe realizarse una coloración de Gram para constatar que las cepas que se trabajaron fueron morfológicamente compatibles.

3.1.2.2. Cultivo del inóculo. El inóculo se preparó activando la cepa de nuestro interés proveniente de un stock reciente en caldo MRS comercial (Merck). Para tal efecto se inoculó una asada del preservado en un erlenmeyer que contenía 40 ml de caldo MRS comercial (Merck) estéril. Se incubó por 24 horas a 35° a 37° C. Nuevamente se realizó un repique de 4 ml de este caldo a otros 40 ml de caldo MRS comercial (Merck) y se incubó en las condiciones antes mencionadas. De esta manera se preparó el inóculo inicial para realizar los ensayos de fermentación en dos tipos de sustrato.

Según Crueger y Crueger (1993), el porcentaje de inóculo se debe ajustar al 10 % V/V. Por lo tanto se tomaron 10 ml del inóculo y se pasaron a 90 ml de MRS comercial (Merck), y se incubó en iguales condiciones. Después de este tiempo se calculó el número de bacterias por ml.

Del caldo MRS comercial (Merck) con el inóculo se tomó 1 ml y se vertió en 9 ml de solución peptonada Ver anexo A. A partir de esta solución se tomó 0.1 ml y se pasó a cámara de Newbauer obteniéndose una población inicial 11×10^7 Bact/ml para la primera fermentación. Cuando se

presentó mayor población de la establecida se adicionó caldo estéril teniendo en cuenta el siguiente cálculo matemático de proporcionalidad (Guerrero F., G.M. 2002)

M_1 = población o densidad celular que se debe ajustar.

M_2 = 11×10^7 bact/ml. Densidad utilizada primera fermentación.

V_1 = 1 ml volumen proveniente del inóculo total para obtener la dilución 10^{-1} .

X_1 = cantidad que contiene M_2

V_2 = Lo que se agrega a 1 ml para ajustar a 11×10^7 bact/ml.

V_3 = 100 ml Cantidad total del inóculo.

X_2 = Cantidad de caldo MRS comercial estéril que se agrega a V_3 para ajustar la población el valor de M_2

Encontramos entonces X_1

$$\begin{array}{l} M_1 \text{ ----- } M_2 \\ M_2 \text{ ----- } X_1 \end{array} \quad X_1 = \frac{M_2 \times V_1}{M_1} ; \quad X_1 = \frac{(11 \times 10^7 \text{ bact/ml}) \times (1 \text{ ml})}{26 \times 10^8 \text{ bact/ml}} = 0.042$$

Encontramos entonces V_2

$$V_2 = V_1 - X_1 \quad V_2 = 1 \text{ ml} - 0.042 = 0.95 \text{ ml}$$

Finalmente se obtiene el valor de X_2

$$\begin{array}{l} V_1 \text{ ----- } V_2 \\ V_3 \text{ ----- } X_2 \end{array} \quad X_2 = \frac{V_3 \times V_2}{V_1} \quad X_2 = \frac{100 \text{ ml} \times 0.95 \text{ ml}}{1 \text{ ml}}$$

$$X_2 = 95 \text{ ml}$$

El valor de X_2 (95 ml) es la cantidad que se debe agregar a 100 ml para ajustar la población de 11×10^7 bact/ml.

Cuando la población fue inferior se reincubó en las condiciones iniciales el tiempo necesario para lograr la población requerida.

3.1.2.3. Fermentación en matraz. Se utilizó dos ensayos para fermentación en matraz. Estos varían en el tipo de sustrato uno en medio Melaza con leche en polvo y otro en MRS comercial (Merck) como control. Ver Anexo A

Se preparó los medios en matraz y se esterilizaron en autoclave a 121°C y 15 lb de presión por 15 minutos. Los medios que contenían leche se esterilizaron sin ella, ya que sus proteínas se pueden desnaturalizar.

Se inoculó la bacteria láctica al 10% (V/V) en cabina de flujo laminar tipo II y se incubó con agitación constante en plancha magnética rotacional (Multi 15 Stirrer VELS Científica) y sin control de pH, previa homogeneización. Se tomaron muestras por duplicado en el tiempo cero y subsecuentemente en lapsos de una hora hasta las 12 horas y luego a las 24 horas para determinar parámetros de fermentación. Se tomaron 10 ml para medición de pH en pH-metro digital (691 pH Meter Metrohm) y densidad óptica (D.O) que se evaluó por turbidimetría, la absorbancia de la suspensión celular se determinó en el espectrofotómetro (Portable Datalogging Spectrophotometer

HACH DR/ 20-10) a una longitud de onda de 460 nm para el sustrato fermentado y 540 nm para el caldo MRS comercial (control).

De las diferentes muestras se realizaron diluciones 10^{-1} y 10^{-2} para obtener una lectura correcta, se utilizó agitador de tubos (Janke & Kunkel IKA Labortechnik VF₂) para homogeneizar la muestra. 10 ml para determinación de proteínas por el método de Lowry (Lowry, O.H. *et al* 1951) Ver anexo B, 5 ml para determinación del consumo de azúcares por el método de Dubois y Antrona (Dubois, M. *et al* 1956) Ver anexo C, y 0.1 ml para la determinación de biomasa por recuento en placa. Ver Anexo D.

La cinética de crecimiento se evaluó llevando el sustrato elegido a fermentación en matraz, a temperatura de crecimiento a 37 °C y con agitación continua.

Se determinó la tasa de crecimiento definida de la biomasa por recuento en placa ya que se espera o no una alta cantidad de sólidos suspendidos debida a la naturaleza de los sustratos que impide o no las lecturas de la densidad óptica, se conoció además el tiempo de duplicación y se trazó la curva de crecimiento exponencial.

El tiempo de cosecha se determinó donde hay la mayor producción de proteínas y formación de biomasa en unidades formadoras de colonia por mililitro.

3.1.3 Fase III

3.1.3.1 Ensayo de antagonismo in vitro. Para realizarlo se utilizó una variante del método de Tagg, J.R *et al* (1976), esta detecta la inhibición del crecimiento de una cepa indicadora (pasiva), causada por la cepa examinada (activa).

La variante del método consistió en sembrar la bacteria láctica de final de fase logarítmica en pozos de 7 mm de diámetro sellados en su fondo y hechos en platos de agar MRS comercial (Merck). En cada uno de los pozos se depositó 50 μ l y se llevaron a 30 ° C por 1 hora, inmediatamente después se cubrió con 15 ml de agar Columbia (oxid) suplementado al 8% con sangre de cordero y con la cepa indicadora *Helicobacter pylori*, preparada adicionando 0,25 ml de un caldo de tioglicolato (BBL, Merck) y/o caldo Brusella (Merck) de 12 horas de incubación previa.

La mezcla a 50° C se vertió suavemente sobre las cajas de agar MRS comercial (Merck) con los pozos previamente inoculados e incubados. Todo lo anterior se llevó a incubación a 35° - 37° C por 24 horas en un ambiente microaerófilico para permitir el crecimiento de ambas cepas. Las zonas claras o halos de inhibición alrededor de los pozos indicaron actividad antibacteriana.

3.1.3.1.1. Diseño experimental estadístico. Para la evaluación de la actividad antibacteriana en la escogencia de la concentración de bacterias en el sustrato de Melaza con leche en polvo, se aplicó un diseño irrestrictamente al azar de una sola vía y un solo factor y 16 replicaciones, donde el factor A corresponde al sustrato y el factor B corresponde a cuatro niveles de dilución del sustrato b_1 . = sustrato puro, b_2 = 10^{-1} , b_3 = 10^{-2} , b_4 = 10^{-4} . Con un total de 96 muestras experimentales.

Con el fin de obtener igual número de replicas se descartaron al azar algunas de ellas para dejar 16 por dilución.

Los datos se sometieron a un análisis de varianza ANDEVA y prueba de significancia de Tukey para comparar variaciones que resultaron estadísticamente significativas. (P menor 0.05)

4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 FASE I

AISLAMIENTO DE *Helicobacter pylori*

Se obtuvieron un total de 257 biopsias de pacientes de uno u otro sexo, adultos de diferentes edades. Además se obtuvo el diagnóstico histológico realizado por un laboratorio particular "Patólogos Asociados". Ver Anexo B y cuadro 2.

Cuadro 2. Numero de muestras de biopsias obtenidas de 1999 – 2001

Institución	1999	2000	2001
ISS	43		
Fundación Valle de Atriz	27		
Convida		77	
Cruz Roja		10	100
TOTAL	70	87	100

La investigación se efectuó con pacientes que acudieron a realizarse endoscopia superior por sospecha de enfermedad ulcerosa. La endoscopia se realizó por un médico especialista y con un equipo gastroduodenoscopia Olympus.

Inicialmente se determinó la presencia de *Helicobacter pylori* en biopsia con test de urea, donde de los 87 pacientes del año 2000, 61 de ellos tuvieron la prueba positiva para un 70.11%, y un 21.89 %

tuvieron un test de urea negativa. De los 100 pacientes del año 2001 únicamente 61 de ellos fueron positivos para la prueba con un 61 % y un 39 % fueron negativos para el test de urea.

Las enfermedades más frecuentes encontradas por endoscopia digestiva superior con prueba de ureasa positiva fueron: Gastritis crónica superficial, Gastritis crónica atrófica y no atrófica.

De las 257 muestras cultivadas se obtuvieron 61 aislados positivos para *Helicobacter pylori* con un 23.73 % y un 76.27 % los resultados fueron negativos. Ver cuadro 3.

Cuadro 3. Numero de aislamientos de *Helicobacter pylori*

INSTITUCIÓN	No DE MUESTRAS	AISLAMIENTOS
ISS	43	19
Fundación Valle de Atriz	27	9
Convida	87	27
Cruz Roja	100	6
TOTAL	257	61

Los aislamientos fueron confirmados por morfología macroscópica, microscópica (Hirschl, A.M. 1998), pruebas de identificación y comparación con el diagnóstico histológico.

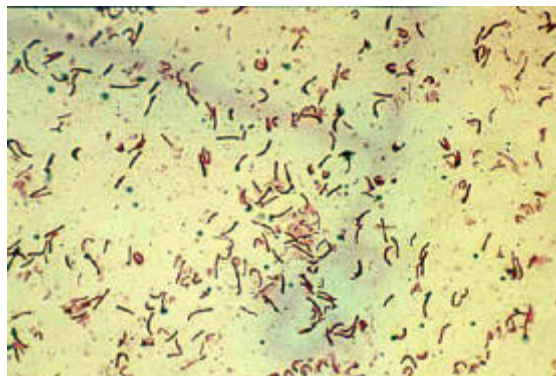
En medio agar Columbia suplementado con sangre de cordero desfibrinada al 8 % se observaron colonias circulares y translúcidas en forma de gotas de rocío de 1 a 2 mm de diámetro. Ver figura 1.

Figura 1. Morfología macroscópica de *Helicobacter pylori*



Con tinción de Gram observaron bacilos curvados, pleomórficos Gram negativos. Ver figura 2.

Figura 2. Microfotografía de *Helicobacter pylori*



Las pruebas bioquímicas de identificación para *Helicobacter pylori* dieron como resultado el test de urea positivo, prueba de oxidasa positiva y prueba de catalasa positiva .Ver figura 3 y Anexo C.

Figura 3. Pruebas para la identificación de *Helicobacter pylori*



En el Instituto de los Seguros Sociales se logró el mayor número de aislados con respecto al total de muestra, que corresponde a un 44.2 % y el menor de 6 % registrado en la Cruz Roja Colombiana. Esta variación pudo ser debido a las diferencias en las condiciones de laboratorio, cultivo, ó a los falsos negativos, por la probabilidad de tomar la biopsia en una zona de mucosa no colonizada, ó con bacterias de reducida variabilidad, por la lidocaina utilizada habitualmente en la endoscopia. y/o por el tratamiento con antibióticos. (Godwin, C.S. 1990). Ver cuadro 4.

Cuadro 4. Porcentaje de aislamientos de *Helicobacter pylori*

INSTITUCIÓN	No DE MUESTRA	AISLAMIENTOS	PORCENTAJE
ISS	43	19	44.2 %
Fundación Valle de Atriz	27	9	33.3%
Convida	87	27	31.1%
Cruz Roja	100	6	6%
TOTAL	257	61	23.73%

El resultado del cultivo se comparó con el diagnóstico histológico de la biopsia; de donde 52 de las muestras analizadas, 33 de ellas mostraron correlación positiva con el resultado del cultivo con un porcentaje de correlación del 63.46 % y un 36.54% una correlación negativa, probablemente a la tinción convencional utilizada, ya que la hematoxilina eosina no puede ser fiable si solo existen pocas bacterias, además el diagnóstico histológico depende enormemente de la experiencia del observador y de su destreza, así como de la calidad de la biopsia, el tamaño y la orientación de los especímenes, también son esenciales para un diagnóstico correcto y a las condiciones de laboratorio anteriormente mencionadas (Hirschl, A.M: 1998).

Analizando los datos por institución se observó que en Convida hay un mayor porcentaje de correlación entre el cultivo y el resultado del diagnóstico histológico con un 73.07 % y el menor en la Cruz Roja Colombiana con el 25 %. Ver cuadro 5.

Cuadro 5. Porcentaje de correlación de aislados con diagnóstico histológico

INSTITUCIÓN	AISLADOS	DIAGNOSTICO HISTOLOGICO	CORRELACION CON AISLADO	PORCENTAJE DE CORRELACION
ISS	19	13	9	69.23%
Fundación valle de Atriz	9	9	4	44.4%
Convida	27	26	19	73.07%
Cruz Roja	6	4	1	25%
TOTAL	61	52	33	63.46 %

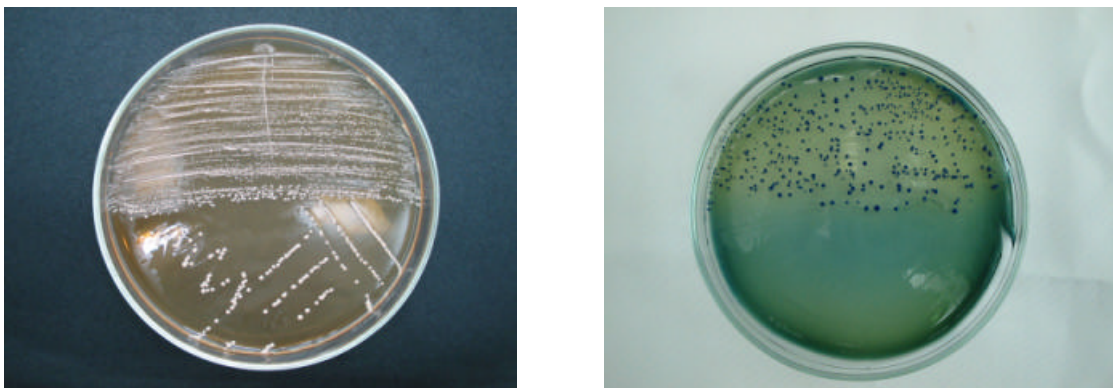
4.2 FASE II

ACTIVACION Y CONSERVACIÓN DE *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*

La cepa de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* fue aislado y conservado a partir del trabajo "Bacterias Lácticas bacteriocinogénicas y su efecto sobre bacterias patógenas asociadas a alimentos" (Barney, C.E. 1996). Esta cepa se activó completamente de 20 a 24 horas en caldo MRS comercial (Merck) estéril. Se realizó su cultivo en Agar MRS y Agar MRS modificado con azul de anilina para constatar su morfología tanto macroscópica como microscópica.

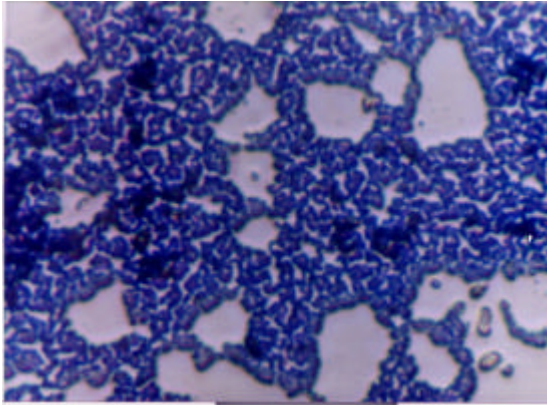
En el medio MRS comercial y MRS modificado con azul de anilina (Merck) se observaron colonias pequeñas, convexas, brillantes y cremosas. Ver figura 4.

Figura 4. Morfología macroscópica de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*: izquierda cultivo en agar MRS comercial. Derecha, cultivo en agar MRS modificado con azul de anilina



Con tinción de Gram se observaron bacilos cortos Gram positivos. Ver figura 5.

Figura 5. Microfotografía de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*

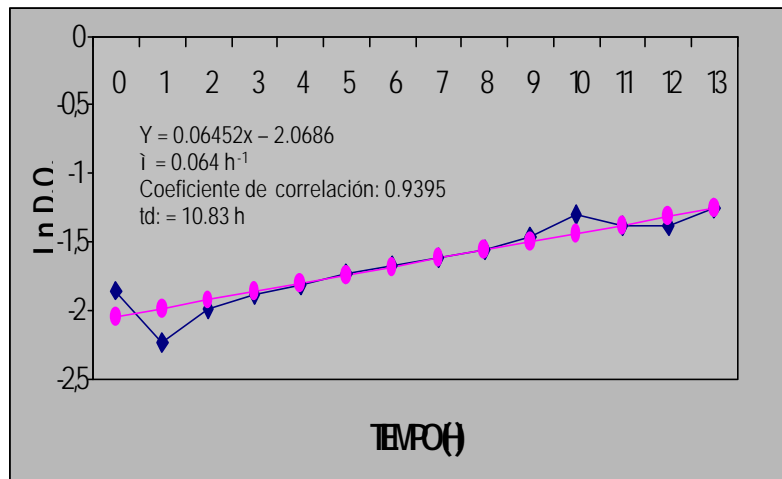


Para el proceso de fermentación se escogió el Medio Melaza con leche en polvo utilizado previamente en el trabajo "Protección Intestinal contra patógenos específicos a través de sustratos fermentados con *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*" (Pazos M., A. 2000). Este medio presenta buenas condiciones para el desarrollo y metabolismo de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*.

Se realizó fermentación en Matraz con *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* en medio melaza con leche en polvo con el fin de evaluar su cinética de crecimiento. El crecimiento y el comportamiento metabólico de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* en el medio Melaza con leche en polvo es estable durante la fase exponencial a partir de las 2 horas (T_2) hasta las 12 horas (T_{12}). Aunque después hay una alteración de comportamiento por la toma de nutrientes y la secreción de productos metabólicos como el ácido láctico.

La velocidad de crecimiento permanece constante durante esta fase con un valor de 0.06 h^{-1} . El tiempo de duplicación es de 10.83 horas lo que nos indica que *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* presenta un crecimiento lento. Ver figura 6.

Figura 6. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* en medio melaza con leche en polvo. Ln (Logaritmo natural), D.O. (Densidad óptica).



Al evaluar la biomasa y la producción de proteínas de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* en el medio Melaza con leche en polvo se observó un incremento uniforme desde el comienzo de la fermentación hasta las 10 horas (T_{10}) determinándose así el tiempo de cosecha con una biomasa de 93×10^{10} UFC/ml y una concentración de proteínas de 49.98 g/l. Posteriormente se presenta una disminución de dichos parámetros. Ver figura 7 y 8.

Figura 7. Producción de proteínas de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* en el medio Melaza con leche en polvo

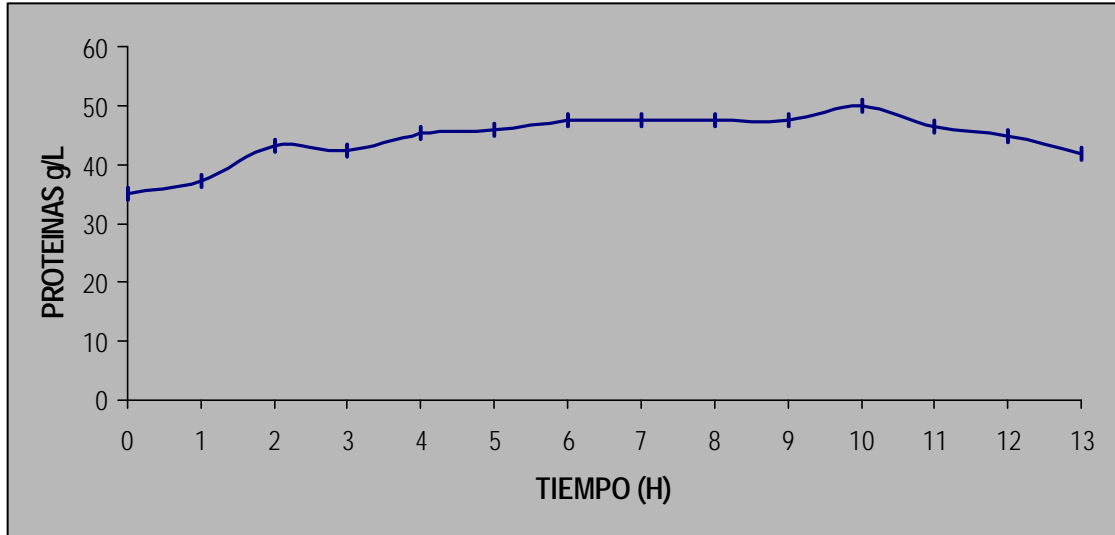
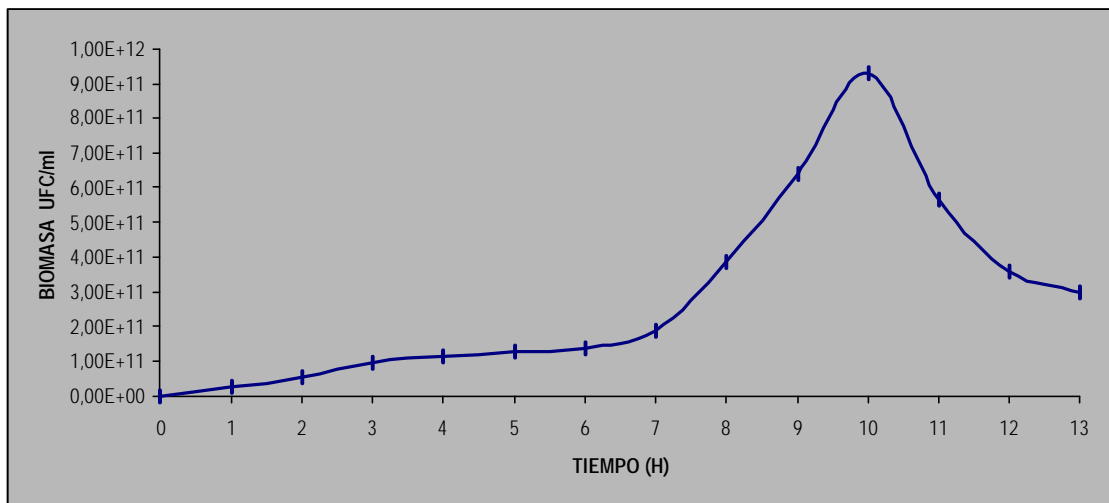


Figura 8. Formación de biomasa de *Lactobacillus case subsp rhamnosus* en Medio Melaza con leche en polvo



El decrecimiento que se presenta en la última fase y a las 24 horas (T_{13}) podría deberse al consumo de azúcares, disminución de fuentes naturales, formación de metabolitos y al descenso del pH (4.85) debido a la producción de ácido láctico por parte de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* lo que inhibe su crecimiento. Ver figura 9 y 10.

Figura 9. Consumo de azúcares totales por *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* en medio melaza con leche en polvo.

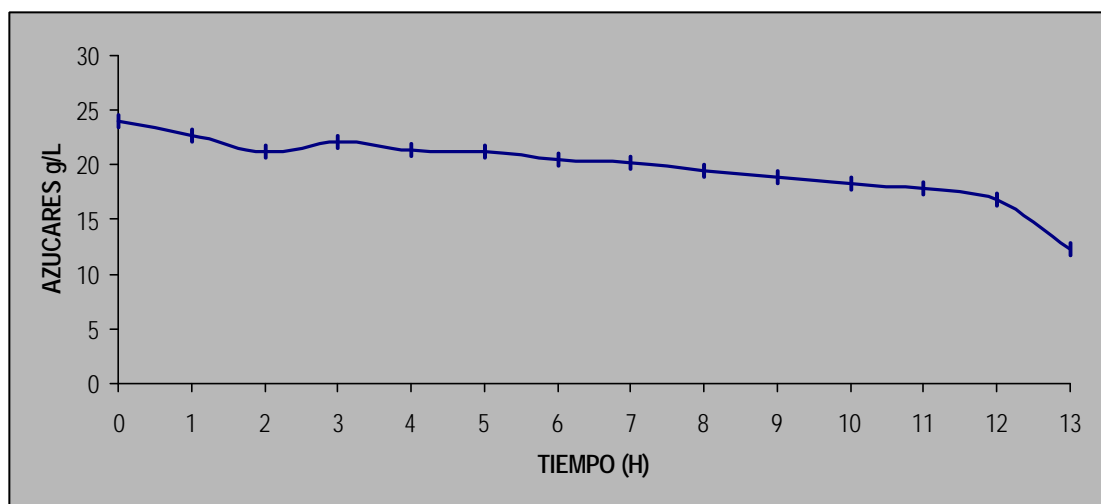
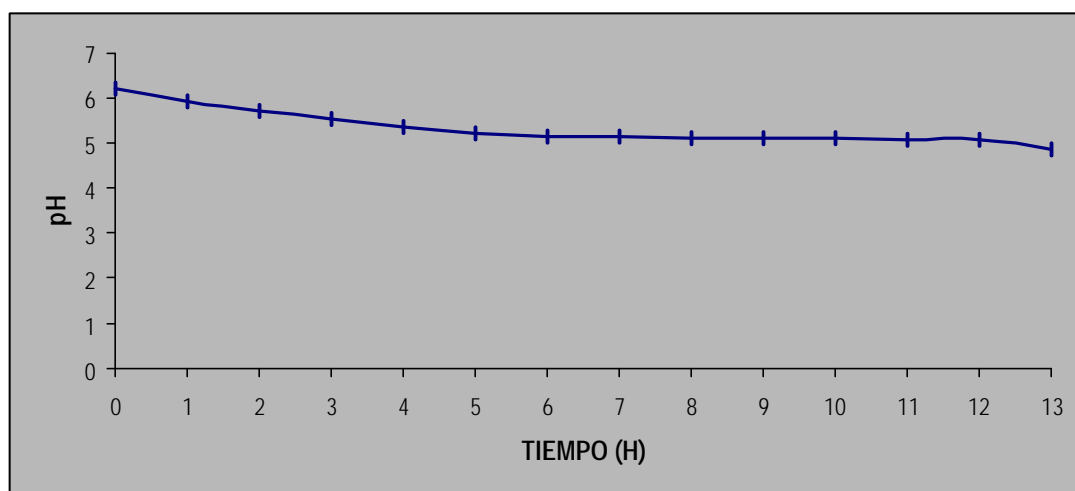


Figura 10. Cambios de pH de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* en el medio Melaza con leche en polvo.



Se estableció como un medio de comparación el medio MRS comercial (Merck) como referencia para constatar que el medio Melaza con leche en polvo constituye una mejor fuente de carbohidratos y nitrógeno lo cual favorece al crecimiento de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*.

El medio MRS comercial (Merck) presenta su punto más alto en la formación de biomasa a las 10 horas con una concentración de 7×10^{10} UFC/ml, siendo mucho menor en cuanto a la formación de biomasa del medio Melaza con leche en polvo siendo este el más óptimo para el desarrollo y el metabolismo de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*.

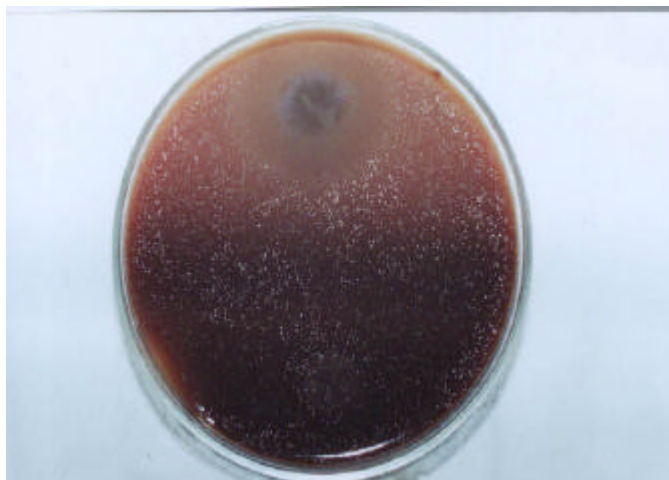
6.3. FASE III

ENSAYO DE INHIBICIÓN ANTAGÓNICA *in vitro*

Según los resultados obtenidos *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* en el sustrato de Melaza con leche en polvo es capaz de inhibir el crecimiento de *Helicobacter pylori* en condiciones de laboratorio Ver figura 11.

Evidenciado por la formación de halos o zonas claras alrededor del micropocillo que contiene la bacteria láctica, esto se debe probablemente a los diferentes mecanismos o propiedades que presentan las bacterias ácido lácticas entre ellas *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* como la producción de ácido láctico que puede inhibir el crecimiento de *Helicobacter pylori* *in vitro* (Midolo, P.D. 1995) como también la producción de bacteriocinas que ejercen un acción bactericida o bacteriostática contra bacterias patógenas (Parada, J.L. 1999), además estos microorganismos son capaces de afectar el crecimiento celular.

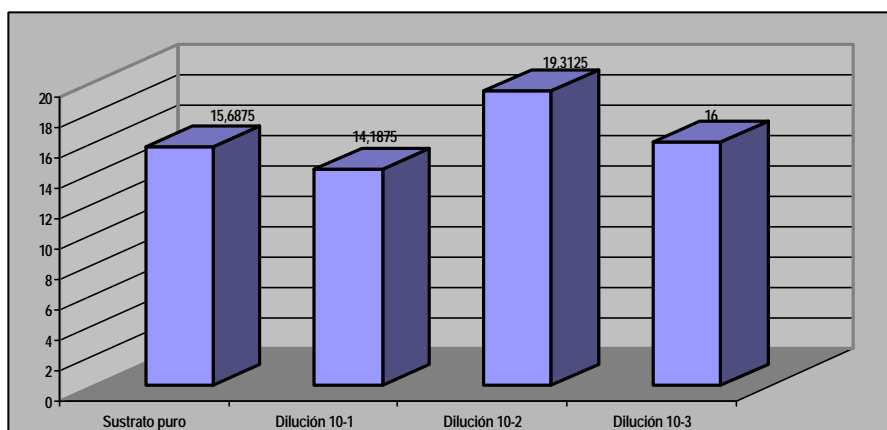
Figura 11. Inhibición de *Helicobacter pylori* (Parte superior) por *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* (Parte inferior). Método de los micropocillos.



El análisis de varianza muestra que el efecto antagónico de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* sobre el crecimiento de *Helicobacter pylori* es del 95 % de confiabilidad con un margen de error del 5 %. Ver anexo K.

Debido a que se presenta diferencias estadísticas significativas entre el diámetro de los halos y las diluciones del sustrato. Ver anexo J; se realizó la prueba de Tukey con la cual se determinó que la dilución 10^{-2} con una densidad celular de 98×10^5 bact lácticas/ml es la mejor para inhibir el crecimiento de *Helicobacter pylori* con respecto al sustrato puro y las diluciones 10^{-1} y 10^{-3} . Así lo demostró la prueba de significancia. Ver figura 12 y Anexo K. Posiblemente se debe a que en el sustrato puro y en la dilución 10^{-1} se encuentran un gran número de bacterias lácticas de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* que podrían estar en forma aglomerada en el medio obstaculizando en parte los procesos metabólicos por la falta de sustrato necesario, disminuyendo así probablemente la cantidad de bacteriocinas y de ácido láctico requerido para realizar la acción inhibitoria sobre el patógeno, en cambio que en la dilución 10^{-2} hay menor cantidad de bacterias.

Figura 12. Promedios de halos de inhibición antagónica de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* sobre el crecimiento de *Helicobacter pylori* (Prueba de Tukey)



CONCLUSIONES

Lactobacillus casei subsp rhamnosus es capaz de inhibir el crecimiento de *Helicobacter pylori* con un 95 % de confiabilidad y un error del 5 %, presentando diferencias estadísticas significativas demostradas con la prueba de Tukey.

Mediante los ensayos de antagonismo *in vitro*, con *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* inhibió el crecimiento de *Helicobacter pylori* de la mejor manera en la dilución 10^{-2} con una densidad celular de 98×10^5 bact/ml, formando un mayor halo con un diámetro promedio de 19.31 mm con respecto al sustrato puro y a las diluciones 10^{-1} y 10^{-3} .

De las 257 biopsias de mucosa gástrica humana se obtuvieron 61 aislados que corresponden a 23.73 %, de los cuales algunos fueron preservados para futuras activaciones. De dichos aislados el 63.46% presentaron correlación positiva con el estudio histológico. De acuerdo al sitio de toma de la muestra de tejido de mucosa gástrica, Convida presentó un mayor porcentaje de correlación entre el diagnóstico por cultivo y el diagnóstico por estudio histológico, esto es el 73.07% de correlación.

De acuerdo a la cinética de crecimiento, la mayor formación de biomasa de 93×10^{10} UFC/ml y la mayor producción de proteínas de 49.98 g/ml, se obtuvo a las 11 horas (T10) determinando así el tiempo de cosecha; de donde se puede concluir que el medio Melaza con leche en polvo es un medio que favorece el mejor crecimiento y desarrollo de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* que el medio MRS comercial utilizado como control.

RECOMENDACIONES

Realizar investigaciones que demuestren *in vivo* la actividad de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* como probiótico.

Para obtener un mayor éxito en el número de aislados se recomienda realizar el cultivo y si es posible su incubación en el sitio de toma de muestra asegurando la viabilidad de la bacteria y un buen crecimiento en las mejores condiciones.

Se recomienda la lectura de biopsia por histopatología mediante la utilización del método de tinción de Giemsa y otras tinciones que tienen una excelente sensibilidad y especificidad para *Helicobacter pylori* versus la de hematoxilina eosina.

Para asegurar el resultado positivo, verdadero en la validación de cualquier método utilizado para detectar la infección por *Helicobacter pylori*, se recomienda compararse con al menos otros dos métodos como el inmunohistoquímico, aceptándose la positividad absoluta cuando coinciden estos métodos.

En la activación de *Helicobacter pylori* se requiere estrictas condiciones de asepsia y el menor tiempo posible entre la extracción de la muestra de crioconservación en nitrógeno líquido y la siembra, evitando el descongelamiento brusco de la muestra, y por ende disminuyendo el shock térmico.

El medio Melaza con leche en polvo, se recomienda para el desarrollo, crecimiento y metabolismo de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* por los resultados obtenidos en esta investigación..

El medio Melaza con leche en polvo fermentado con *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*, puede en un futuro ser considerado como un producto probiótico gracias a su aporte de nitrógeno, carbohidratos y proteínas.

BIBLIOGRAFIA

ABDEL-BAR, N.; HARRIS, N.O. and RILL, R.L. Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*. In: Journal of food Science. Vol. 52 (1987); p. 411 - 415

ABEE T., TR; KLAENHAMMER and LETELLIER, L. Kinetic studies of lactacin F. a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that form poration complex in the citoplasmic membrane. In: Applied and Enviromental Microbiologic. Vol. 60, No. 3 (1994); p.1006 – 1013

ABBE T., F.M. *et al.* Mode of action of Nisin Z against *Listeria monocytogenes* scott a grow at high and low temperatures. In: Applied and Enviromental Microbiologic. Vol. 60, No. 6 (1994); p. 1962 - 1968

ADMINISTERED *Lactobacilli* on macrophage activation in mice. In: Journal of Dairy Research. Vol. 57. p. 255 - 564

AXELSSON, L.T. Lactic acid bacteria/clasification and phisiology / Salminen-VobWright. In: Lactic Acid Bacteria. (1993); p.1 - 55

----- and HOLCK, A. The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* LB706. In: Journal of Bacteriology. Vol. 177, No. 8 (1995); p. 2125 - 2137

----- *et al.* Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. In: Microbial Ecology in Health and Disease. Vol. 2 (1989); p.131 - 136

BARNEY, Carmen E. Bacterias lácticas bacteriocinogénicas : Efecto sobre bacterias patógenas asociadas a alimentos. Santiago de Cali, 1996, Tesis (Magíster en Microbiología). Universidad del Valle. Departamento de Microbiología.

BASKERVILLE, A. and NEWELL, D.G. Naturally occurring chronic gastritis and *C. pylori* infection in the Rhesus monkey : A potential model for gastritis in man. Vol. 29 (1988); p. 465 - 472

BLANCO, M. y PAJARES, J.M. Prevalencia de *Helicobacter pylori* en pacientes con úlcera péptica. En: Revista Especializada de Enfermedades Digestivas. Vol. 77 (1990); p. 5 - 12

BLASKMA, N.E. *et al.* Adjuvanticity of *Lactobacilli*. Differential effects of viable and killed bacteria In: Clin. Exp. Immunol. Vol. 37 (1979); p. 367 - 375

BONAVIDA, B. *et al.* Los efectos del consumo de Actimel sobre la inmunidad en adultos sanos. En activación de respuesta en la proliferación de las células-T-mediadoras contra el antígeno para la gripe. *s.l.*

BRINK, B.T. Application of metabolic properties of lactic acid bacteria. In: Lactic Acid Bacteria Research and industrial application in the agro-food industries. (1991); p. 67 - 76

CORREA, Pelayo. *et al.* *Helicobacter pylori* and gastric carcinoma: serum antibody prevalence in populations with contrasting cancer risks. En: Tribuna Medica. Vol. 66, No. 12 (1990); p. 2569 - 2574

----- Is gastric carcinoma an infections disease. In: Journal Medical. Vol. 325 (1991); p. 1170 - 1171

----- Diet modification and gastric cancer prevention. In: Tibuna medica. Vol. 89, No 6 (1994); p. 261 - 262

COVER, T.L. and BLASER, M.J. *Helicobacter pylori* : a bacterial cause of gastritis, peptic ulcer disease, and gastric cancer. In: News. Vol. 61 (1995); p. 21 - 26

CUELLO, C. Gastric cancer in Colombia. In: Juornal National Cancer Institute. Vol. 57 (1976); p. 2015

CUTTNER, F.A. *et al.* Accuracy of invasive and non invasive diagnose test *Helecobacter pylori* infection. In: Gastroenterology. Vol. 109 (1995); p.136 -141

DAESCHEL, M.A. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technology. (jan. 1989); p.164 -167

DELGADO BELLINO, Daniel. *Helicobacter pylori* : Una bacteria relacionada con la patología gastroduodenal. In: Untitled (1992). *s.l.*

DELGADO, P.A.; VALBUENA, R.J. y OLARTE, R.H. Cancer gástrico : Diez años de revisión (1971-1980) / Instituto Nacional de Cancerología. En: Tribuna Medica. Vol. 89, No. 6 (1994); p. 275 - 285

DELVES-BROUGHTON, J. Nisin and its uses as a food preservative. In: Food Technology. Vol. 44 (1990); p.100 - 117

DE MAN, J.C; ROGOSA, M. and SHARPE, M.E. A médium for the cultivation of *Lactobacilli*. In: Journal Applied Bacteriology. Vol. 23, No. 1 (1960); p.130 -135

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugar and related substances. In: Analisis Chemical. Vol. 28 (1956); p. 350 - 356

FARSHAW, R., MITCHELL, A. and BANKS, J.G. The use of microbial antagonism to increase the safety and stability of chilled food. In: Technical Memorandum Chipping Campden Food and Drink Research Association. No. 544 (1989)

FERNÁNDEZ, C.F., SHAHANI, K.M. AMER, M.A. Therapeutic rote of dietary *Lactobacilli* and *Lactobacilli* fermented darry products. In: Microbiology Reviews. Vol. 46 (1987); p. 343 - 356

FERRANDIZ S., Juan. and AMADOR, R., Javier. *Helicobacter pylori*. En: Sesiones Clínicas. Madrid, España : INSALUD. (mar. 1999)

FULLER, R. Probiotics in man and animals. In: Journal of applied Bacteriology. Vol. 66 (1989); p. 365 - 378

GAON, D. *et al.* Lactose digestion by milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human origin. In: Medicine. Vol. 55 (1995); p. 237 - 242

GASBARRINI, G.; CAMMATOTA, G. and GASBARRINI, A. The diagnosis of *H.pylori* infection : How when and why? In Perry F Andriulli A. In: Clinical application of Breath Test in gastroenterology and hepatology. (sep. 1998); p. 18 -19

GILLILAND, S.E. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. In: Microbiology Reviews. Vol. 87 (1990); p.175 - 188

GOLDIN, B.R. y GARBACK, S.I. El efecto de la leche y de la alimentación con *Lactobacillus* en la actividad enzimática bacteriana de los humanos. In: Journal Clínico Americano de Nutrición. Vol. 39 (1984); p. 756 - 761

GOODWIN, C.S. and ARMSTRONG, J.A. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori*. In: Eur Journal Clinical Microbiology Infection disease. Vol. 9 (1990); p. 1 – 3

GONZALEZ M., Blanca E. y GOMEZ, T. Manual probióticos. En: Resdyn. Vol. 2, No. 3 (jul –sep. 2001)

GRAHAM, D.Y. Infección por *Helicobacter pylori* en lesiones gastroduodenales : visión general de la infección por *Helicobacter pylori* Historia, Epidemiología, Enfermedad y Futuro. Barcelona, España : Prous Science, 1998. p. 6 - 7

GUERÍN-DANAN, C. *et al.* Leche fermentada con cultivos de yogurt y *Lactobacillus casei* comparada con yogurt y leche gelatinizada: su influencia sobre la flora intestinal en niños sanos. En: Journal Clínico Americano de Nutrición. Vol. 67 (1998); p. 111 - 117

----- *et al.* Patrón del metabolismo y composición de la microflora fecal en infantes de guarderías de 10 a 18 meses de edad. En: Jornal Pediátrico de Gastroenterología y Nutrición. Vol. 25 (sep. 1997); p. 281 – 289

GUERRERO F. Gladys; GUZMÁN, Sofia y YANDAR, Nubia. Capacidad inhibitoria de un sustrato fermentado con *Lactobacillus acidophilus* aislado del tracto intestinal humano sobre *Vibrio Cholerae* 01 Ogawa in Vitro. San Juan de Pasto, 2002, Trabajo de Grado (Biólogo con Énfasis en Microbiología). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Departamento de Biología.

HANDT, L.K. *et al.* Characterization of feline *Helicobacter pylori* strains and associated gastritis in a colony of domestic cats. In: Journal Clinic Microbiology. Vol. 33 (1995); p. 2280 - 2289

HANSON, L.E. *et al.* Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in subtypes of gastric cancer. In: Gastroenterology. Vol. 109 (sep. 1995); p. 885 – 888

HAVENAAR, R. and J.H.J. Probiotics. In: Lactic Acid Bacteria. Research and industrial application in the agro-food industries. (1992); p. 235 - 243

HIRSCHL, A.M. Infección por *Helicobacter pylori* en lesiones gastroduodenales : Microbiología de *Helicobacter pylori* Aspectos generales, diagnóstico y resistencia. Barcelona, España : Prous Science, 1998. p. 17 - 19, 22 - 28

----- *et al.* Kinetics of specific Ig. G, antibodies for monitoring the effect of anti-*Helicobacter pylori* Chemotherapy. In: Journal Infection Disease. Vol. 168 (1993); p. 763 - 766

IANELLO, D. *et al.* Effects of oral administration of a variety of bacteria on depressed macrophage infections in tumor-bearing rats. In: Ann. Inmunol. Vol. 135 (1984); p. 345 - 352

JOHANSSON, M.L. *et al.* Administration of different *Lactobacillus strains* in fermented oatmeal soup: *in vivo* colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. In: Applied and Environmental Microbiologic. Vol. 59, No. 1 (1993); p.15 - 20

KAILA, M. *et al.* Aumento de la circulación de células secretoras de anticuerpos en respuesta a la diarrea humana por el efecto de una clase de lactobacilo humano. En: Revista Pediátrica. Vol. 32 (1992); p.141 - 144

KANDLER, O. and WEISS, N. Regular, Nonsporing. Gram. positive rods. In: Bergey S. Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2 (1990); Baltimore, Estados Unidos : Williams and Wilkins. p.1209 - 1234

KATO, Y.; YOKOKURA, T. y MUTAI, M. Activación de macrófagos por *Lactobacillus casei* en ratas. En: Microbiología inmunológica. Vol. 27 (1983); p. 611 – 613

----- ENDO, K. and YOKOKURA, T. Effects of oral administration of *Lactobacillus casei* on antitumor responses induced by tumor resection in mice. In: International Journal Immunopharmacol. Vol. 16 (1994); p. 29 - 36

KATZ, U. y GILMAN, R.H. Infección por *Helicobacter pylori* en infecciones gastroduodenales : tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori* en los países en vías de desarrollo. Barcelona, España : Prous Science, 1998. p. 256

KLAENHAMMER, T.R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. In: Biochimic. Vol. 70 (1998); p. 337 - 349.

KOLTS, B.E. *et al.* *Helicobacter pylori* detection : aquality and cost analysis. In: American Journal Gastroenterology. Vol. 88 (1993); p. 650 - 655

LEUNK, R.D. *et al.* Cytotoxic activity in brain- culture filtrates of *Campylobacter pylori*. In: Journal Medical Microbiology. Vol. 26 (1988); p. 93 - 99

LEWUS, C.B., KAISER, A. and MONTEVILLE, T. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. In: Applied and Environmental Microbiology. Vol. 57, No. 6 (1991); p.1683 – 1688

LING, W.H. *et al.* Formación de colonias y la actividad enzimática fecal luego de la administración de *Lactobacillus GG* en personas mayores residentes en geriátricos. En: Ann. Nutr. Met. Vol. 36 (1992); p.162

LOPEZ BREA, Manuel. *Helicobacter pylori* : Retos para el siglo XXI. 1999. [nov.2002]. <http://www.helicobacterspain.com>.

LOWRY, O.H. *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. In: Journal Bioloy Chemic. Vol. 193 (1951); p. 265 - 275

MADIGAN, Michael T.; MARTINKO, John M. y PARKER, Jack. Biología de los Microorganismos. Madrid, España : Prentice hall Iberia. Bed., 1999. p. 718 - 722

MARSHALL, B.J. *Helicobacter pylori* : The etiologic agent for peptic ulcer. En: JAMA. Vol. 274 (oct. 1995); p. 1064 - 1066

----- Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. In: Lancet. (1983); p.1273 -1475

----- Treatment strategies for *Helicobacter pylori* infection. In: Gastroenterology Clinics of north América. Vol. 221 (mar. 1993); p. 106 - 183

MATEUS G., Pedro F. Producción Intestinal de Productos Lácteos. *s.l.*

McCARTHY, C.J. *et al.* Short report: treatment of *Helicobacter pylori* in patients with duodenal ulcer. In: Journal Medical. Vol. 305, No. 7171 (1992); p. 502 - 504

MEGRAUD, F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection : some fundamental questions. In: Eur Journal Gastroenterology and Hepatology. Vol. 5 (1993); p. 60 - 63

----- Trasmition of *Helicobacter pylori* : fecal – oral versus oral – oral. In: Aliment Pharmacol. Vol. 2 (1995); p. 85 - 91

MIDOLO, P.D. *et al.* *in vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. In: Journal Applied Bacteriology. Vol. 79, No. 4 (oct. 1995). Australia. p. 475 - 479

MORELLI, L. Molecular biology in probiotics. In: Lactic Acid Bacteria Research and industrial applications in the agro-food industries / Facolta di Agraria. (1992). Piacenza, Italia : UCSC, 1992 p. 215 - 220

MULLER, E. and RADLER, F. Caseicin, a bacteriocin from *Lactobacillus casei*. In: Folia. Microbial Praha. Vol. 38, No. 6 (1993); p. 441 - 446

NOMURA, A. *et al.* *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. In: New England Journal of Medicine. Vol. 325 (oct. 1991); p. 1123 - 1136

NOVEL, G. Taxonomic et phylogenic en les Bacteries Lactiques. In: Recherche et application industrielles en agro – alimentarse / Actes du colloque lactic. Vol. 91 (1991)

PAJARES, J.M.; CORREA, P. y PEREZ, G.I. Infección intestinal *Helicobacter pylori* en lesiones gastroduodenales. Barcelona, España : Prous Science, 1998. p. 83 - 94

PARADA, José Luis. Bacterias Lácticas Usos en fermentaciones y como probióticos. Congreso Internacional de Microbiología Industrial. Universidad Javeriana. Santa Fé de Bogotá 1999.

PAZOS, M. Alvaro Jairo. Protección Intestinal contra patógenos específicos a través de Sustratos fermentados con *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*. Santiago de Cali, 2000, Tesis (Magister en Microbiología). Universidad del Valle. Departamento de Microbiología.

PEDONE, C.A. *et al.* El efecto de complementar la dieta con leche fermentada con *Lactobacillus casei* DN. 114 001, en casos de diarrea aguda en niños asistentes a guarderías. In: Journal Internacional De Práctica Clínica. Vol. 53 (1999); p. 179 - 184

PEITERSEN, N. Probiotics starter cultures for food products. In: Lactic Acid Bacteria / Chr. Hanssen's Laboratorium Denmark Hoersholm Denmark. (1992); p. 227 - 233

PERDIGÓN, G. *et al.* El efecto de *Lactobacillus* administrados oralmente sobre la activación de macrófagos en ratas. In: *Infection Immunology*. Vol. 53 (1986); p. 404 - 410

----- *et al.* Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. In: *Journal of Dairy Research*. Vol. 57 (1986); p. 255 - 264

----- *et al.* Immunomodulating effects of lactic acid bacteria on mucosa and tumoral immunity. In: *International Journal Immunother.* Vol. 9 (1993); p. 29 – 52

----- *et al.* Prevention of gastrointestinal infection using immunobiological methods with milk fermented with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. In: *Journal of Dairy Research*. Vol. 57 (1990); p. 255 - 264

PEREZ M, Gaspar. Breve introducción a los probióticos / Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. Burjassot, Valencia : CSIC. *s.l.*

----- *et al.* Factores que regulan la glucólisis en *Lactobacillus casei*. In: *Manual de Ciencia y Tecnología*. (2001)

PÉREZ – PÉREZ, G.I. Infección por *Helicobacter pylori* en lesiones gastroduodenales : Mecanismo de Patogenicidad de *Helicobacter pylori*. Barcelona, España : Prous Science, 1998. p. 107 - 113

PEURA, D.A. *Helicobacter pylori* : a diagnostic dilemma and dilemma of diagnosis. In: Gastroenterology. Vol. 109 (jul. 1995); p. 313 – 314

PUJATO, Dolores. Qué son los probióticos?. En: Respyn. Vol. 3, No. 6 (jul - sep. 2002); P. 1 - 2

QUAN KIU VAZQUEZ, Elizabeth. Probióticos : Protección para la salud intestinal. En: Gastroenterología. Vol. 201 (abr. 2000); p. 1 - 2

RAMOS, F.J. *et al.* El cáncer del tubo digestivo : *Helicobacter pylori* y cáncer gástrico. En: Boletín oncológico. (1997)

RENNER, E. Culture Dairy Products in human nutrition. In: IDF Bulletin. Vol. 255. (1991)

REQUENA, T. y PELAEZ, C. Actividad antimicrobiana de bacterias Lácticas producción de bacteriocinas. En: Revista Española de Ciencias y Tecnología de Alimentos. Vol. 35, No. 1 (1995); p. 19 - 44

RIEGG, S.J.; DUNN, B.E. and BLASER, M.J. Microbiology and pathogenesis of *Helicobacter pylori*. In: Blaser MJ. Smith PD Ravdin JL. Infections of the Gastrointestinal Tract Raven Presse. Vol. 39 (1985); p. 535 - 549

RODRIGUEZ, S. Producción de Biomásas lácticas a partir de harinas de yucas. Santiago de Cali, 1995, Tesis (Magister en Biotecnología). Universidad del Valle. Departamento de Biología .

ROZALSKY, A.; SIDORCZYK, Z. and KOTELKO, K. Potential virulence factors of *proteus bacilli*. In: Microbiol Mol Biol Red. Vol. 61 (1997); p. 65 - 89

SAITO, H.K.; SATO, and TOMIOKA, H. Enhanced resistance of *Lactobacillus casei* 9018 ainst *Listeria* infection in mice. In: Medical Biology. Vol. 104 (1982); p. 171 - 175

SALMINEN, S. and WRIGHT, V.A. Lactic Acid Bacteria in health and disease / Salminen Von Wright. In: Lactic Acid Bacteria. (1993); p. 199 – 219

SAKAGAMI, T. *et al.* The endotoxin of *Helicobacter pylori* is a modulator of host-dependent gastritis. In: Infection Immunology. Vol. 65 (1997); p. 3310 - 3316

SARMIENTO Q, Fernando; JARAMILLO, Lina. y MURCIA, Susana. Pruebas diagnosticas para *Helicobacter pylori*. (1998). *s.l.*

SALOFF-COSTE, C.J. La microflora gastrointestinal y las leches fermentadas. En: Danone World Newsletter. No. 14 (ene. 1996)

----- Qué son los Probioticos?. 1997. http://www.danone_newsletter.fr/.

SAXELIN, M. *et al.* The use of a human *Lactobacillus casei* strain GG in the prevention and treatment of diarrhoea. In: Les Bacteries Lactiques. Recherche et Applications Industrielles en Agro-alimentarie / Actes du colloque LACTC. Vol. 91 (1992)

SCHLEIFER, K.H. *et al.* Phylogenetic relationships of lactic Acid Bacteria and their identification with nucleic acid probes. In: Lactic Acid Bacteria. Research and industrial application in the Agro-Food Industries. (1991); p. 23 - 32

STANIER, R. *et al.* The lactic acid bacteria. In: The Microbial World. (1996) New Jersey. p. 496 - 500

STEER, H.W. and NEWELL, D.G. Immunological identification of *Campylobacter pyloridis* in Gastric biopsy tissue. In: Lancet (1985); p. 2 - 38

SUNG, J.J. *et al.* Antibacterial treatment of gastric ulcers associated with *Helicobacter pylori*. In: New England journal of Medicines. Vol. 332 (ene. 1995); p. 139 - 142

SZLYLIT, O. y ANDRIEUX, C. Efectos fisiológicos y patofisiológicos de la fermentación de carbohidratos. En: Revista Mundial de Nutrición Dietética. Vol. 74 (1993); p. 88 - 102

TAGG, J.R.; DAJANI, A.S. and WANNAMAKER, L.W. Bacteriocins of Gram positive bacteria. In: Bacteriology Review. Vol. 40 (1976); p. 722 - 756

TALLEY, NJ. *et al.* Triple therapy for *Helicobacter pylori* in non-ulcer dyspepsia. In: American Journal Gastroenterology. Vol. 86 (1991); p. 121 - 123

TANNOCK, G.W. Análisis de la microflora intestinal : un renacimiento Antoine Van Leewenhock.

En: Rev. Vol. 76, No. 1/4 (1999); p. 265 – 278

THOREUX, K. *et al.* Modulación de la proliferación, segundo nivel de mensaje y expresión morfológica de la línea epitelial del intestino de las ratas IEC-6 por la acción de la leche fermentada.

En: Ciencia láctea. Vol. 79 (1996); p. 33 - 43

TORRES, R. Flora Intestinal, Probiótico y Salud. En: Dietenet. Vol. 3 (1992); p. 309 - 314

WILLETT, H.P. Microbiología : Metabolismo energético. 18 ed. Buenos Aires, Argentina : Joklik,

W.K. Willett, H.P. Amos, D.B, 1989. p. 54 – 84

WILLIAMS, E.S. Roles of *Lactobacillus* in the intestinal tract. In: Journal of food Protection. Vol. 42, No. 3 (1979); p. 259 - 262

YÉPES, Maria Clara. *et al.* Prevalencia de la infección de *Helicobacter pylori* en el corregimiento de Nariño. (1997)

ZETTERSTROM, R.; BENNET, R. and NORD, K.E. La alimentación infantil temprana y la microbiología intestinal. En: Acta Pediátrica. Vol. 36 (1994). Japón. p. 562 - 571

ANEXOS

Anexo A. Composición de medios de cultivo.

Medio Melaza-Leche

Que contiene 1000 ml de agua destilada(por duplicado)

14.97 g de melaza

20 g de carbonato de calcio

2 g de citrato de amonio

2 g de fosfato de potasio

72 g de leche en polvo

Inóculo 100 ml

Medio MRS comercial

Para 100 ml de agua destilada:

Medio MRS modificado con azul de anilina

En 10 ml de agua destilada estéril se disuelven 0.2 g de azul de anilina y se autoclava a 121 °C y a 15 lb de presión.

Proporción: A un litro de MRS estéril se agrega 3 ml de azul de anilina.

Medio Agar Sangre

19.5 g de agar columbia

40 ml de sangre desfibrinada de cordero al 8 %

460 ml de agua destilada estéril

Medio Agar Sangre con suplemento Dent

Se adiciona 2 ml de agua destilada estéril en el frasco de suplemento Dent (oxid), este contenido se utiliza para 500 ml de medio agar sangre.

Test de Urea

Urea al 10% ----- 10 g de urea

100 ml de agua destilada estéril

Rojo fenol al 0.1% ----- 0.1 g de rojo fenol

100 ml de agua destilada estéril

Preparación: Se adiciona 50 gotas de rojo fenol por cada 25 ml de urea.

Solución Salina

NaCl al 0.9%----- 0.9 g de NaCl

100 ml de agua destilada estéril

Solución Peptonada

Peptona al 0.1%----- 0.1 g de peptona bacteriológica

100 ml de agua destilada estéril

Anexo B. Determinación de proteínas

METODO DE LOWRY MODIFICADO

Fundamento: Las proteínas reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu para dar un complejo color azul, (debido a la reacción del cobre alcalino con la proteína). La intensidad del color depende del numero de aminoácidos presentes y enlaces peptídicos y cambiará según la clase de proteína; la solución azul muestra una absorbancia máxima a 750 nm . Rango de linealidad entre 0-300 mg/L.

Reactivos:

Solución A Diluir 0.5 g de tartrato de sodio y potasio, 25 g de carbonato de sodio, 125 ml de hidróxido de sodio 1 N en 125 ml de agua destilada.

Solución B: Diluir 2 g de tartrato de sodio y potasio, 1 g de sulfato de cobre en 10 ml de hidróxido de sodio 1 N.

Solución C: Preparar una solución de agua destilada y reactivo de Folin-Ciocalteu en proporción 14:1 (Preparar al momento de usar).

Solución estándar de Seroalbúmina bovina: Disolver 15 mg en 50 ml de agua destilada, el resto se almacena en congelador (Concentración final 300 mg/L).

Curva Estándar

Establecer una curva estándar de 0 a 300 mg/L. Dentro de una serie de tubos de ensayo o balones aforados de 0-1-2-4-7-5-8 y 10 ml de solución de seroalbúmina bovina y completar a 10 ml con agua destilada.

Procedimiento

- Ajustar 1 ml de patrones de la curva estándar y muestras por duplicado.
- Adicionar 0.5 ml de NaOH 2 N a todos los tubos.
- Colocar en baño María a temperatura de ebullición durante 10 minutos.
- Reposar en baño de agua fría.
- Adicionar 0.5 ml de H₂SO₄ 2.6 N.
- Adicionar 0.9 ml de solución A.
- Llevar por 10 minutos a baño María a 50° C.
- Reposar en baño de agua fría.
- Adicionar 0.1 ml de solución B.
- Colocar por 10 minutos en la oscuridad.
- Preparar la solución C y adicionar 3 ml :

Reactivo de Folin-Ciocalteu para 50 ml en balón aforado:

14 ml	1 ml Reactivo
50 ml	X

50/14= 3.57 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu

- Llevar 10 minutos a baño María a 50°C.
- Reposar en baño de agua fría.
- Leer absorbancia a 750nm y a tras luz.

Anexo C. Determinación de azúcares totales

METODO DE ANTRONA O DUBOIS

Fundamento: La reacción de Antrona constituye la base de un método conveniente para la determinación de hexosas, aldopentosas y ácidos hexourónicos, bien sea que estén libres o formando parte de los polisacáridos. La solución azul-verdosa muestra una absorción máxima a 625 nm.

Reactivos:

- Antrona
- Acido sulfúrico 10 y 96%
- Glucosa grado reactivo

La vidriería para las dosificaciones como para las diluciones deben estar previamente lavadas con H_2SO_4 al 10%, se dejan en remojo los tubos con el mismo ácido por 24 horas, luego se desocupan los tubos y se dejan invertidos para su secado por lo menos 3 horas.

Curva Estándar:

Preparación del reactivo de Antrona: Disolver 200 mg de Antrona en 100 ml de H_2SO_4 al 96%. Conservar en el erlenmeyer de 200ml cubierto con papel aluminio. Antes de agregar la Antrona se coloca un magneto y se lleva a agitación por 5 minutos.

Solución Madre: Disolver 0.1 g de glucosa en un balón volumétrico de 200ml, hasta completar su volumen con agua destilada y estéril. De esta solución se toman 10 ml y se completa hasta 100 ml en un balón volumétrico (100 ml).

Dilución Patrón: Establecer una curva estándar de 0 a 50 mg/L. Después de efectuar una dilución de 1/10 de la solución madre (50mg/L), depositar en una serie de tubos 0-0.25-0.50-0.75-1.0-1.25-1.50-1.75-2.0-2.5 ml de la solución madre y completar a 2.5 ml con agua destilada.

Procedimiento:

Tanto la curva estándar como las muestras a dosificar sufren el mismo tratamiento, más la dosificación de azúcares totales es realizada sobre 2.5 ml de muestra convenientemente diluida conservados en baño de hielo.

Para las muestras de azúcares se hacen diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , en agua destilada, filtrada y estéril para correr D.O. (La densidad óptica debe estar entre 0 y 1, si se pasa se debe diluir).

El blanco se prepara con 2.5 ml de agua destilada más 5 ml del reactivo de Antrona.

Al agregar la Antrona no debe haber mucha variación de tiempo.

- Con un agitador de tubos mezclar hasta homogeneizar la solución.
- Llevar a ebullición durante 10 minutos.
- Enfriar dentro de un baño de hielo, esperar 5 minutos y llevar al agitador de tubos.
- Agitar y aflojar las tapas de los tubos (sin destaparlos), esperar 5 minutos para eliminar las burbujas de aire.

Leer a 625 nm contra blanco.

Anexo D. Determinación de biomasa por recuento en placa

- Suministra información del número de UFC/ml de fermento láctico, se diluyó 1 ml en 9 ml de agua peptonada al 0.1% y se continuó con una serie de diluciones decimales, empezando de la dilución 10^{-1} a 10^{-6} en los tiempos 0, 1, 2; de la dilución 10^{-1} a 10^{-7} en los tiempos 3,4; de la dilución 10^{-1} a 10^{-8} en los tiempos 5,6; de la dilución 10^{-1} a 10^{-9} en los tiempos 7,8; de la dilución 10^{-1} a 10^{-10} en los tiempos 9, 12 y a las 24 horas.
- Se siembra las tres últimas diluciones de cada tiempo en cajas de petri con agar MRS comercial (Merck) se sembraron por duplicado y en superficie con 0.1 ml de las diferentes diluciones, para lograr una mejor homogeneización se hizo un extendido con perlas de vidrio en forma radial y circular paralelamente teniendo en cuenta de retirar todas las perlas cada que siembre el inóculo de cada dilución, se llevó a incubación por 72 horas de 35- 37°C.
- Se tomaron en cuenta las cajas petri con diluciones que presentaron entre 30 y 300 unidades formadoras de colonias (UFC), se hizo un promedio, se multiplicó por la dilución y por 10 para reportar el volumen por ml del fermento láctico

Anexo E. Ficha de datos de pacientes muestreados

FECHA:

NOMBRE:

ORIGEN:

PROCEDENCIA:

DIRECCION:

TELEFONO:

EDAD:

OCUPACION:

INSTITUCION:

SITIO DEL RESULTADO:

SINTOMAS:

DIAGNOSTICO ENDOSCOPICO:

ANTECEDENTES PATOLOGICOS PERSONALES:

OPERACIONES:

DIAGNOSTICO HISTOLOGICO:

RESULTADO DEL CULTIVO:

PRUEBAS: OXIDASA:

PEROXIDASA:

UREASA:

TINCION DE GRAM:

MUESTRA:

TEST DE UREA:

Anexo F. Resultado del muestreo de los años 1999, 2000 y 2001

AÑO 1999

N° DE MUESTRAS	DIAGNOSTICO HISTOLOGICO	RESULTADOS DEL CULTIVO
1	+	+
2	--	--
3	+	+
4	+	--
5	--	--
6	--	+
7	+	+
8	+	--
9	--	+
10	--	+
11	+	--
12	--	+
13	--	--
14	+	--
15	--	+
16	--	--
17	--	--
18	--	--
19	+	--
20	--	--
21		--
22	--	--
23	--	--
24	--	--
25	+	+
26		--
27	+	--
28	--	--
29		+
30	--	--
31	--	--
32		--
33		+
34	--	--
35	--	--
36	--	--
37	--	--
38		+
39		--
40	--	--
41	--	--
42	+	+
43	+	+
44	--	+
45		+
46	--	--
47	+	+
48	--	--
49	--	--
50	--	+
51	+	+
52	+	--
53	+	+
54	+	+
55	+	+
56	--	--
57	--	--
58	--	--
59		+
60		--

61		--
62	--	--
63	+	+
64	+	+
65		+
66	--	--
67	--	+
68	+	+
69	+	-
70	+	-

AÑO 2000

No. DE MUESTRA	TEST DE UREA	DIAGNOSTICO HISTOLOGICO	RESULTADO DE CULTIVO
1	+	-	+
2	+	-	+
3	+	-	+
4	+	-	-
5	+	-	-
6	+	+	-
7	-	-	-
8	+	+	+
9	+	+	+
10	-	-	-
11	+	-	-
12	+	-	-
13	+	-	-
14	-	-	-
15	+	-	-
16	+	-	-
17	-	+	-
18	-	-	-
19	-	-	-
20	+	+	-
21	+	+	+
22	-	-	-
23	+	+	-
24	+	+	-
25	+	-	-
26	+	+	+
27	-	+	-
28	+	+	-
29	+	-	-
30	+	+	-
31	+	+	-
32	+	-	-
33	+	-	-
34	+	-	-
35	+	-	-
36	+	+	+
37	+	+	-
38	-	-	-
39	+	+	+
40	+	-	-
41	+	+	+
42	+	-	-
43	+	-	-
44	-	-	-
45	+	+	-
46	-	-	-
47	+	+	+
48	+	-	-
49	-	-	-
50	-	-	-
51	+	+	+
52	+	+	+
53	+	+	+
54	-	-	-
55	+	-	+
56	+	-	+
57	+	-	+
58	-	-	+
59	-	+	-
60	-	+	-
61	+	-	+
62	+	+	+
63	+	+	+

64	+	+	+
65	+	+	+
66	-	-	-
67	-	-	-
68	-	-	-
69	+	-	-
70	-	+	-
71	+	+	+
72	+	+	-
73	+	+	+
74	-	-	-
75	-	-	-
76	+	-	-
77	+	+	+
78	-	-	-
79	+	-	-
80	-	-	-
81	-	-	-
82	+	-	-
83	-	+	-
84	+	-	-
85	+	-	-
86	+	-	-
87	+	+	+

AÑO 2001

No. De MUESTRAS	TEST DE UREA	RESULTADO HISTOLOGICO	RESULTADO DEL CULTIVO
1	+	-	-
2	+	+	-
3	+	-	-
4	+	-	-
5	-	-	-
6	+	-	-
7	+	-	-
8	+	-	-
9	+	-	-
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-	-	-
15	-	-	-
16	-	-	-
17	+	-	-
18	+	-	-
19	-	-	-
20	+	-	-
21	+	-	-
22	+	-	-
23	+	-	-
24	-	-	-
25	-	-	-
26	+	-	-
27	-	-	-
28	+	-	-
29	-	-	-
30	-	-	-
31	-	-	-
32	-	-	-
33	-	-	-
34	-	-	-
35	+	-	-
36	+	-	-
37	-	-	-
38	+	-	-
39	+	-	-
40	-	-	-
41	+	-	-
42	+	-	-
43	+	-	-
44	+	-	-
45	+	-	-
46	+	+	-
47	+	+	-
48	+	-	-
49	-	+	-
50	+	+	-
51	-	-	-
52	-	-	-
53	-	-	-
54	-	+	-
55	+	-	-
56	+	+	-
57	+	+	-
58	+	-	-
59	-	-	-
60	-	+	-
61	+	-	-
62	+	-	-
63	-	-	-
64	-	-	-

65	-	-	-
66	+		-
67	+		-
68	-	-	-
69	-	-	-
70	+	-	-
71	+	-	-
72	+		-
73	+	+	-
74	-		-
75	+		+
76	+	-	+
77	+	-	-
78	+	+	-
79	-	-	-
80	-	-	-
81	+	-	-
82	+		-
83	+	-	-
84	+	-	-
85	+	+	-
86	+	+	-
87	+	-	-
88	-	-	-
89	+	+	-
90	+	-	-
91	+	-	+
92	+	+	-
93	+	+	+
94	-	-	-
95	-	-	-
96	-	-	+
97	+	-	-
98	+		+
99	+	-	-
100	+	-	-

Anexo G. Resultados de las pruebas para la identificación de los cultivos de *Helicobacter pylori*

AÑO 1999

No DE MUESTRA	TEST UREASA	OXIDASA	CATALASA	TINCION GRAM BACIOS CURVOS GRAM-NEGATIVOS
1	+	+	+	+
3	+	+	+	+
6	+	+	+	+
7	+	+	+	+
9	+	+	+	+
10	+	+	+	+
12	+	+	+	+
15	+	+	+	+
25	+	+	+	+
29	+	+	+	+
31	+	+	+	+
33	+	+	+	+
38	+	+	+	+
42	+	+	+	+
43	+	+	+	+
44	+	+	+	+
45	+	+	+	+
47	+	+	+	+
50	+	+	+	+
51	+	+	+	+
53	+	+	+	+
54	+	+	+	+
55	+	+	+	+
59	+	+	+	+
64	+	+	+	+
65	+	+	+	+
67	+	+	+	+
68	+	+	+	+

AÑO 2000

No. MUESTRA	PRUEBA DE OXIDASA	PRUEBA DE CATALASA	TEST DE UREASA	TINCION DE GRAM BACILOS CURVOS GRAM-NEGATIVOS
1	+	+	+	+
2	+	+	+	+
3	+	+	+	+
8	+	+	+	+
9	+	+	+	+
21	+	+	+	+
26	+	+	+	+
36	+	+	+	+
39	+	+	+	+
41	+	+	+	+
47	+	+	+	+
51	+	+	+	+
52	+	+	+	+
53	+	+	+	+
55	+	+	+	+
56	+	+	+	+
57	+	+	+	+
58	+	+	+	+
61	+	+	+	+
62	+	+	+	+
63	+	+	+	+
64	+	+	+	+
65	+	+	+	+
71	+	+	+	+
73	+	+	+	+
77	+	+	+	+
87	+	+	+	+

AÑO 2001

No. DE MUESTRA	PRUEBA DE OXIDASA	PRUEBA DE CATALASA	TEST DE UREASA	TINCION DE GRAM BACILOS CURVOS GRAM-NEGATIVOS
75	+	+	+	+
76	+	+	+	+
91	+	+	+	+
93	+	+	+	+
96	+	+	+	+
98	+	+	+	+

Anexo H. Resultados de la comparación de los aislado de *Helicobacter pylori* con el diagnostico histológico

AÑO 1999

Nº. DE MUESTRAS DE PACIENTES	DIAGNOSTICO HISTOLOGICO	RESULTADOS DE LABORATORIO
1	+	+
3	+	+
6	--	+
7	+	+
9	--	+
10	--	+
12	--	+
15	--	+
25	+	+
29		+
31	--	+
33		+
38		+
42	+	+
43	+	+
44	--	+
45		+
47	+	+
50	--	+
51	+	+
53	+	+
54	+	+
55	+	+
59		+
64	+	+
65		+
67	--	+
68	+	+

AÑO 2000

No. DE MUESTRA	DIAGNOSTICO HISTOLOGICO	RESULTADO DEL CULTIVO
1	-	+
2	-	+
3		+
8	+	+
9	+	+
21	+	+
26	+	+
36	+	+
39	+	+
41	+	+
47	+	+
51	+	+
52	+	+
53	+	+
55	-	+
56	-	+
57	-	+
58	-	+
61	-	+
62	+	+
63	+	+
64	+	+
65	+	+
71	+	+
73	+	+
77	+	+
87	+	+

AÑO 2001

No. DE MUESTRAS	DIAGNOSTICO HISTOLOGICO	RESULTADO DEL CULTIVO
75		+
76	-	+
91	-	+
93	+	+
96	-	+
98		+

Anexo I. Resultados de parámetros de fermentación de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* en medio melaza con leche en polvo y MRS comercial (Merck).

MEDIO MELAZA CON LECHE EN POLVO

Parámetro Tiempo (h)	pH	Densidad Óptica Ln	Azúcares Totales g/l	Producción de Proteínas g/l	Biomasa UFC/ml
T0	6.20	-1.857	23.99	35.14	73 x 10 ⁷
T1	5.90	-2.234	22.71	37.27	23 x 10 ⁹
T2	5.72	-1.987	22.14	43.28	53 x 10 ⁹
T3	5.52	-1.883	22.04	42.36	96 x 10 ⁹
T4	5.36	-1.814	21.31	45.31	11 x 10 ¹⁰
T5	5.21	-1.731	21.16	45.80	12 x 10 ¹⁰
T6	5.15	-1.670	20.44	47.05	13 x 10 ¹⁰
T7	5.13	-1.620	20.18	47.05	18 x 10 ¹⁰
T8	5.11	-1.560	19.45	47.05	38 x 10 ¹⁰
T9	5.11	-1.469	18.88	47.58	63 x 10 ¹⁰
T10	5.10	-1.300	18.16	49.98	93 x 10 ¹⁰
T11	5.09	-1.377	17.85	46.50	56 x 10 ¹⁰
T12	5.08	-1.380	16.71	44.99	35 x 10 ¹⁰
T13	4.85	-1.250	12.21	41.92	30 x 10 ¹⁰

MEDIO MRS COMERCIAL (MERCK)

Parámetro Tiempo (h)	pH	Densidad óptica Ln	Azúcares totales g/l	Producción de proteínas g/l	Biomasa UFC/ml
T0	5.19	-0.759	3.28	38.75	12 X 10 ⁸
T1	5.14	-0.918	3.28	38.15	11X 10 ⁸
T2	5.08	-0.746	2.52	47.82	77 X 10 ⁷
T3	4.88	-0.709	2.52	42.36	49 X 10 ⁷
T4	4.69	-0.667	2.52	45.31	10 X 10 ⁸
T5	4.50	-0.621	2.52	39.95	11 X 10 ⁹
T6	4.38	-0.586	2.76	38.97	12 X 10 ⁹
T7	4.35	-0.601	1.54	37.16	67 X 10 ⁸
T8	4.22	-0.646	1.54	37.55	81 X 10 ⁸
T9	4.10	-0.655	1.46	43.50	21 X 10 ⁹
T10	4.04	-0.636	1.46	43.61	7 X 10 ¹⁰
T11	3.96	-0.787	0.89	41.97	3 X 10 ¹⁰
T12	3.95	-0.757	0.57	44.92	34 X 10 ¹⁰
T13	3.81	-0.462	0.57	45.03	4 X 10 ⁹

Anexo J. Diámetros de halos de inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por diluciones de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* (técnica de micropocillos).

DILUCIONES	Sustrato Puro	Dilución 10⁻¹	Dilución 10⁻²	Dilución 10⁻³
REPLICAS	86 X 10⁸ bact/ml	18 x 10⁷ bact/ml	98 x 10⁵ bact/ml	48 x 10⁵ bact/ml
1	17 mm	12 mm	17 mm	16 mm
2	16	16	16	14
3	19	16	23	16
4	25	13	18	18
5	24	15	16	16
6	23	15	25	16
7	12	14	28	18
8	20	15	15	17
9	12	15	22	15
10	12	13	15	13
11	12	11	25	17
12	12	16	17	14
13	12	12	21	17
14	12	13	14	18
15	11	14	17	18
16	12	17	20	13

Anexo K. Análisis de Varianza y Prueba de Tukey

Tabla de ANOVA por DIAMETRO según dilución.

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	D f	Cuadrado medio	F- Proporción	P- Valor
Entre grupos	224.047	3	74.6823	6.13	0.0010
Dentro de Grupos	731.312	60	12.1885		

Total (Corr.) 955.359 63

La tabla de ANOVA descompone la variación del DIAMETRO en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de grupos. La F-proporción que en este caso es igual a 6.12725, es una proporción de la estimación entre grupos a la estimación dentro de grupos. Desde que el P-valor de la F-prueba está menos de 0.05, hay una diferencia estadísticamente significativa entre el DIAMETRO de un nivel de dilución a otro, a un nivel, de confianza del 95.0%. Para determinar qué los medios son significativamente diferentes que otros.

Pruebas del Rango múltiples para DIAMETRO por Dilución

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD

Dilución	Replicas	Promedios	Grupos Homogeneos
Sustrato puro (D1)	16	15.6875	X
Dilución 10-1 (D2)	16	14.1875	X
Dilución 10-2 (D3)	16	19.3125	X
Dilución 10-3 (D4)	16	16	X

Contrastes	Diferencias	+/- Limites
D1 - D2	1.5	3.26184
D1 - D3	*-3.625	3.26184
D1 - D4	-0.3125	3.26184.
D2 - D3	*-5.125	3.26184
D2 - D4	-1.8125	3.26184
D3 - D4	*3.3125	3.26184

* Denota una diferencia estadísticamente significativa.