

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



EVALUACION IN VITRO DE UN SUPLEMENTO ALIMENTICIO COMERCIAL
QUE CONTIENE *Bacillus coagulans* COMO PROBIOTICO PARA EL
TRATAMIENTO PREVENTIVO DE LISTERIOSIS.

TRABAJO DE GRADUACION PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADO(A) EN QUIMICA Y FARMACIA

PRESENTADO POR:

SAMUEL ENRIQUE CASTILLO GRANDE
LUCIA ESMERALDA SEGURA FIGUEROA

DICIEMBRE 2015

SAN SALVADOR, EL SALVADOR

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR INTERINO

LIC. JOSE LUIS ARGUETA ANTILLON

SECRETARIA GENERAL INTERINA

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIO

MAE. ROBERTO EDUARDO GARCIA ERAZO

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

MSc. Ena Edith Herrera Salazar

TRIBUNAL CALIFICADOR

COORDINADORA DE AREA DE:

**CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS FARMACEUTICOS Y
COSMETICOS**

Licda. Zenia Ivonne Arévalo de Márquez

COORDINADORA DE AREA DE:

GESTION AMBIENTAL; CALIDAD AMBIENTAL

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

DOCENTE ASESORA

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todopoderoso y Eterno, quien me ha llevado de su mano durante todo el trayecto de mi carrera, brindándome su amor, su Espíritu, su gracia y sus dones.

A mis padres, Luis Castillo y Mirna Grande de Castillo, por instruirme siempre con amor y sabiduría, guiándome para dar siempre lo mejor de mí y ser cada día una mejor persona. A mi primo y hermano Kevin Castillo por su apoyo durante este proceso. A mi abuela Mamá Paquita, por su amor incondicional y sus cuidados, a mi abuela Mamá Lolita quien desde pequeño supo hacer llover sobre mi todo su amor y atenciones y a mi abuelo Papá Flavio quien me motivó a trabajar mi mente constantemente. A Fátima De León, por impulsarme a ser cada día mejor y brindarme los consejos necesarios para recorrer de la mejor manera este camino. A mis hermanos de comunidad quienes me apoyan constantemente.

A mi docente director, Msc. Coralia Gonzales de Díaz, por sus consejos, apoyo y dedicación en este trabajo y a Msc. Cecilia Gallardo, Lic. Ivonne Arévalo y Lic. Odette Rauda por su apoyo, por sus aportes en este trabajo y por compartirnos de su experiencia en los temas de investigación.

A la Msc. Amy Morán, por su gran apoyo y disponibilidad en este trabajo, aportando sus ideas y experiencia. A la Doctora Tania Cuadra por tomarse el tiempo de brindarnos ideas para la orientación de este trabajo y por su disponibilidad y amabilidad.

A mi compañera de Horas sociales y tesis, mi amiga Lucía Segura, por compartir este trayecto conmigo y por dar juntos este paso hacia una nueva etapa de nuestras vidas.

Samuel Enrique Castillo Grande

DEDICATORIA

La dedicatoria de este trabajo es primeramente para mi Padre Dios, quien me ha brindado siempre su amor y su Santo Espíritu, dándome sabiduría y fortaleza a lo largo de los años.

A mis padres Luis Castillo y Mirna Grande de Castillo, por apoyarme en todas mis decisiones, aconsejarme con gran sabiduría y orientarme en el camino correcto desde niño y aún ahora en la adultez, a manera de ser siempre un verdadero hombre y un verdadero cristiano.

A mis abuelas Mamá Lolita y Mamá Paquita, quienes cuidaron de mi desde pequeño y me han brindado siempre su amor incondicional.

A mi primo y hermano Kevin Castillo por acompañarme en este trayecto y compartir mis experiencias.

A mi novia, mejor amiga, confidente, admiración, orgullo y apoyo, Fátima De León, quien durante estos tres años, ha sido participe de mis logros, alegrías y ha sido soporte en los momentos difíciles.

A mis hermanos de comunidad, con quienes comparto el crecimiento en la fe y han sido un gran apoyo.

A mis grandes amigos, Wilfredo Granados, Liz Ramírez, Lucía Segura, Irma Azahar y Diana Martínez, con quienes hemos compartido todo el trayecto que implica esta carrera y todos los buenos momentos que hemos pasado.

Samuel Enrique Castillo Grande

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la fortaleza necesaria para culminar este trabajo con éxito, por demostrarme que todo camino no es fácil, pero al depositar mi confianza en Él, ha hecho que todo camino sea posible, sobre todo, por darme sabiduría para tomar las mejores decisiones durante toda mi carrera.

A mi madre, Lucía del Carmen, por su apoyo incondicional en mi educación profesional, porque este logro, no habría sido posible sin ella. Por ser una excelente mujer, modelo a seguir con su ejemplo y madre ejemplar. Por haberme regalado la mejor educación que he podido tener e inculcarme los valores morales y espirituales; que han hecho de mí una mejor persona.

A mi hermana, María Vanessa, por estar siempre a mi lado, brindándome de sabios consejos y dándome palabras de aliento, en todo momento que lo he necesitado.

A mi Docente Director MSc. Coralía González de Díaz, por la dedicación y tiempo invertido en el desarrollo de la tesis. A la Licda. Odette Rauda, Licda. Ivonne de Márquez y MSc. Cecilia Gallardo por su invaluable contribución en el desarrollo de este trabajo. A la MSc. Amy Morán, por su dedicación, confianza y disponibilidad de tiempo de compartir sus conocimientos tanto en el Servicio Social, como la aportación de ideas en la tesis. A la Dra. Tania Cuadra, por su disponibilidad de tiempo y gentileza en el aporte de ideas para llevar cabo la parte experimental de la tesis.

A mi amigo Samuel Castillo, compañero de Servicio Social y tesis, por brindarme de sabios consejos y por haber compartido esta experiencia.

Lucía Esmeralda Segura Figueroa

DEDICATORIA

Dedico este trabajo, especialmente a Dios Padre Todopoderoso, por bendecirme enormemente y darme las cosas en su tiempo.

A mi madre, Lucía del Carmen, por estar siempre a mi lado, apoyándome en las decisiones que he tomado, y dándome los mejores consejos cuando más los he necesitado.

A mi hermana y amiga, María Vanessa, por ser mi confidente y compartir momentos de calidad juntas.

A mi tío Francisco, por su cariño y admiración al verme estudiar esta carrera.

A mis abuelos, mamá Chica y papá Luis, en honor a su memoria, porque me cuidaron de pequeña, y porque siempre soñaron que estudiara esta carrera.

A mi tía Yolanda, que en paz descanse, por haberme demostrado el verdadero lazo de hermandad.

A mi mejor amigo Gerardo Amaya, por ser esa bendición en mi vida, quien me ha demostrado lo que significa una amistad sincera, por su inmenso cariño, paciencia, admiración y dedicación al escucharme.

A mi amiga de toda la vida, Liz Mariel Ramírez, por todas las alegrías y tristezas que hemos vivido y compartido juntas. A mis amigos de la universidad, Irma Azahar, Diana Martínez, Wilfredo Granados y Samuel Castillo, por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos.

Lucía Esmeralda Segura Figueroa

INDICE

RESUMEN

CAPITULO I

1.0 INTRODUCCION

xxvi

CAPITULO II

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

CAPITULO III

3.0 MARCO TEORICO

31

3.1 Probióticos

31

3.1.1 Definición de probióticos

31

3.1.2 Características de los probióticos

33

3.1.3 Mecanismo de acción de los probióticos

34

3.1.3.1 Mejora de la función de la barrera intestinal

35

3.1.3.2 Producción de nutrientes para la función de la barrera intestinal

35

3.1.3.3 Efectos inmunomodulatorios

36

3.1.3.4 Competición con bacterias patógenas

36

3.1.4 Probióticos no pertenecientes al tracto gastrointestinal:

Formadores de esporas como probióticos.

37

3.1.4.1 El género *Bacillus*

38

3.1.4.2 *Bacillus coagulans*

41

3.2 *Listeria monocytogenes*

43

3.2.1 Generalidades de *Listeria monocytogenes*

43

3.2.2 Caracterización de *Listeria monocytogenes*

43

3.2.3	Patogénesis	44
3.2.4	Ciclo infeccioso de <i>Listeria monocytogenes</i>	46
3.2.4.1	Entrada a las células del hospedero	48
3.2.4.2	Escape del fagosoma y desarrollo intracelular	49
3.2.4.3	Desplazamiento intracitoplasmático	50
3.2.4.4	Diseminación de célula a célula	50
3.2.5	Listeriosis	50
3.2.6	Cuadro clínico de listeriosis	51
3.2.7	Listeriosis durante el embarazo	51
3.2.8	Diagnóstico y tratamiento	52
3.2.9	Epidemiología	55
3.3	Efecto del <i>Bacillus coagulans</i> contra <i>Listeria monocytogenes</i>	57
3.4	Fundamento de pruebas para la identificación de <i>Listeria monocytogenes</i>	58
3.4.1	Pruebas presuntivas	58
3.4.1.1	Tinción de Gram	59
3.4.1.2	Sistema Óptico de Henry	60
3.4.1.3	Catalasa	61
3.4.1.4	Prueba de hemólisis	61
3.4.2	Pruebas semiconfirmatorias	60
3.4.2.1	MIO (Movilidad-Indol-Ornitina)	61
3.4.2.2	Prueba CAMP	62
3.4.3	Prueba confirmatoria	61
3.4.3.1	Pruebas API	62
3.5	Fundamento de pruebas para la identificación de <i>Bacillus coagulans</i>	62
3.5.1	Prueba de Oxidasa	62
3.5.2	Prueba de Reducción de Nitratos	63
3.6	Medios selectivos utilizados	65

CAPITULO IV

4.0 DISEÑO METODOLOGICO	71
4.1 TIPO DE ESTUDIO	71
4.2 INVESTIGACION BIBLIOGRAFICA	72
4.3 PARTE EXPERIMENTAL	72
4.3.1 Aislamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> .	73
4.3.2 Mantenimiento de la cepa de trabajo de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19114.	73
4.3.3 Pruebas de identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19114.	74
4.3.3.1 Frotis bacteriano y tinción de Gram	75
4.3.3.2 Sistema Óptico de Henry	75
4.3.3.3 Inoculación en medio selectivo PALCAM	76
4.3.3.4 Catalasa	76
4.3.3.5 Prueba de hemólisis	76
4.3.3.6 MIO (Movilidad-Indol-Ornitina)	77
4.3.3.7 Prueba CAMP	77
4.3.3.8 Pruebas API	77
4.3.4 Comprobación de la concentración de <i>B. coagulans</i> en el suplemento alimenticio.	80
4.3.5 Aislamiento del probiótico <i>Bacillus coagulans</i> del suplemento alimenticio comercial.	81
4.3.6 Pruebas de Identificación del probiótico <i>Bacillus coagulans</i> .	82
4.3.6.1 Tinción Gram	83
4.3.6.2 Prueba de Catalasa	83
4.3.6.3 Prueba de Oxidasa	83
4.3.6.4 Prueba de Reducción de Nitratos	84

4.3.7	Prueba de Antagonismo Microbiano	84
4.3.7.1	Estandarización de microorganismos por espectrofotometría UV-VIS.	85
4.3.7.2	Ensayo preliminar para determinar la concentración real de <i>Bacillus coagulans</i> en un disco impregnado con suspensión estandarizada de probiótico	86
4.3.7.3	Ensayo de antagonismo microbiano usando la técnica de Difusión en Agar por medio de Discos y Pozos.	86
4.3.7.4	Interpretación de resultados	88
4.3.8	Evaluación del <i>Bacillus coagulans</i> frente a la resistencia contra el pH ácido del estómago y a sales biliares.	88
4.3.8.1	Resistencia a acidez.	89
4.3.8.2	Resistencia a sales biliares	90
4.3.8.3	Determinación del porcentaje de células viables	90
CAPITULO V		91
5.0	RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS	92
5.1	Mantenimiento de la cepa de trabajo de <i>Listeria monocytogenes</i> .	92
5.2	Pruebas de identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> .	92
5.3	Comprobación de la concentración de <i>B. coagulans</i> en el suplemento alimenticio.	98
5.4	Aislamiento del probiótico <i>Bacillus coagulans</i> del suplemento alimenticio comercial.	99
5.5	Pruebas de Identificación del probiótico <i>Bacillus coagulans</i> .	99
5.5.1	Tinción Gram	100
5.5.2	Prueba de Catalasa	100
5.5.3	Prueba de Oxidasa	101
5.5.4	Prueba de Reducción de Nitratos	102

5.6	Prueba de Antagonismo Microbiano	102
5.6.1	Estandarización de microorganismos por espectrofotometría UV- Vis.	103
5.6.2	Ensayo preliminar para determinar la concentración real de <i>Bacillus coagulans</i> en un disco impregnado con suspensión estandarizada de probiótico.	104
5.6.3	Ensayo de antagonismo microbiano usando la técnica de Difusión en Agar por medio de Discos y Pozos.	105
5.7	Evaluación del <i>Bacillus coagulans</i> frente a la resistencia contra el pH ácido del estómago y a sales biliares.	109
CAPITULO VI		
6.0	CONCLUSIONES	115
CAPITULO VII		
7.0	RECOMENDACIONES	118
BIBLIOGRAFIA		
GLOSARIO		
ANEXOS		

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

1. Solicitud de datos epidemiológicos de listeriosis al Hospital Nacional de la Mujer.
2. Datos epidemiológicos de listeriosis provistos por el Hospital Nacional de la Mujer.
3. Solicitud de datos epidemiológicos de listeriosis al Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom.
4. Preparación de medios de cultivo.
5. Procedimientos para la identificación de la cepa patógena *Listeria monocytogenes*.
6. Resultados de las pruebas de identificación de *Listeria monocytogenes*.
7. Procedimiento para comprobación de la concentración de *Bacillus coagulans* en el suplemento alimenticio.
8. Procedimiento para aislar el probiótico *Bacillus coagulans* del suplemento alimenticio comercial.
9. Pruebas de identificación del probiótico *Bacillus coagulans*.
10. Resultados de las pruebas de identificación para *Bacillus coagulans*.
11. Procedimiento para estandarización por espectrofotometría UV-Vis.
12. Procedimiento para determinar la concentración real de *Bacillus coagulans* en un disco impregnado con suspensión estandarizada de probiótico.
13. Ensayo de antagonismo microbiano usando la técnica de difusión en agar por medio de discos y pozos.
14. Tamaño de zonas de inhibición y su interpretación para quimioterapéuticos de uso frecuente.

15. Imágenes del ensayo de antagonismo microbiano usando la técnica de difusión en agar por medio de discos y pozos.
16. Blancos de microorganismos utilizados en los ensayos de antagonismo microbiano.
17. Resultados del ensayo de antagonismo microbiano por la técnica de difusión en pozos.
18. Resultados del ensayo de antagonismo microbiano por la técnica de difusión por discos y patrones de antibióticos.
19. Cálculos para la comprobación porcentual de las zonas de inhibición obtenidas en el ensayo de antagonismo microbiano.
20. Proceso de estandarización de McFarland.
21. Evaluación del *Bacillus coagulans* frente a la resistencia ante el pH ácido del estómago y a sales biliares.
22. Imágenes de la evaluación del *Bacillus coagulans* frente a la resistencia ante el pH ácido del estómago y a sales biliares.
23. Cálculos del porcentaje de supervivencia del *Bacillus coagulans* frente a la resistencia ante el pH ácido del estómago y a sales biliares.

INDICE DE CUADROS

Cuadro N°		N° Pág.
1.	Microorganismos utilizados como probióticos en humanos y animales.	32
2.	Efectos inmunomodulatorios de algunos probióticos.	36
3.	Principales diferencias entre <i>Bacillus coagulans</i> y bacterias de los géneros <i>Bacillus</i> y <i>Lactobacillus</i>	41
4.	Número de muestras a procesar.	80
5.	Resultado de la prueba API® Listeria.	97

INDICE DE FIGURAS

Figura N°		N° Pág.
1.	Mecanismos de acción generales de los probióticos.	37
2.	Proceso de formación de espora en una bacteria del género <i>Bacillus</i> .	39
3.	Ciclo de infección de <i>Listeria monocytogenes</i> .	47
4.	Mecanismo de acción de coagulina en la membrana celular de <i>Listeria monocytogenes</i> .	59
5.	Cepa de trabajo de <i>Listeria monocytogenes</i> .	93
6.	Resultados del frotis bacteriano y tinción Gram de <i>Listeria monocytogenes</i> .	94
7.	Resultados del Sistema Óptico de Henry.	94
8.	Resultados de la inoculación en medio selectivo PALCAM.	95
9.	Resultados de la prueba catalasa de <i>Listeria monocytogenes</i> .	95
10.	Resultados de la prueba de hemólisis.	96
11.	Resultados de la prueba movilidad.	97
12.	Resultados de la prueba de CAMP	97
13.	Muestras procesadas del suplemento alimenticio comercial.	98
14.	Cepa de trabajo, <i>Bacillus coagulans</i> .	99
15.	Resultados del frotis bacteriano y tinción Gram de <i>B. coagulans</i> .	100
16.	Resultados de la prueba catalasa de <i>Bacillus coagulans</i> .	100
17.	Resultados de la prueba de oxidasa.	101
18.	Resultados de la prueba de Reducción de Nitratos	102

19.	Absorbancias del blanco, <i>Bacillus coagulans</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> , respectivamente.	103
20.	Discos impregnados con la suspensión estandarizada de <i>Bacillus coagulans</i> .	104
21.	Evaluación del <i>Bacillus coagulans</i> frente a la resistencia ante el pH ácido del estómago y a sales biliares, a t=2h.	112

INDICE DE TABLAS

Tabla N°		N° Pág.
1.	Promedio de resultados de la concentración de <i>B. coagulans</i> en el suplemento alimenticio según recuento.	98
2.	Valores obtenidos en UFC/mL para los estándares de <i>B. coagulans</i> y <i>L. monocytogenes</i> .	102
3.	Resultados de recuentos microbianos para determinar la concentración de <i>B. coagulans</i> en un disco impregnado con suspensión estandarizada de probiótico.	103
4.	Resultados de prueba de antagonismo para discos impregnados con <i>Bacillus coagulans</i> de concentración 2.0×10^8 UFC/mL en agar Mueller Hinton	105
5.	Resultados de prueba de antagonismo para discos impregnados con <i>Bacillus coagulans</i> de concentración 2.0×10^8 UFC/mL en agar MRS	106
6.	Resultados de prueba de antagonismo por difusión en pozos a concentración 2.0×10^8 UFC/mL de <i>Bacillus coagulans</i> en agar MRS.	107
7.	Resultados de prueba de antagonismo por difusión en pozos a concentración 2.0×10^7 UFC/mL de <i>Bacillus coagulans</i> en agar MRS.	108
8.	Conteo de UFC/mL de probióticos del blanco, sistema A (pH ácido) y Sistema B (sales biliares).	110
9.	Resultados del porcentaje de supervivencia del <i>Bacillus coagulans</i> frente a la resistencia ante el pH ácido del estómago y a sales biliares.	112

ABREVIATURAS

°C=	Grados Celsius
Act A =	Actina A
AGCC =	Ácido graso de cadena corta
AMP =	Ampicilina
API =	Analytic Profile Index
ATCC =	American Type Culture Collection
BaCl₂.2H₂O=	Cloruro de Bario dihidratado.
BAL =	Bacterias Ácido Lácticas
BHI =	Brain Heart Infusion
CAMP =	Prueba bioquímica de Christie, Atkinson, Munch y Peterson
CDC =	Control Disease Center
CENSALUD=	Centro de Investigación y Desarrollo en Salud
CIM =	Concentración Inhibitoria Mínima
CLSI =	Clinical and Laboratory Standards Institute
CO₂ =	Dióxido de Carbono
Cu²⁺ =	Ión Cúprico
DARL =	D-Arabiol
DIM =	Differentiation/Inocua/Monocytogenes
DMFD =	N,N-Dimetil-p-fenilendiamina
E.U.A. =	Estados Unidos de América
EC 1 =	Ectodominio 1
EC 5 =	Ectodominio 5
ESC =	Esculina, Citrato férrico
ETA =	Enfermedades Transmitidas por Alimentos
FDA =	Food and Drug Administration
Fe²⁺ =	Ión Ferroso
Fe³⁺ =	Ión Férrico

g/L =	gramos por Litro
G1P =	Glucosa-1-Fosfato
GAD =	Glutamato Descarboxilasa
GALT =	Gut Associated Lymphoid Tissue
GRAS =	Generally Recognized As Safe
H₂O =	Agua
H₂O₂ =	Peróxido de Hidrógeno
HPLC =	High Performance Liquid Chromatography
I₂ =	Yodo molecular
IgA =	Inmunoglobulina A
IgG =	Inmunoglobulina G
IL-2 =	Interleucina 2
IL-6 =	Interleucina 6
Inl A =	Internalina A
Inl B =	Internalina B
kD =	Kilodalton
KI =	Yoduro de Potasio
KNO₃ =	Nitrato de Potasio
LCR =	Líquido cefaloraquideo
LLO =	Listeriolisina O
MDG =	Metil- α D-glucopiranosido
Met =	Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos
mg =	Miligramos
MIO =	prueba bioquímica de Movilidad-Indol-Ornitina
mL =	Mililitro
MRS =	Medio de Cultivo de Man Rogosa Sharpe
N₂ =	Nitrógeno molecular
N₂O =	Óxido Nitroso
NaCl =	Cloruro de Sodio

NADH =	Nicotinamida Adenina Dinucleótido en forma reducida.
NIT 1 =	Reactivo de α -naftilamina
NIT 2 =	Reactivo de ácido sulfanílico
nm. =	Nanómetros
NO²⁻ =	Ión Nitrito
NO³⁻ =	Ión Nitrato
O₂ =	Oxígeno Molecular
OMS=	Organización Mundial de la Salud
P/V =	Peso sobre volumen
PG =	Penicilina –G
PI =	Fosfatidilinositol
PLC =	Fosfolipasa C
Redox =	Reacción de Oxido-Reducción
RHA =	L-Rhamnosa
RIB =	D- Ribosa
SI =	Siulterio
SIDA =	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SIM =	Sulfide Indol Motility
sp. =	Especie
spp. =	Especies
TAG =	D-Tagatosa
TMFD =	N,n,n,n-tetrametil-p-fenilendiamina
TNFα =	Tumor Necrosis Factor α
TSA =	Agar Tripticasa Soya
TSAye =	Agar Tripticasa Soya + Extracto de levadura
TZX =	Trimetoprim – Sulfametoxazol
UFC =	Unidades Formadoras de Colonia
UFC/g =	Unidades Formadoras de Colonia por gramo
UFC/mL=	Unidades Formadoras de Colonia por mililitro

USP =	Farmacopea de los Estados Unidos
V/V =	Volumen sobre volumen
VIH =	Virus de Inmunodeficiencia Humana
WHO =	World Health Organization
XYL =	D-Xylosa
Zn =	Cinc metálico
ZYM A =	Reactivo de fosfatasa alcalina A
ZYM B =	Reactivo de fosfatasa alcalina B
αMAN =	4-nitrofenil-α-D-manopiranosida
μL =	Microlitros

RESUMEN

La listeriosis es una infección causada por *Listeria monocytogenes* que afecta principalmente a la población inmunocomprometida, debido a que el patógeno se encuentra en todas partes y contamina los alimentos de consumo; éste es un problema relativamente desapercibido, por la baja tasa de morbilidad que presenta. ⁽⁵¹⁾ Numerosas investigaciones internacionales han demostrado que los suplementos alimenticios comerciales que contienen *Bacillus coagulans* como probióticos, presentan actividad inhibitoria contra *Listeria monocytogenes*. ⁽³²⁾⁽⁶⁷⁾

El objetivo de ésta investigación fue realizar una evaluación in vitro de un suplemento alimenticio comercial que contiene *Bacillus coagulans* como probiótico para el tratamiento preventivo de listeriosis.

El suplemento alimenticio seleccionado son dulces masticables empacados individualmente, comercializados en una bolsa de aluminio de 30 unidades; del cual se realizó un muestreo que representa un 30% del producto.

El suplemento rotula que contiene 5.0×10^{12} UFC de *B.coagulans*/masticable; y se le realizó un recuento bacteriano para determinar la concentración real del probiótico. Se aisló e identificó el microorganismo probiótico así como la *Listeria monocytogenes* para el desarrollo de este estudio.

Posteriormente, se realizó el ensayo de antagonismo microbiano utilizando suspensiones de concentración estandarizada de probiótico y patógeno. Como patrón de comparación se utilizaron discos antibióticos Penicilina-G, Ampicilina y Trimetoprim-Sulfametoxazol.

Adicionalmente se realizó un estudio de resistencia a las barreras biológicas de acidez gástrica y sales biliares.

El resultado obtenido del recuento para determinar la concentración de probiótico en el suplemento fue de 2.0×10^{12} UFC/masticable. Los microorganismos sujetos a las pruebas de identificación, resultaron ser *Listeria monocytogenes* y *Bacillus coagulans*.

Listeria monocytogenes demostró ser resistente o tener sensibilidad intermedia ante la acción de *Bacillus coagulans* y al comparar la acción inhibitoria del probiótico con los patrones (Penicilina G, Ampicilina y Trimetroprim-Sulfametoxazol), se obtuvo un mínimo de 39.29% y un máximo de 64.0% del poder inhibitorio de los antibióticos.

La resistencia de *Bacillus coagulans* a la acidez gástrica y a las sales biliares fue del 83.72% y 78.80%, respectivamente.

Se recomienda el consumo regular del suplemento alimenticio para garantizar el efecto benéfico de *Bacillus coagulans* como tratamiento profiláctico para listeriosis.

La parte experimental de esta investigación se realizó en el Laboratorio de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador durante el período de Julio a Septiembre del año 2015.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

De acuerdo con investigaciones internacionales, el microorganismo *Bacillus coagulans*, posee actividad inhibitoria contra *Listeria monocytogenes*, por lo que puede utilizarse como un tratamiento profiláctico contra listeriosis, ya que ha demostrado ser seguro para su ingesta como probiótico.

La listeriosis, es un problema relativamente desapercibido, por su baja tasa de morbilidad; sin embargo, la población inmunocomprometida es muy susceptible debido a que *Listeria monocytogenes* se encuentra en todas partes, por lo que puede contaminar alimentos de consumo.

Por lo tanto, en la presente investigación se realizó el análisis de un suplemento alimenticio, constituido por dulces masticables presentados en forma de prismas rectangulares, color violeta, empaçados individualmente y contenidos en una bolsa de aluminio plastificado con cierre hermético. La etiqueta del suplemento rotula que contiene *Bacillus coagulans* como microorganismo probiótico a una concentración de 5 billones de UFC por masticable.

La presente investigación consistió en determinar si el suplemento alimenticio contiene el microorganismo probiótico *Bacillus coagulans*, comprobándose la concentración del probiótico por unidad masticable, mediante la técnica de conteo en placa; posteriormente, se aisló el probiótico, para su identificación. Luego, se determinó la actividad inhibitoria de *B. coagulans* vs *L. monocytogenes*, previamente aislada e identificada, mediante un ensayo de antagonismo microbiano según la Técnica de Difusión en Agar, tomando como patrón de referencia, discos comerciales de papel filtro, que contienen los antibióticos utilizados en el tratamiento de listeriosis, los cuáles son: Penicilina G, Ampicilina y Trimetroprim-Sulfametoxazol.

Todo probiótico debe ser capaz de resistir a las barreras biológicas, por lo cual, se cuantificó la resistencia del *B. coagulans* al someterlo a las pruebas de supervivencia contra los ácidos estomacales y las sales biliares; para posteriormente proponerlo como tratamiento preventivo para listeriosis.

El resultado obtenido del recuento para determinar la concentración de probiótico en el suplemento fue de 2.0×10^{12} UFC/masticable. Los microorganismos sujetos a las pruebas de identificación, resultaron ser *Listeria monocytogenes* y *Bacillus coagulans*.

Listeria monocytogenes demostró ser resistente o tener sensibilidad intermedia ante la acción de *Bacillus coagulans* y al comparar la acción inhibitoria del probiótico con los patrones, se obtuvo un mínimo de 39.29% y un máximo de 64.0% del poder inhibitorio de los antibióticos.

La resistencia de *Bacillus coagulans* a la acidez gástrica y a las sales biliares fue del 83.72% y 78.80%, respectivamente.

Se recomienda el consumo regular del suplemento alimenticio para garantizar el efecto benéfico de *Bacillus coagulans* como tratamiento profiláctico para listeriosis.

La parte experimental se realizó en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos en el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) en el periodo de Julio a Septiembre de 2015.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar in vitro un suplemento alimenticio comercial que contiene *Bacillus coagulans* como probiótico para el tratamiento preventivo de listeriosis.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1 Comprobar la concentración del probiótico en el suplemento alimenticio comercial, utilizando la técnica de conteo en placa.

2.2.2 Aislar el probiótico *Bacillus coagulans* del suplemento alimenticio comercial.

2.2.3 Identificar el probiótico *Bacillus coagulans* en el suplemento alimenticio comercial, por medio de morfología macroscópica y microscópica, tinción al Gram, y las pruebas metabólicas de catalasa, oxidasa y reducción de nitratos.

2.2.4 Determinar la capacidad que tiene el microorganismo *Bacillus coagulans* para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, utilizando la prueba de antagonismo microbiano.

2.2.5 Cuantificar la resistencia a las barreras biológicas (acidez gástrica y sales biliares) del probiótico *Bacillus coagulans* aislado del suplemento alimenticio.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 Probióticos

3.1.1 Definición de probióticos

El término probióticos tiene un origen etimológico del griego “pro bios” (por la vida), y tiene un origen de más de cien años cuando Dörderlein en 1892 y subsecuentemente Metchnikoff en 1907, propusieron que las bacterias formadoras de ácido láctico a partir de azúcares, deberían tener algunos efectos beneficiosos para el organismo. Esta definición ha sido revisada y cambiada muchas veces a lo largo del tiempo. ⁽¹⁴⁾

El término probiótico, como tal, fue empleado por primera vez por Vergio en 1954, cuando comparaba los efectos adversos que los antibióticos ejercían sobre la microbiota intestinal, con las acciones beneficiosas ejercidas por otros factores que no pudo determinar. Una década más tarde, Lilly y Stillwell (1965) se referían a los probióticos como microorganismos que promovían el crecimiento de otros microorganismos. Fuller (1989) redefinió a los probióticos como “aquellos suplementos alimenticios integrados por microorganismos vivos que afectan beneficiosamente al hospedador que los consume mediante la mejora de su equilibrio microbiano intestinal”. ⁽³⁾

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS o WHO), la definición de *probiótico* es: «Microorganismos vivos que, cuando son suministrados en cantidades adecuadas, promueven beneficios en la salud del organismo huésped». ⁽⁵⁾

En concordancia con las definiciones anteriores se ha propuesto una gama de microorganismos que poseen actividad probiótica como se evidencia en el Cuadro N° 1.

Cuadro N° 1: Microorganismos utilizados como probióticos en humanos y animales. ⁽¹⁴⁾

Lactobacillus spp.	Bifidobacterium spp.	Lactic acid bacteria	Non lactic acid bacteria
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. crispus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Bacillus coagulans</i> ⁽²²⁾	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

Sin embargo, entre los microorganismos a los que se les atribuyen características probióticas, y que ocupan el lugar más destacado, se encuentran las bacterias lácticas (productoras de ácido láctico como producto final de su metabolismo) y las bifidobacterias, entre estos dos grupos podemos mencionar:

Bifidobacterium longum, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus reuteri*, *Propionibacterium freudenrichi*, *Streptococcus faecium* y *Lactobacillus plantarum*.

El género *Bifidobacterium* no está relacionado filogenéticamente con las bacterias lácticas, pero comparte con ellas diversas propiedades fisiológicas, bioquímicas y ecológicas. ⁽¹⁾

3.1.2 Características de los probióticos

Para que un microorganismo pueda considerarse como probiótico debe cumplir con una serie de características:

- Ser de origen humano, ya que, en teoría, las cepas aisladas de seres humanos sanos, presentan una mayor facilidad para colonizar el intestino humano, y probablemente, no sean patógenas. Para referirse a esta característica, es muy utilizado el acrónimo en inglés “Generally Recognized As Safe” (GRAS). No obstante, se han utilizado probióticos de origen no humano, como *Saccharomyces cerevisiae*, demostrándose su seguridad tras el consumo regular por el hombre.
- Deben poseer tolerancia a las condiciones ambientales del tracto gastrointestinal, ya que, si los microorganismos probióticos han de llegar viales al intestino, es preciso que resista el pH gástrico, las enzimas digestivas y la acción detergente e inhibidora de las sales biliares. ⁽³⁾
- Han de ser capaces de colonizar el intestino y producir efectos benéficos a éste, con un tiempo corto de replicación, y deben ser capaces de adherirse a la mucosa intestinal para que tenga lugar la modulación de la respuesta inmune, así como, la exclusión de microorganismos patógenos, aunque esto último puede deberse también a su capacidad de producir compuestos antimicrobianos. ⁽³⁾
- Mantener la viabilidad y actividad en el alimento conductor o vector del microorganismo. ⁽³¹⁾

- Ser estable en el almacenamiento y tener la capacidad de ser cultivado a escala industrial. ⁽²³⁾
- Deben poseer una concentración de células viables $>10^5$ UFC/g en el intestino delgado y $>10^8$ UFC/g en el intestino grueso, ya que estas son las concentraciones necesarias para obtener un efecto clínico; sin embargo, una ingesta de 10^5 UFC/g ha sido sugerida como la mínima para proveer efectos terapéuticos. ⁽⁵⁴⁾
- Al alcanzar el intestino, deben ser capaces de permanecer allí durante un corto período de tiempo en estado no proliferativo. ⁽⁵⁾
- Debe poseer capacidad de adhesión a las células epiteliales de la mucosa intestinal o directamente a la capa de mucus, para que puedan establecerse como habitantes permanentes del tubo gastrointestinal. La importancia de este requisito radica en que la adhesión a la mucosa intestinal, es el primer paso en la colonización, y muchos autores lo consideran un prerrequisito para ejercer efectos beneficiosos en el huésped, como la exclusión competitiva de bacterias enteropatógenas o la inmunomodulación. ⁽⁵⁾

3.1.3 Mecanismo de acción de los probióticos

La actividad probiótica, se conoce generalmente, como la sustitución de las bacterias patógenas por bacterias benéficas para el organismo, la forma en que los probióticos realizan esta sustitución está basada en una serie de mecanismos moleculares que se desarrollan en el sitio de unión del tracto gastrointestinal. Los mecanismos que se conocen son los siguientes:

3.1.3.1 Mejora de la función de barrera intestinal

El tracto gastrointestinal, cuenta con diferentes mecanismos que impiden la inserción de compuestos o agentes potencialmente lesivos, dentro de ellos se encuentra la formación de una barrera física por la unión estrecha entre los enterocitos y la formación de moco; otro mecanismo, consiste en la producción de Inmunoglobulinas “A”, que son capaces de bloquear la unión de microorganismos patógenos al epitelio intestinal, y forman también grandes aglomerados de virus y bacterias que son atrapadas en el moco intestinal.

Las bacterias probióticas, se unen al epitelio intestinal y forman una barrera con la que impiden la unión de microorganismos patógenos y compiten con ellos por los sitios de unión, así como por los sustratos disponibles, por lo tanto favorece la eliminación de los patógenos en las excreciones y evitando su replicación. ⁽³⁾

3.1.3.2 Producción de nutrientes para la función intestinal

Los ácidos grasos de cadena corta principalmente el acetato, propionato y butirato, generados principalmente en el intestino grueso, son productos de la fermentación realizada por las bacterias de la flora bacteriana comensal de los carbohidratos ingeridos en la dieta humana, que no son digeridos en el intestino delgado. Estos productos son la principal fuente de energía de los colonocitos ayudando a su crecimiento y diferenciación; además, poseen efectos tróficos sobre el epitelio intestinal, que ayudan a la recuperación de la integridad del epitelio en casos de alteraciones de la función de barrera, como es el caso de la enfermedad inflamatoria intestinal.

Un ejemplo concreto de este tipo de mecanismo, es la producción de transglutaminasas por acción del butirato. Dichas enzimas tienen un papel fundamental en la restauración de la mucosa dañada. ⁽³⁾

3.1.3.3 Efectos inmunomodulatorios

Se ha propuesto que los probióticos tienen un efecto inmunomodulador al actuar sobre el Tejido Linfoide Asociado al Intestino (GALT); y aunque, se desconoce cómo actúan específicamente, se sugiere que estimulan la producción de Inmunoglobulinas “A” y la activación de las células “K”. También, se ha propuesto la capacidad que tienen los probióticos en la actividad fagocítica de los linfocitos intestinales y promover la proliferación de linfocitos tipo “B”.⁽³⁾

Cuadro N° 2: Efectos inmunomodulatorios de algunos probióticos.⁽³⁾

Autor	Probiótico	Efecto
Kitazawa <i>et al.</i> , 2001	<i>Lactobacillus gasseri</i>	↑ Proliferación células B
Sheih <i>et al.</i> , 2001	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> HN001	↑ Capacidad fagocítica
Gill <i>et al.</i> , 2001	<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019	↑ Capacidad fagocítica
Arunachalam <i>et al.</i> , 2000	<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019	↑ Capacidad fagocítica
Yasui <i>et al.</i> , 1999	<i>Bifidobacterium breve</i>	↑ Proliferación células B con aumento IgA
Marin <i>et al.</i> , 1998	<i>Streptococcus thermophilus</i>	↑ IL-6, TNF α
Zalashko <i>et al.</i> , 1997	<i>Lactobacillus acidophilus</i> Ke-10	↑ IL-2
Isolauri <i>et al.</i> , 1995	<i>Lactobacillus casei</i> GG	↑ Células secretoras IgG

3.1.3.4 Competición con bacterias patógenas

Uno de los mecanismos de acción implica la disminución del pH del lumen intestinal por la producción de ácidos orgánicos de cadena corta, como el lactato, butirato, acetato y propionato, que son resultado del metabolismo bacteriano que se origina de la fermentación de los azúcares consumidos en la dieta humana y que no son digeridos en el intestino delgado, azúcares mejor conocidos como fibra dietética.⁽³⁾

Sin embargo, el mecanismo principal con el cual disminuyen la colonización de las bacterias patógenas es por la producción de bacteriocinas, que son sustancias producidas durante la fase estacionaria del crecimiento microbiano y que son responsables de inhibir el crecimiento de otras bacterias que compiten por el sitio de unión al intestino.

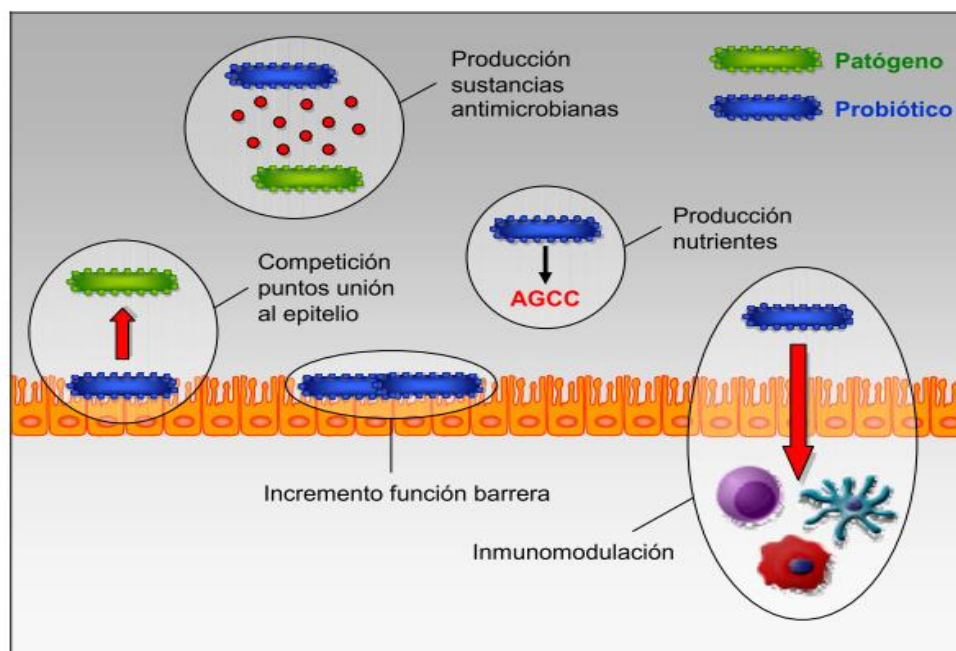


Figura N° 1: Mecanismos de acción generales de los probióticos. (3)

3.1.4 Probióticos no pertenecientes al tracto gastrointestinal: Formadores de esporas como probióticos.

Previamente se mencionó que idealmente una bacteria probiótica, debe ser parte de la flora normal del intestino humano, ya que al ingerirse, la colonización del intestino es mucho más fácil y descarta posibles interacciones perjudiciales con el huésped. Sin embargo, un acercamiento más pragmático del concepto de probiótico reconoce que la actividad probiótica deriva la acción que realiza la

bacteria en diferentes sitios (incluyendo sitios no intestinales como la boca, el estómago o el tracto vaginal) y una variedad de mecanismos, algunos de los cuáles no requieren de los atributos de la flora nativa, como lo es la habilidad de adherirse a las células epiteliales o la colonización del tracto gastrointestinal. ⁽⁵⁸⁾

Dentro de estos probióticos no pertenecientes al tracto gastrointestinal, tenemos a las bacterias formadoras de esporas del género *Bacillus*.

3.1.4.1 El género *Bacillus*.

Las bacterias del género *Bacillus* se presentan como células en forma de pequeños bastones, a veces, en cadenas capaces de producir endosporas. La esporangia, no difiere de las células vegetativas salvo en los casos donde la espora es mayor al diámetro celular. Tal esporangia tiene forma de eje si la espora se encuentra en el centro del citosol, o bien, obtienen forma similar a palillos de tambor cuando es terminal. ⁽⁶⁾

La formación de esporas sucede obedeciendo el mecanismo presentado en la Figura N° 2.

El proceso de esporulación inicia cuando las condiciones nutricionales se tornan poco favorables, hay casi agotamiento de las fuentes de nitrógeno o de carbono (o ambas), lo que constituye los factores más significativos.

Desde el punto de vista morfológico, la esporulación inicia con la formación de un filamento axial. El proceso continúa con el plegamiento de la membrana, de forma, que se produce una doble membrana cuyas superficies corresponden a la superficie de síntesis de la pared celular de la envoltura celular.

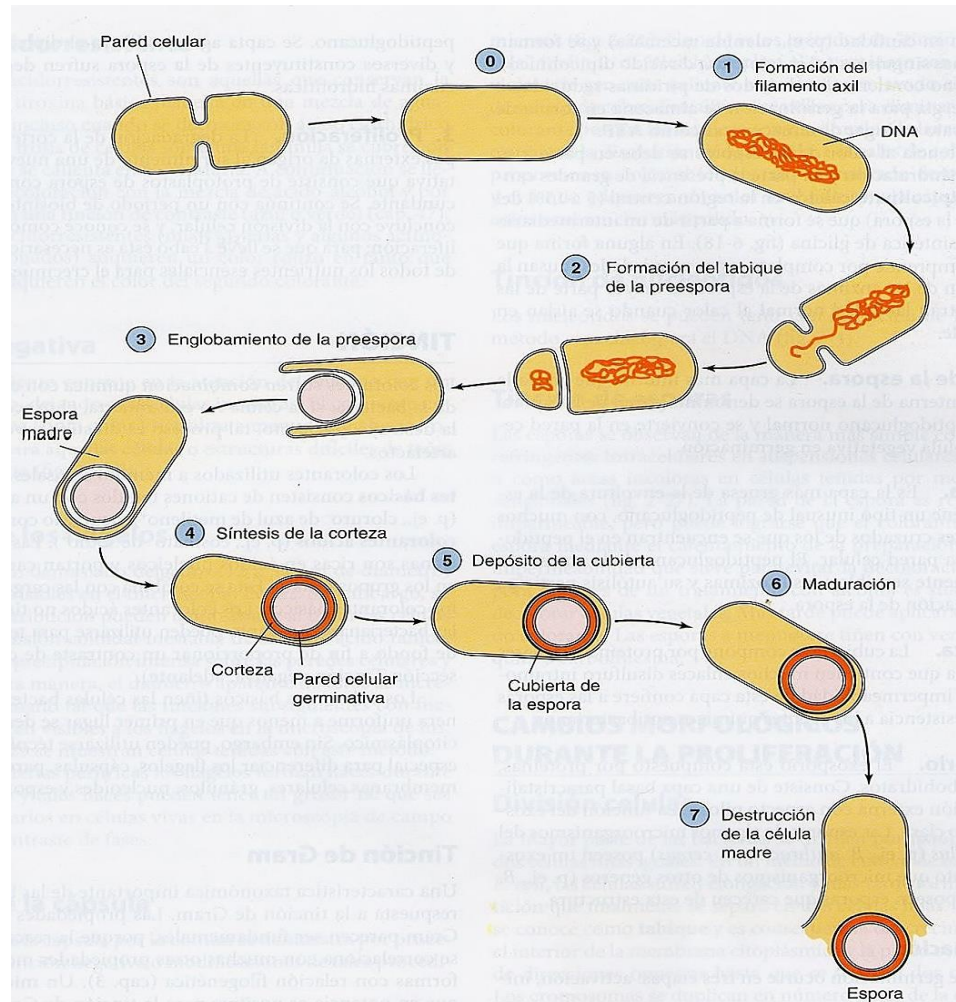


Figura N° 2: Proceso de formación de espora en una bacteria del género *Bacillus*.⁽⁷⁾

Los puntos de crecimiento se desplazan de manera progresiva hacia el polo de la célula de forma que pueda englobar la espora en formación.

Las dos membranas de la espora inician la síntesis activa de capas especiales que formarán la envoltura celular: la pared de la espora y la corteza que se encuentran fuera de las membranas en aposición. En el nuevo citoplasma aislado, muchas enzimas de la célula vegetativa sufren degradación y son sustituidas por un grupo de constituyentes singulares para la espora. ⁽⁷⁾

Las bacterias del género *Bacillus* pueden presentar movilidad o no, dependiendo si el microorganismo presenta flagelos del tipo peritrico. En general, son Gram-positivos; sin embargo, algunas especies pueden presentarse como Gram-variables o Gram-negativos. ⁽⁶⁾

La diferencia entre los bacilos Gram-positivos o Gram-negativos, radica en el grosor de la pared celular formada por peptidoglucanos, macromoléculas compuestas por estructuras alternadas de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. El grosor de la pared celular de las bacterias *Gram-positivas* puede ser hasta de cuarenta hojas de peptidoglucano, formando hasta un 50% de la pared y aumentando su grosor significativamente. En el caso de las bacterias *Gram-negativas*, estas solo constan de una o dos hojas de peptidoglucano, formando solamente un 5-10% de la estructura de la pared; sin embargo, esta ausencia de grosor es compensada con la formación de una membrana externa que añade protección a las bacterias. ⁽⁷⁾

Usualmente, las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* descomponen las fuentes de nitrógeno para formar amoníaco, fermentan los carbohidratos con la producción de acidez moderada; algunas incluso son capaces de producir gas en cantidades visibles. ⁽⁶⁾

3.1.4.2 *Bacillus coagulans*

El *Bacillus coagulans* es una especie del género *Bacillus*, que se aísla de diferentes fuentes, como la leche; se presenta como bastones de tamaño de 0.6 a 1.0 micrones de ancho y de 2.5 a 5.0 micrones de largo, es un microorganismo que presenta movilidad, es Gram positivo y a veces Gram Variable, se tiñe uniformemente al observarlo al microscopio. ⁽⁶⁾ Es un microorganismo formador de esporas, y a diferencia de otras bacterias del género *Bacillus*, su espora se forma en los polos del cuerpo bacteriano, lo que se denomina como espora terminal. ⁽¹⁴⁾

Bacillus coagulans crece óptimamente a temperaturas entre 33°C y 45°C⁽⁶⁾; es un microorganismo anaerobio facultativo preferentemente, aunque crece en presencia normal de oxígeno (aerobio); es Catalasa positivo, por lo que le puede producir oxígeno molecular a partir de peróxido de hidrógeno; es incapaz de reducir nitratos a nitritos; y no posee citocromo-c oxidasa, por lo que no pueden utilizar el oxígeno como fuente de energía en la cadena de transporte de electrones, o bien, utilizan otra enzima citocromo para aportar electrones al oxígeno.^{(6) (14)}

El Cuadro N° 3, muestra las principales diferencias entre *Bacillus coagulans* con otras bacterias del género *Bacillus* y con bacterias del género *Lactobacillus*:

Cuadro N° 3: Principales diferencias entre *Bacillus coagulans* y bacterias de los géneros *Bacillus* y *Lactobacillus*.⁽¹⁴⁾

Característica	<i>B. coagulans</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>
Catalasa	+	+	-
Oxidasa	-	+	-
Reducción de nitratos	-	+a	-
Esporas	+	+	-
Motilidad	+	+	-/+
Producción de ácido láctico	+	-	+
Ácido meso-diaminopimélico	+	+	-/+

Bacillus coagulans, ha demostrado cumplir con varias de las características para que pueda clasificarse como bacteria probiótica, ya que la FDA (Food and Drug Administration), lo ha considerado como GRAS (Generally Recognized as Safe) por sus siglas en inglés, que significa Generalmente Reconocido como Seguro.

^{(15) (22)}

Además, presentan resistencia a las sales biliares con una tolerancia de débil (crecimiento retardado, por al menos 40 minutos con respecto a un control) a sensitiva (crecimiento retardado por al menos 60 minutos con respecto a un control).^{(14) (33)}

De acuerdo a una investigación con 4 cepas de *B. coagulans*, sometidas a pH de 2.5 y 3.0, ninguna célula vegetativa fue capaz de sobrevivir en estas condiciones de acidez. ⁽³³⁾ Por lo que su potencial probiótico se ve puesto en duda; sin embargo, el estudio no toma en cuenta la capacidad del *B. coagulans* para formar esporas, lo cual puede ser de gran importancia para su supervivencia a condiciones extremas de acidez como lo es el pH estomacal.

Además, de tener potencial resistencia a las barreras biológicas, también presenta actividad antimicrobiana por la producción de sustancias inhibitorias, como el ácido láctico y una Sustancia Inhibitoria Similar a Bacteriocina llamada “coagulina”, la cual es un polipéptido perteneciente a las bacteriocinas del tipo II a o llamadas “bacteriocinas similares a la pediocina”. La pediocina, es una sustancia inhibitoria producida por la bacteria *Pediococcus acidilactici* y al pertenecer al grupo II de la clasificación bioquímica y genética para las bacteriocinas, se caracteriza por tener marcada actividad contra especies de *Listeria*. ^{(32) (38)}

La coagulina, al igual que la pediocina, posee un mecanismo de acción para su actividad contra las diferentes especies de *Listeria* el cual trabaja de la siguiente manera: la coagulina es un polipéptido altamente hidrofóbico, por lo que es capaz de actuar sobre la membrana celular de la *Listeria*, lo hace adhiriéndose a la superficie de la célula de una manera no específica, luego se une a una estructura similar a receptor que se encuentra en la membrana. Posteriormente, la coagulina se inserta en la membrana y forma agregados o estructuras oligoméricas, las cuales forman poros hidrofílicos, que permiten la salida de iones y moléculas pequeñas del contenido intracelular de las células de *Listeria*; resultando así en la muerte celular, ya sea por lisis o simplemente por la salida del contenido intracelular.

3.2 *Listeria monocytogenes*

3.2.1 Generalidades de *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es una bacteria patógena para el ser humano cuya infección principalmente se produce por la vía alimentaria, se implicó como agente etiológico en las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) a partir de los años 80. ⁽⁵⁴⁾ Se encuentra ampliamente distribuida tanto en el ambiente terrestre (suelo, plantas, ensilaje, materia fecal, aguas residuales), como en el ambiente acuícola, y también en lugares donde se procesan alimentos. ⁽⁵⁹⁾

Este microorganismo se describió por primera vez en 1926 por Murray, Webb, Swann como ***Bacterium monocytogenes*** debido a una epizootia en conejos y cobayos de laboratorio que se caracterizaba por monocitosis, pero hasta en 1957, el alemán Heinz Seeliger impuso el nombre *Listeria monocytogenes*, que se utiliza hasta hoy. ⁽⁵⁴⁾

3.2.2 Caracterización de *Listeria monocytogenes*

El género *Listeria* concentra numerosas especies: *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria grayi* y *Listeria monocytogenes*; solo esta última se ha mostrado patógena al hombre.

Listeria monocytogenes, es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa, no esporulante con forma de bastón, móvil a 25 °C e inmóvil a 37 °C, capaz de sobrevivir a temperaturas extremas entre 1 °C y 45 °C con un óptimo a 37 °C. Se le considera un patógeno psicrótrofo, es decir, capaz de desarrollar a temperaturas de refrigeración.

Las células tienen resistencia al frío, deshidratación, concentraciones altas de sal, desarrollando en concentraciones de un 10% y sobreviviendo a valores de hasta 16-20% de NaCl. En cuanto al pH, desarrolla en un rango entre 4,4 y 9,4; también son muy tolerantes al ácido estomacal. Esta tolerancia se debe a la presencia del sistema enzimático glutamato descarboxilasa (GAD). Por tanto, puede superar la preservación de alimentos y las barreras de seguridad de manera que es un microorganismo patógeno importante transmitido en los alimentos. ^{(35) (55) (59)}

Presenta catalasa positiva y oxidasa negativa, ⁽¹⁷⁾ es hemolítica y produce β -hemólisis en placas de agar con sangre de ovejas o caballos. En la prueba CAMP (Cristie, Atkinson, Munch, Peterson), en presencia de *Staphylococcus aureus*, es positiva a β -lisina, genera una zona de hemólisis larga característica en la unión de dos cultivos en la placa de agar con sangre. ⁽⁵⁵⁾

Listeria monocytogenes posee flagelos peritricos, que le dan un volteo característica, la motilidad, que ocurre sólo en un estrecho intervalo de temperatura, cuando el organismo se cultiva entre 20 y 25 °C, la flagelina es a la vez producido y montado en la superficie celular; pero la producción de flagelina se reduce notablemente a 37°C. Las colonias demuestran una característica brillo azul-verde con luz transmitida oblicuamente. ⁽¹⁷⁾

3.2.3 Patogénesis

Listeria monocytogenes ha sido aislada de una gran variedad de fuentes, como agua dulce, agua salada, sumideros, suelos, polvo ambiental, silos, fertilizantes y vegetación en descomposición; alimento para animales, alimentos crudos de origen animal, incluidas aves frescas y congeladas, carnes roja, y productos cárnicos; pescado; productos lácteos crudos, como leche, quesos y helados;

frutas y vegetales crudos; y a partir de heces de seres humanos sanos y sintomáticos, como también de otros animales.⁽³⁷⁾ No obstante, su principal hábitat es el suelo y la materia vegetal en descomposición, en la cual sobrevive y crece como saprofito. Debido a su amplia distribución, este microorganismo tiene muchas oportunidades de contaminar alimentos en distintos pasos de la producción alimentaria, siendo ésta la vía más frecuente por la que el ser humano adquiere la infección.⁽⁵³⁾

La susceptibilidad del huésped juega un papel importante en la presentación de la enfermedad clínica tras la exposición a *Listeria monocytogenes*. Por lo tanto, la mayoría de los pacientes de listeriosis tienen un defecto fisiológico o patológico que afecta a la inmunidad mediada por células T, este justifica la clasificación de *Listeria monocytogenes* como un patógeno oportunista. Los grupos en riesgo de listeriosis son las mujeres embarazadas y los recién nacidos, los ancianos (mayores de 55 años) y adultos inmunocomprometidos o debilitados con enfermedades subyacentes. La listeriosis en adultos no embarazadas está asociada en la mayoría de casos (0,75%) con al menos una de las condiciones siguientes: neoplasias malignas (leucemia, linfoma o sarcoma) y la quimioterapia antineoplásica, la terapia de inmunosupresor (el trasplante de órganos o el uso de cortico-esteroides), enfermedad hepática crónica (cirrosis o alcoholismo), enfermedad renal, diabetes y enfermedades del colágeno (lupus).⁽⁶⁶⁾

La cantidad de células capaces de causar infección varían entre individuos, entre los cuales los inmunosuprimidos son los más susceptibles, en base a datos epidemiológicos, se estima que la dosis de infección es de 100 a 1000 células; en individuos saludables la enfermedad es menos grave y se manifiesta como gastroenteritis febril, y se requieren cantidades de 10^8 a 10^{10} UFC/g ó UFC/mL para causar la enfermedad.⁽⁵⁵⁾

L. monocytogenes produce una toxina citolítica y hemolítica, llamada listeriolisina O, que actúa como un importante factor de virulencia. Se trata de una proteína de 52 kD que se secreta a pH bajo y baja concentración de hierro, condiciones presentes en el interior del fagolisosoma. Cuando es fagocitado, el microorganismo empieza a fabricar la listeriolisina, que se fija al colesterol y rompe la membrana del fagolisosoma. Este puede ser el principal factor que favorece su supervivencia intracelular, una de las características patológicas más definitorias de *Listeria monocytogenes*.⁽⁵³⁾

3.2.4 Ciclo infeccioso de *Listeria monocytogenes*

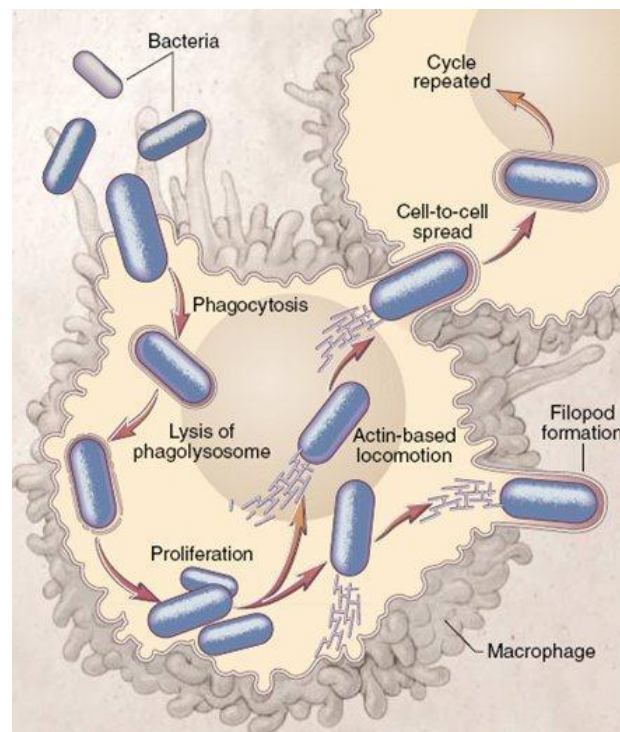


Figura N° 3: Ciclo de infección de *Listeria monocytogenes*.

Listeria monocytogenes es un parásito intracelular facultativo que penetra en el hospedador a través del sistema digestivo, tanto del hombre como de los animales.

En los últimos años se han identificado un gran número de factores de virulencia involucrados en los pasos clave del ciclo de vida intracelular de *L. monocytogenes*.

El ciclo de infección de *Listeria monocytogenes* consta de cuatro etapas:

3.2.4.1 *Entrada a las células del hospedero*

3.2.4.2 *Escape del fagosoma y desarrollo intracelular*

3.2.4.3 *Desplazamiento intracitoplasmático*

3.2.4.4 *Diseminación de célula a célula*

3.2.4.1 Entrada a las células del hospedero

Después de la infección, *Listeria monocytogenes* pasa al estómago indemne y luego alcanza el intestino delgado. El glutamato descarboxilasa (GAD) ayuda a que estas bacterias sobrevivan en el ácido estomacal, mientras que la hidrolasa de las sales biliares protege a la *Listeria monocytogenes* de la acción antimicrobiana de las sales biliares. Las bacterias pasan rápidamente a través del intestino vía la placa de Peyer, que se localiza en el tejido linfático, donde las células M las fagocitan y permiten la translocación bacteriana a la lámina propia y luego a la circulación sanguínea. ⁽⁵⁵⁾

La internalización se lleva a cabo por la formación de una vesícula fagosómica, en esta participan dos proteínas de superficie denominadas internalina A (Inl A) e internalina B (Inl B), cada una provoca un mecanismo de internalización de *Listeria monocytogenes* diferente. ⁽⁵⁴⁾

La internalina A, interviene en la adhesión e invasión de células epiteliales polarizadas como las intestinales. ⁽⁸⁾ El receptor en la célula epitelial, para la internalina A es la proteína transmembranal E-caderina, glicoproteína

transmembranal que contiene cinco dominios extracelulares de caderina (Ectodominios, EC1-EC5) y un dominio intracitoplasmático que regula la adhesión célula a célula y es dependiente de calcio. ⁽⁶¹⁾

La vía de internalización mediada por las internalinas B está basada en la interacción de estas con su receptor (Met), lo cual, da lugar a una cascada de señales que producen la internalización de *Listeria*, esto se da en células epiteliales no polarizadas como los hepatocitos. ⁽⁸⁾

3.2.4.2 Escape del fagosoma y desarrollo intracelular

Una vez que *Listeria monocytogenes* ha ingresado a la célula hospedera, lleva a cabo la lisis de la membrana vacuolar, con base en la acción de una potente toxina formadora de poros: la listeriolisina O (LLO), reconoce el colesterol de membrana, forma poros y favorece la lisis de la membrana del fagolisosoma, emigrando al citosol de la célula hospedero, donde encuentra el medio favorable para la multiplicación. ⁽⁶¹⁾

Una vez la LLO perfora la membrana vacuolar, es reconocida por enzimas en el citoplasma de las células y destruida antes de que pueda dañar la membrana celular. La LLO actúa como un estímulo inflamatorio induciendo activación celular endotelial, activación neutrofílica y apoptosis, y es responsable de la b-hemólisis en agar sangre. ⁽⁶¹⁾

Cepas de *Listeria monocytogenes* no productoras de Listeriolisina O, pueden sobrevivir dentro de las vacuolas de los fagocitos, pero no se pueden multiplicar e infectar otras células debido a la incapacidad de escapar de las vacuolas. ⁽⁶¹⁾

Dos tipos de fosfolipasas C sintetizadas por *L. monocytogenes*, las fosfolipasas C fosfatidilinositol específicas (PI-PLC) de 33KDa, codificadas por el gen *plcA* y las fosfolipasas C fosfatidilcolina específicas (PC-PLC) de 29KDa, codificadas por el gen *plcB*, juegan un papel importante en el poder invasivo. ⁽⁶¹⁾

Adicionalmente, *Listeria monocytogenes* produce catalasa y superóxidodismutasa, dos enzimas que la protegen de la oxidación fagolisosómica. Una vez que concretada la lisis del fagosoma, el microorganismo se libera al citosol, en donde se multiplica con un tiempo de generación de 50 minutos, lo que se considera una alta velocidad de crecimiento para un patógeno intracelular. ⁽²⁴⁾

3.2.4.3 Desplazamiento intracitoplasmático

El movimiento intracelular tiene lugar como consecuencia de un ensamblaje direccional de monómeros de actina de la célula hospedadora en uno de los polos de la bacteria, fenómeno aparentemente dirigido por la proteína de superficie Act A (Actina A). De esta manera, la morfología del microorganismo muestra estructuras (actínicas) semejantes a la cola de un cometa. Consecuentemente la polimerización de la actina aporta la fuerza locomotora para que *Listeria monocytogenes* transite en el ambiente intracelular a velocidades de 0.05 a 0.3 $\mu\text{m}/\text{seg}$. ⁽⁵⁴⁾

3.2.4.4 Diseminación de célula a célula

La polimerización polar de actina propulsa a *L. monocytogenes* por el citoplasma en un movimiento aleatorio que hace que finalmente algunas bacterias alcancen la periferia de la célula infectada. Allí éstas entran en contacto con la membrana celular, haciendo protrusión hacia la célula colindante en evaginaciones citoplásmicas que contiene en su extremo una bacteria. Estas estructuras

invasoras son fagocitadas y la bacteria queda encerrada en un fagosoma de doble membrana, en cuya disrupción parece jugar un principal papel la lecitinasa. Al ser un mecanismo que permite la diseminación de la bacteria por los tejidos del hospedador sin entrar en contacto con los efectores humorales del sistema inmune, este fenómeno es crucial en la patogénesis de la infección por *Listeria*.⁽⁸⁾

Estas estructuras invasoras son fagocitadas y la bacteria queda encerrada en un fagosoma de doble membrana, del cual procederá a escapar y a repetir los eventos que protagonizó anteriormente.

3.2.5 Listeriosis

Listeriosis es una infección causada por *Listeria monocytogenes*, es un patógeno oportunista, que puede suponer un riesgo vital, con tasas de letalidad de 20 a 30%; afecta a las personas con circunstancias subyacentes graves (como tratamiento inmunodepresor, VIH/SIDA y enfermedades crónicas, como la cirrosis, que producen inmunodeficiencia), mujeres embarazadas; fetos o niños recién nacidos, y personas mayores.

Una característica importante de la listeriosis transmitida por alimentos es que el patógeno puede multiplicarse a temperaturas de refrigeración hasta alcanzar cifras significativas, si transcurre suficiente tiempo. A pesar de que son muchos y diversos los alimentos que pueden contaminarse con *L. monocytogenes*, las epidemias y los casos esporádicos de listeriosis están predominantemente asociados a alimentos listos para el consumo, verduras, hortalizas, carnes frescas o procesadas, mariscos, quesos, leches.⁽⁵¹⁾

3.2.6 Cuadro clínico de listeriosis ⁽⁵¹⁾

Las diversas manifestaciones clínicas asociadas a la listeriosis pueden agruparse en dos categorías: **listeriosis invasiva** y **listeriosis no invasiva**.

- **Listeriosis invasiva**

Se refiere a los casos en que una infección inicial del tejido intestinal por *L. monocytogenes* deriva en la invasión de partes del organismo que habitualmente son estériles, como el útero grávido, el Sistema Nervioso Central o la sangre, o combinaciones de éstos. La listeriosis invasiva se caracteriza por una tasa de letalidad alta, de 20 a 30% y las infecciones pueden producir secuelas, aunque la incidencia de éstas pocas veces se determina.

- **Listeriosis no invasiva** (conocida como gastroenteritis febril por listerias)

En estos casos se han observado en algunos brotes en los que la mayoría de los casos presentaron síntomas de gastroenteritis, como diarrea, fiebre, cefalea y mialgia, tras un período de incubación corto. Estos brotes se han producido generalmente tras la ingestión de dosis altas de *L. monocytogenes* por personas previamente sanas.

3.2.7 Listeriosis durante el embarazo ^{(9) (19)}

Las mujeres embarazadas tienen una probabilidad aproximadamente 10 veces mayor de contraer *listeriosis* que otros adultos sanos. Se estima que 1 de cada 7 mujeres embarazadas presentan casos de *listeriosis*.

Los síntomas pueden tardar unos días o semanas en aparecer, los cuales son similares a la influenza (gripe) y pueden incluir: fiebre, escalofríos, dolores musculares, diarrea, malestar estomacal. Si la infección se propaga al sistema nervioso, los síntomas pueden incluir: dolor de cabeza, cuello rígido, confusión y

pérdida del equilibrio. En algunos casos más graves, la listeriosis también puede provocar la muerte de la madre.

La mayoría de las veces, las mujeres embarazadas infectadas con listeriosis son asintomáticas. Sin embargo, pueden transmitir la infección a sus bebés no nacidos sin siquiera saberlo. Por esta razón, la *prevención* de la listeriosis es muy importante.

Durante el primer trimestre de embarazo, la listeriosis puede provocar abortos espontáneos. A medida que el embarazo llega al tercer trimestre, la madre corre mayores riesgos. La listeriosis también puede provocar partos prematuros, nacimientos de bebés con bajo peso o la muerte de bebés. Los fetos que contraen una infección tardía pueden desarrollar una amplia gama de problemas de salud, incluidos retrasos mentales, parálisis, crisis epilépticas, ceguera o trastornos cerebrales, cardíacos o renales. En los recién nacidos, la *L. monocytogenes* puede provocar infecciones sanguíneas y meningitis.

3.2.8 Diagnóstico y tratamiento

Depende esencialmente de los siguientes factores: *antecedentes de la madre, manifestaciones clínicas y hallazgos bacteriológicos.* ⁽¹²⁾

Antecedentes maternos: abortos, mortinatos, hijos de bajo peso al nacer, infección ovular con o sin rotura prematura de membranas, cuadros febriles maternos de causa desconocida y que se acompañan de mialgias durante el tercer trimestre del embarazo, endometritis, meconio en líquido amniótico, alteración de los latidos cardíofetales; deben hacer pensar al clínico en la posibilidad de esta infección. La *Listeria monocytogenes* se ha encontrado en la

secreción vaginal de mujeres con antecedentes de aborto habitual en más de un 70%.⁽¹²⁾

Las *manifestaciones clínicas* en el recién nacido, descritas anteriormente, son variables y dependen del momento en que adquiere la enfermedad.⁽¹²⁾

El *diagnóstico definitivo* se realiza a través de cultivos seriados positivos para *Listeria monocytogenes* en sangre, Líquido Cefalorraquídeo o líquido amniótico.⁽¹²⁾

La *Listeria monocytogenes* es un microorganismo sensible a penicilina, ampicilina, eritromicina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloramfenicol, rifampicina, tetraciclinas, aminoglucósidos, imipenem, quinolonas y cefalosporinas. El tratamiento de elección es la ampicilina o la penicilina por vía intravenosa. Como alternativa se recomienda el uso de trimetoprim-sulfametoxazol. Es conocido que el tratamiento durante la fase de bacteriemia materna puede evitar la infección neonatal. De acuerdo con estudios, los casos de aparición antes de las 20 semanas tuvieron un peor pronóstico en comparación con los de aparición más tardía.⁽²⁴⁾

- En la mujer embarazada:

Se recomienda como tratamiento de elección alta dosis de Penicilina o de Ampicilina, pero la respuesta suele ser pobre debido a la poca penetración celular. Trimetoprim-Sulfametoxazol parece que es más efectivo, debido a las altas concentraciones celulares. Pero éste está contraindicado en el primer trimestre del embarazo: Trimetoprim es teratogénico. En el último trimestre tampoco debe usarse, ya que el Sulfametoxazol desplaza a la bilirrubina de la albúmina (*kernicterus neonatal*), por lo cual, también está contraindicado en la lactancia.

Otra terapia alternativa sería la Gentamicina. El tratamiento debe ser siempre combinado:

Penicilina G 240.000 a 320.000 U/kg/día, cada 4 horas + Tobramicina 5 a 6 mg/kg/día cada 8 horas.

Un plan alternativo, pero con menos ventajas, es usar Ampicilina + Gentamicina en dosis similares.

- En individuos de edad avanzada, personas inmunocomprometidas y lactantes. El tratamiento de elección para Listeriosis en estos individuos es la Penicilina o Ampicilina solas o asociadas a Gentamicina. La Eritromicina es una alternativa en personas alérgicas a la penicilina y sus derivados.

Cabe señalar que algunas publicaciones subrayan la ineficacia de la Penicilina, pero los reportes sólo están basados en fracasos terapéuticos; de hecho, los fármacos más utilizados para tratar la Listeriosis son ésta y la Ampicilina: la combinación Penicilina–Gentamicina logra efectos sinérgicos contra el microorganismo, tanto in vitro como in vivo, por lo cual representa el tratamiento estándar de la listeriosis humana.

Otra alternativa consiste en usar Trimetropin-Sulfametoxazol. La Listeriosis sin tratamiento en estos grupos de pacientes casi siempre es mortal. Inclusive con la terapéutica adecuada produce la muerte en 13 a 34% de los adultos con Listeriosis sistémica aguda, en 15 a 50% de los lactantes con Listeriosis de inicio temprano y en 10 a 20% de los lactantes con Listeriosis de inicio tardío.

La infección de los adultos inmunocompetentes suele ser leve y autolimitante por lo tanto no requiere tratamiento. ⁽⁵⁴⁾

3.2.9 Epidemiología

La Listeriosis puede presentarse esporádicamente o en epidemias; en ambas situaciones, los alimentos tanto de origen animal (cárnicos y lácteos) como de origen vegetal (verduras, frutas y hortalizas) contaminados son los principales vehículos de transmisión de *Listeria monocytogenes*.⁽⁵⁴⁾

Listeria monocytogenes había sido conocida por ser un microorganismo patógeno para el ser humano, no fue hasta la década de 1980, que las autoridades sanitarias reconocen que se ha ido convirtiendo en una de las Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETA) más letal conocida, causando gran alarma a nivel mundial a productores de alimentos, consumidores y autoridades sanitarias.⁽⁴⁹⁾

Los alimentos implicados con mayor frecuencia en los brotes de Listeriosis en el hombre son los productos elaborados que no necesitan cocción antes de su consumo o al uso extensivo de la refrigeración por el hombre. La conservación y la industrialización de los alimentos trajeron como consecuencia algunos cambios que dieron lugar a brotes masivos por *Listeria* en lugar de casos esporádicos.⁽⁵⁴⁾

Desde entonces han continuado reportándose brotes causado por *Listeria monocytogenes* en todo el mundo:

Nueva Escocia, Canadá, en 1981. Brote causado por la ensalada de col que involucró a 41 casos con 27 por ciento de mortalidad. Treinta y cuatro de ellos fueron casos asociados con el embarazo, mientras que siete eran mujeres adultas no embarazadas.⁽⁴⁹⁾

Oeste de Suiza, desde 1983 a 1987. Brote asociados al consumo de queso blando; ocurrieron un total de 122 casos: 65 casos se dieron en recién nacidos y

mujeres embarazadas; y 57 casos en varones y en mujeres no embarazadas. Todos los pacientes eran mayores de 18 años de edad, de los cuales se aisló *Listeria* de la sangre o del LCR. La tasa de mortalidad fue de 32%. ⁽⁵⁵⁾

Los Ángeles, 1985. Un brote de listeriosis se produjo en gran escala en el condado de Los Ángeles, California; debido al consumo de queso al estilo mexicano. Se reportaron 142 casos de listeriosis en humanos, de los cuáles 93 de ellos ocurrieron en mujeres embarazadas, y el resto de casos se produjeron en mujeres adultas no embarazadas. Este brote provocó 48 muertos, entre ellos 20 fetos, 10 neonatos y 18 mujeres no embarazadas. Una investigación de la planta de queso sugirió que el queso era comúnmente contaminado por la leche sin pasteurizar. La cepa del brote fue el serotipo 4b. ⁽²¹⁾

Estados Unidos, 1998 y 1999. Un brote multiestatal ocurrido en 11 estados, causó al menos 50 casos de listeriosis, de los cuáles 6 adultos murieron y 2 mujeres embarazadas tuvieron abortos espontáneos. El alimento contaminado vinculado a este brote eran Hotdogs, cuyos aislamientos de *Listeria monocytogenes* fueron de serotipo 4b. ⁽²¹⁾

Carolina del Norte, 2000 y 2001. Brote de listeriosis asociado al consumo de queso casero estilo mexicano, elaborado con leche sin pasteurizar, proveniente de una lechería local. Las personas afectadas eran inmigrantes mexicanos residentes en E.U.A. De los 12 casos identificados, 11 eran mujeres con una edad media de 21 años (18-38 años) y un hombre de 70 años inmunocomprometido. Diez de las mujeres estaban embarazadas y la infección con *L. monocytogenes* dio lugar a 5 fetos muertos, 3 prematuros y 2 recién nacidos infectados. La undécima mujer tenía 5 meses post parto cuando se presentó en un hospital local con meningitis causada por *L. monocytogenes*, sin haber tenido condición médica pre-existente alguna. ⁽⁵⁶⁾

De acuerdo con las estadísticas de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), estiman que se producen anualmente en los Estados Unidos aproximadamente 1.600 enfermedades y 260 muertes debido a la listeriosis. En 2013, la incidencia media anual de listeriosis en los Estados Unidos fue de 0,26 casos por cada 100.000 personas. La listeriosis se observa principalmente en países industrializados, pero no se sabe si las diferencias entre las incidencias en los países desarrollados y en los países menos desarrollados se deben a diferencias geográficas verdaderas, a las diferentes costumbres alimentarias y medios de conservación de los alimentos, o a diferencias en las prácticas de diagnóstico y notificación. ^{(10) (51)}

3.3 Efecto del *Bacillus coagulans* contra *Listeria monocytogenes*

Bacillus coagulans como parte del mecanismo probiótico de competición con bacterias patógenas secreta una sustancia inhibitoria similar a bacteriocina llamada “coagulina”, la cual es un polipéptido perteneciente a las bacteriocinas del tipo IIa conocidas como “bacteriocinas similares a la pediocina” nombradas debido a la bacteriocina secretada por el microorganismo *Pediococcus acidilactici* conocida como pediocina. La similitud de la coagulina con la pediocina radica en que su estructura de aminoácidos es idéntica a la pediocina en 32 de 44 aminoácidos, además de la presencia de residuos de cisteína con dos puentes disulfuros; esta estructura es necesaria para la actividad antimicrobiana. ^{(32) (37)}

La coagulina es un polipéptido altamente hidrofóbico, por lo que es capaz de actuar sobre la membrana celular de *Listeria monocytogenes*, lo hace adhiriéndose a la superficie de la célula de una manera no específica, luego se une a una estructura similar a receptor que se encuentra en la membrana. Posteriormente, la coagulina se inserta en la membrana y forma agregados o estructuras oligoméricas las cuales forman poros hidrofílicos que

permiten la salida de iones y moléculas pequeñas del contenido intracelular de las células de *Listeria monocytogenes*; resultando así en la muerte celular ya por lisis o simplemente por la salida del contenido intracelular. ⁽⁶⁷⁾

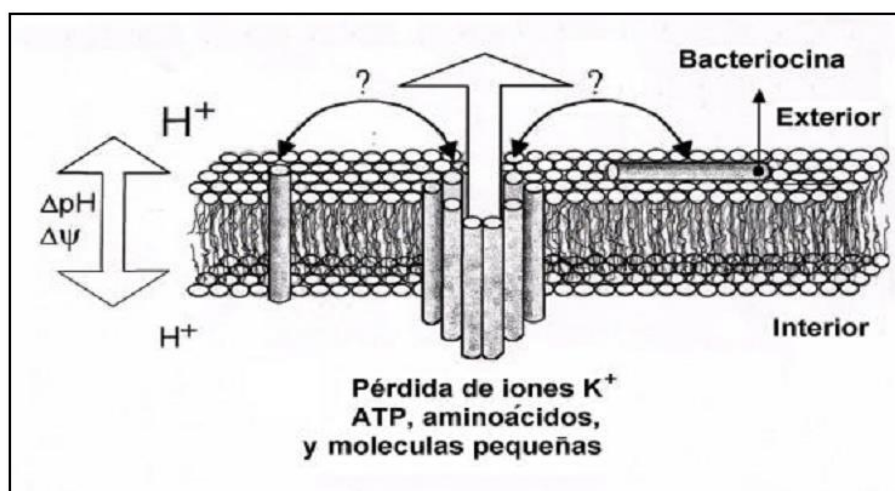


Figura N° 4: Mecanismo de acción de coagulina en la membrana celular de *Listeria monocytogenes*. ⁽⁴⁴⁾

3.4 Fundamento de pruebas para la identificación de *Listeria monocytogenes*.

3.4.1 Pruebas presuntivas

3.4.1.1 Tinción de Gram ⁽⁴⁾⁽³⁷⁾

La tinción de Gram o coloración de Gram es un tipo de tinción diferencial empleado en Bacteriología para la visualización de bacterias, sobre todo en muestras clínicas. Debe su nombre al bacteriólogo danés Christian Gram, que desarrolló la técnica en 1884. Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose *bacteria Gram positiva* a las bacterias

que se visualizan de color morado, y *bacteria Gram negativa* a las que se visualizan de color rosa o rojo.

El **crystal violeta** (colorante catiónico) penetra en todas las células bacterianas (tanto Gram positivas como Gram negativas) a través de la pared bacteriana. El **lugol** es un compuesto formado por I₂ (yodo) en equilibrio con KI (yoduro de potasio) y SI (Sulterio), los cuales están presente para solubilizar el yodo, y actúan de mordiente, haciendo que el cristal violeta se fije con mayor intensidad a la pared de la célula bacteriana. El I₂ entra en las células y forma un complejo insoluble en solución acuosa con el cristal violeta.

La mezcla de **alcohol-acetona** que se agrega, sirve para realizar la decoloración, ya que en la misma es soluble el complejo I₂/cristal violeta. Los organismos Gram positivos no se decoloran, mientras que los Gram negativos sí lo hacen.

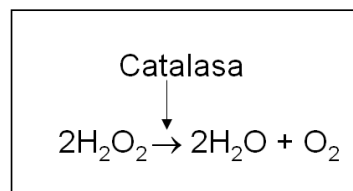
Para poner de manifiesto las células Gram negativas se utiliza una coloración de contraste. Habitualmente es un colorante de color rojo, como la **safranina** o la fucsina. Después de la coloración de contraste las células Gram negativas son rojas, mientras que las Gram positivas permanecen violetas.

3.4.1.2 Sistema Óptico de Henry⁽³⁰⁾

Consiste en examinar la placa con colonias sospechosas de *Listeria* spp., utilizando un haz de luz blanca, que debe alcanzar el fondo de la placa en un ángulo de 45°, cuando se examina con esta luz oblicua, reflejada con una posición ocular directamente encima de la placa, ya sea a simple vista o con ayuda de una lupa, las colonias de *Listeria* spp., se observan de color azul-grisáceo a azul.

3.4.1.3 Catalasa ⁽⁴⁵⁾

El objetivo es buscar la presencia de la enzima catalasa, la cual, es capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) en agua y oxígeno molecular, lo cual interfiere en la destrucción intrafagocítica mediada por radicales tóxicos de oxígeno, con la consiguiente aparición de burbujas.



3.4.1.4 Prueba de hemólisis ^{(37) (54)}

Detecta la presencia de hemolisina, enzima que permite la clasificación de los *Streptococcus* en **alfa** (hemólisis parcial, incompleta que torna color verdoso), **beta** (hemólisis total) y **gamma hemolíticos** (no existe hemólisis). Muchas otras bacterias, aparte de los *Streptococcus*, como por ejemplo *Listeria*, pueden tener esta enzima. Se usa el cultivo para demostrar el grado de hemólisis (hemólisis beta) en la cual se puede observar claramente por detrás de la siembra.

3.4.2 Pruebas semiconfirmatorias

3.4.2.1 MIO (MOVILIDAD-INDOL-ORNITINA) ^{(37) (54)}

Esta prueba bioquímica permite identificar bacterias de acuerdo a su motilidad a la reacción del Indol a la descarboxilación de la ornitina.

3.4.2.2 Prueba CAMP ^{(37) (54)}

La prueba Christie–Atkins–Munch–Peterson (CAMP) es una herramienta muy útil que facilita la identificación de las especies de *Listeria* spp., a partir de los aislamientos.

Consiste en sembrar en estría una cepa β -hemolítica de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y de *Rhodococcus equi* ATCC 13071, formando unas únicas líneas rectas y paralelas, en una placa de agar sangre de oveja; las estrías deben tener la suficiente separación para permitir que las cepas de *Listeria* de prueba y de control se puedan sembrar perpendicularmente, entre los dos organismos indicadores, sin que los toquen.

La prueba positiva se evidencia por la presencia de una zona de potenciación de la hemólisis en forma de puntas de flecha en el lugar donde se contactan las dos estrías.

La prueba CAMP aprovecha la capacidad hemolítica de las distintas especies de *Listeria* para su confirmación.

Listeria producen un factor llamado CAMP (factor de monofosfato de adenina cíclica) que aumenta la zona de hemólisis producida por un estafilococo productor de β -lisina.

3.4.3 Prueba confirmatoria

3.4.3.1 Pruebas API ⁽⁴²⁾

La galería API *Listeria* es un sistema estandarizado para la identificación de *Listeria* que utiliza ensayos miniaturizados, así como una base de datos

específica. La lista completa de las bacterias que pueden identificarse utilizando este sistema está indicada en el Cuadro N° 7 (Ver Anexo N° 5)

Principio

La galería API Listeria consta de 10 microtubos que contienen substratos deshidratados, y permiten la realización de ensayos enzimáticos o de fermentación de azúcares.

Las reacciones que se producen durante la incubación se traducen en cambios de color, bien espontáneos o bien provocados mediante la adición de reactivos. La lectura de estas reacciones se realiza con la ayuda del Cuadro N° 6, Identificación de las reacciones de pruebas API® Listeria; y la interpretación se realiza tras consultar la lista de perfiles numéricos (Cuadro N° 7) o con la ayuda de un software de identificación.

Las pruebas que consta la galería son las siguientes: DIM (Substrato enzimático), ESC (Esculina, Citrato férrico), α MAN (4-nitrofenil- α D-manopiranosida), DARL (D-Arabitol), XYL (D-Xilosa), RHA (L-Rhamnosa), MDG (Metil- α D-glucopiranosido), RIB (D-Ribosa), G1P (Glucosa-1-Fosfato), TAG (D-Tagatosa).

3.5 Fundamento de pruebas para la identificación de *Bacillus coagulans*

3.5.1 Prueba de Oxidasa (34) (39)

La **prueba de oxidasa** es una prueba usada en microbiología para determinar si una bacteria produce alguna de las citocromo c oxidasas. La prueba hace uso de discos impregnados con el reactivo N,n,n,n-tetrametil-p-fenilendiamina (TMFD o Reactivo de Kovac's) o N,N-Dimetil-p-fenilendiamina (DMFD), el cual también es un indicador redox. El reactivo pasa de azul oscuro a granate al ser oxidado, y se vuelve transparente al ser reducido. Las bacterias oxidasa positiva poseen

citocromo oxidasa o indofenol oxidasa; una hemoproteína que contiene dos moléculas de Hemo A y cada una contiene un átomo de hierro que varía en sus valencias entre Fe^{3+} y Fe^{2+} y dos átomos de cobre (Cu^{2+}) asociados con la actividad de citocromo oxidasa y la reacción de electrones con el oxígeno molecular.

Las enzimas citocromo oxidasa catalizan el transporte de electrones de compuestos donantes (NADH) a receptores de electrones (por lo general el oxígeno). En la prueba, el reactivo TMFD actúa como donante artificial de electrones para la enzima oxidasa. El reactivo oxidado forma el compuesto coloreado de indofenol azul. El sistema citocromo está normalmente presente solo en los organismos aerobios capaces de usar el oxígeno como aceptor final de hidrógeno. El producto final de este metabolismo puede ser agua o peróxido de hidrógeno. También una reacción positiva de oxidasa evidencia la presencia de microorganismos que son capaces de crecer en presencia de oxígeno y producir la enzima catalasa.

3.5.2 Prueba de Reducción de Nitratos ⁽³⁹⁾

La reducción de nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-) y a nitrógeno gaseoso (N_2) por lo común se produce en condiciones de anaerobiosis, en las cuales un microorganismo produce oxígeno a partir del nitrato. El oxígeno actúa como aceptor final de electrones a fin de proporcionar energía en un ambiente anaerobio. El proceso de reducción de nitrato a nitrógeno gaseoso u óxido nitroso (N_2O) se denomina desnitrificación.

En el proceso de desnitrificación, puede acumularse óxido nitroso (intermediario) si la concentración de nitrato es alta; cuando la concentración de nitrato es baja, el óxido nitroso es reducido con posterioridad a nitrógeno molecular. En la

reducción de nitratos pueden ocurrir diversos procesos para la utilización de los productos finales obtenidos; por consiguiente, en la prueba de reducción de nitratos, la reducción se evidencia por la presencia de un producto final catabólico o por la ausencia de nitrato en el medio.

Para la prueba de reducción de nitratos se utilizan medios de cultivo que en su composición posean una fuente de nitrato como lo es el KNO_3 (Nitrato de potasio). Para evidenciar la reacción se utilizan dos reactivos: N,N-Dimetil- α -naftilamina disuelta en Ácido acético glacial 5N y ácido sulfanílico (ácido p-aminobenceno sulfónico) disuelto en Ácido acético glacial 5N.

La formación de gas en el medio de cultivo es evidencia de la reducción de nitrato, sin embargo, si el microorganismo es fermentador, la presencia de gas no es un resultado confirmatorio por lo que es necesario añadir los reactivos anteriormente mencionados, en partes iguales.

La presencia de una coloración roja dentro de 1-2 minutos denota una prueba positiva. La reacción evidencia la presencia de nitritos en el medio los cuales reaccionan con el ácido sulfanílico y dimetil- α -naftilamina para formar un compuesto diazonio coloreado (p-sulfobenceno-azo- α -naftilamina). Si no se desarrolla color, es necesario posteriormente añadir unos 20 mg de polvo de cinc (Zn) puro, si aparece una coloración roja dentro de 5-10 minutos, el resultado se considera negativo, ya que el cinc metálico reacciona con los nitratos presentes en el medio, por lo que el microorganismo no es capaz de reducir los nitratos como fuente de energía. Sin embargo, si no hay desarrollo de color al añadir cinc metálico, el microorganismo además de reducir los nitratos a nitritos, es capaz de reducir los nitritos a nitrógeno molecular, que solo se evidencia en la producción de gas.

3.6 Medios selectivos utilizados.

Un medio de cultivo está constituido de un gel (Agar) o una solución (caldo) que cuenta con los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento de microorganismos. Los medios de cultivo sólidos, son llamados agares debido a que en su composición se encuentra una gelatina de origen vegetal conocida como agar-agar la cual es un extracto coloidal hidrofílico proveniente de las algas *Gelidium cartilagineum*, *Gracilaria confervoides* y algas relacionadas de la clase *Rhodophyceae*. ^{(18) (62)}

Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial debe reunir una serie de condiciones como son: temperatura, grado de humedad y cantidad de oxígeno adecuado, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad. Un medio de cultivo ideal debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios para permitir el desarrollo de los microorganismos y debe estar exento de todo contaminante químico, físico o biológico.

La selectividad de un medio de cultivo radica en la composición del medio como tal, ya que puede modificarse con ingredientes específicos que permitan el crecimiento de un solo microorganismo y además, inhibir el crecimiento de bacterias que no forman parte del objeto de estudio.

A continuación, se detallan los medios de cultivos necesarios para el crecimiento, identificación, conteo y prueba de antagonismo microbiano para los microorganismos *Listeria monocytogenes* y *Bacillus coagulans*.

- **Caldo BHI (Brain Heart Infusion)** ⁽⁴⁶⁾

Este medio de cultivo está basado en el principio del caldo ROSENOW que contiene pequeñas piezas de tejido cerebral y puede ser utilizado para cultivar

varios tipos de bacterias fastidiosas como streptococos, pneumococos, meningococos, etc.

El Caldo Cerebro Corazón es especialmente adecuado para el cultivo de estafilococos para la prueba de coagulasa en plasma sanguíneo.

- **Caldo MRS** ⁽⁵⁰⁾

El caldo Lactobacilli MRS, se basa en las formulaciones de Deman, Rogosa y Sharpe (MRS). Este medio favorece el crecimiento exuberante de lactobacilos de oral, fecal, lácteos y otras fuentes.

El digerido enzimático de tejidos animales, extracto de carne, y extracto de levadura son los de carbono, nitrógeno, y fuentes de vitaminas utilizadas para satisfacer los requisitos generales de crecimiento en caldo MRS lactobacilos. La dextrosa es el carbohidrato fermentable. Acetato de sodio es un agente inhibidor. Acetato de sodio y citrato de amonio actúan como agentes selectivos, así como fuentes de energía. Fosfato de potasio es el agente tampón. Sulfato de magnesio y sulfato de manganeso proporcionan cationes utilizados en el metabolismo. Polisorbato 80 es un tensioactivo, facilitar la absorción de nutrientes por los lactobacilos.

- **Agar MRS** ⁽²⁶⁾

El medio MRS está basado en la formulación de Man, Rogosa and Sharpe con una ligera modificación. Es compatible con el crecimiento cuantioso de todos los *Lactobacillus* de la cavidad oral, productos lácteos, alimentos, heces y otras fuentes. La Proteasa peptona y el extracto de carne aportan nitrógeno y compuestos del carbono. El extracto de levadura aporta vitaminas del complejo B. La dextrosa es el carbohidrato fermentable como fuente de energía. El Polisorbato 80 suministra los ácidos grasos requeridos para el metabolismo de

los *Lactobacillus*. El acetato de sodio y citrato de amonio inhiben estreptococos, mohos y muchos otros microorganismos. El sulfato de magnesio y sulfato de manganeso proporcionan iones esenciales para la multiplicación de los *Lactobacillus*. Los fosfatos proporcionan una buena acción tampón en el medio. Los *Lactobacillus* son microaerófilo y generalmente requieren cultivo aeróbico en medios sólidos. Por su lado el género *Bifidobacterium* requiere un cultivo anaeróbico en medio sólido.

- **Agar Mueller Hinton** ⁽²⁸⁾

El agar Mueller Hinton es recomendado para la difusión de agentes antimicrobianos impregnados en discos de papel a través de un agar en gel como se describe en los Estándare Aprobados por la CLSI. La CLSI ha seleccionado el agar Mueller Hinton por varias razones:

- Es bajo en inhibidores de sulfonamida, trimetropim y tetraciclinas.
- Permite el crecimiento de la mayoría de bacterias patógenas no fastidiosas.
- El comité de estandarización de Pruebas de Susceptibilidad de la OMS, ha aceptado el agar Mueller Hinton para determinar la suceptibilidad de microorganismos debido a la reproducibilidad de las pruebas.

Infusión de carne e hidrolizado de caseína proveen componentes nitrogenados, de carbono, azufre y otros nutrientes esenciales. El almidón actúa como un protector coloidal contra sustancias toxicas presentes en el medio. El hidrolizado de almidón contiene dextrosa, lo cual se utiliza como una fuente de energía. Estos ingredientes son seleccionados para obtener bajo contenido en timina y timidina, como se ha determinado para los valores de CIM (concentración inhibitoria minima) para *Enterococcus faecalis* con Trimetropinsulfametoxazol. Las concentraciones de iones calcio y magnesio han sido ajustadas para proveer las cantidades recomendadas por la CLSI para obtener los valores correctos de CIM para aminoglucósidos y *Pseudomona aeruginosa*.

- **Agar PALCAM.** ⁽⁶⁰⁾

El medio PALCAM está basado en la formulación descrita por Van Netten y es recomendado para el aislamiento de *Listeria monocytogenes* a partir de alimentos.

El medio PALCAM es altamente selectivo debido a la presencia de cloruro de litio, ceftazidima, polimixina y clorhidrato de acriflavina. Esto permite el fácil diagnóstico diferencial de *Listeria monocytogenes* utilizando el sistema de indicador doble.

- Ión férrico y esculina.
- Manitol y rojo de fenol.

Listeria monocytogenes hidroliza la esculina resultando en la formación de un halo color negro alrededor de las colonias. *Listeria monocytogenes* no fermenta el manitol, así que se puede hacer una fácil diferenciación de los contaminantes como enterococos y estafilococos ya que estos microorganismos si fermentan el manitol. Esta formulación produce un cambio de rojo a amarillo por medio del indicador Rojo de Fenol cuando existe una alteración de pH que lo hace inferior a 6.8.

- **Agar Sangre** ⁽⁴⁸⁾

Su abundante base nutritiva ofrece condiciones óptimas de crecimiento a todos los microorganismos presentes. El valor del pH de 6,8, es especialmente favorable para la conservación de los eritrocitos y para la formación de halos hemolíticos claros. Para la determinación de las formas de hemólisis es adecuado añadir sangre de oveja, recién obtenida, desfibrinada. Por calentamiento, después de la adición de sangre, se obtiene el Agar-sangre cocida («Agar chocolate») que es un medio nutritivo excelente.

- **Agar SIM** ⁽⁴⁷⁾

Motilidad se indica mediante una turbidez difusa del medio de cultivo que rodea a la línea de punción. En caso de inmovilidad, el crecimiento tiene lugar únicamente a lo largo de la línea de la punción. Formación de H₂S se muestra por un ennegrecimiento en aquellas áreas del medio en el que el crecimiento microbiano se ha producido.

- **Agar TSA + Extracto de Levadura** ^{(27) (29)}

El agar Triptona Soya está conformado de acuerdo a la USP y es usado en la prueba de límites microbianos y la prueba de efectividad antimicrobiana. La combinación de digerido pancreático de caseína y digerido papaico de soya, hacen a este medio muy nutritivo ya que provee aminoácidos y largas cadenas peptídicas para el crecimiento de microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico.

El extracto de levadura es manufacturado de sepas seleccionadas de *Saccharomyces* bajo condiciones controladas, reteniendo todos los valores nutritivos, aminoácidos, vitaminas especialmente del complejo B y factores de crecimiento. Su contenido en sal es bajo y es recomendado para medios de cultivo microbiológico, donde aporta vitaminas del complejo B en una concentración de 0.3% al 0.5%. Es particularmente utilizado para aislamiento de microorganismos encontrados en productos lácteos.

CAPITULO IV
DISEÑO METOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO.

Estudio de Campo

Se desarrolló una visita al Hospital Nacional de La Mujer y al Hospital Dr. Benjamín Bloom con la finalidad de realizar un estudio epidemiológico para recopilar datos de casos de listeriosis, detectados anualmente desde el año 2012 a 2015, en mujeres embarazadas y en niños, de edades entre cero y dos años. Sólo se obtuvieron datos del Hospital Nacional de La Mujer.

Se realizó una búsqueda de productos alimenticios que contengan microorganismos probióticos, en diferentes puntos de venta de San Salvador, seleccionando un suplemento alimenticio que contenga la bacteria probiótica *Bacillus coagulans*, debido a que investigaciones internacionales han demostrado que dicha bacteria probiótica, posee actividad inhibitoria contra *Listeria monocytogenes*.

Estudio Experimental

Los análisis de la parte práctica se realizaron en el Laboratorio de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.

Estudio Prospectivo

Los resultados obtenidos de este trabajo podrán ser utilizados para recomendar el probiótico comercializado, en forma de suplemento alimenticio, a personas inmunocomprometidas para prevenir una infección por *Listeria monocytogenes*. De igual manera, pueden servir de referencia para posteriores estudios sobre *Bacillus coagulans*.

4.2 INVESTIGACION BIBLIOGRAFICA

La investigación bibliográfica se realizó en los siguientes sitios:

- Biblioteca Dr. Benjamín Orozco, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.
- Biblioteca de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador.
- Biblioteca Central de la Universidad de El Salvador.
- Internet.

4.3 PARTE EXPERIMENTAL

Este trabajo de investigación se desarrolló en dos etapas:

Primera etapa

Se realizó la caracterización del patógeno, *Listeria monocytogenes*, partiendo de una cepa ATCC 19114, proporcionada en criovial congelado por el laboratorio de microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud; del cual se obtuvo la cepa de trabajo en caldo BHI. Se aisló el microorganismo patógeno en agar TSAye, posteriormente se ejecutaron las pruebas de identificación presuntivas (inoculación en medio selectivo PALCAM, iluminación oblicua de Henry, catalasa, tinción de Gram, y hemólisis), semiconfirmatorias (Movilidad y CAMP), y confirmatorias (pruebas API).

También se llevó a cabo el aislamiento de microorganismo que contiene el suplemento alimenticio; posteriormente, se ejecutó la caracterización del *Bacillus coagulans*, por medio de tinción de Gram, prueba de catalasa, reducción de nitratos y la prueba de oxidasa.

El suplemento alimenticio, rotula que contiene 5×10^{12} UFC por dulce masticable. Se realizó un recuento en placa, en condiciones anaeróbicas para comprobar la concentración real en el suplemento alimenticio. Este procedimiento se realizó

con un total de 10 muestras (10 masticables) tomados a partir de un paquete que contenía 30 gomas masticables.

Segunda etapa

Se evaluó el microorganismo probiótico, encontrado en el suplemento alimenticio, por el método de antagonismo microbiano para establecer si posee la capacidad de inhibir a la bacteria patógena, *Listeria monocytogenes* ATCC 19114; y además, si cumple con la definición de probiótico al someterlo las pruebas de resistencia contra barreras biológicas, como los ácidos estomacales y las sales biliares.

4.3.1 Aislamiento de *Listeria monocytogenes*.

La cepa patógena *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, fue donada por el Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), proporcionada en criovial congelado con caldo BHI. (Ver Anexo N° 5)

4.3.2 Mantenimiento de la cepa de trabajo de *Listeria monocytogenes* ATCC 19114. ⁽⁶²⁾

Partiendo del criovial proporcionado por el Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), se procedió a descongelarlo a temperatura ambiente por 4 horas; a partir de este criovial, inocular en tres tubos con 5 mL de caldo BHI, dejar incubar por 24 horas a 37°C. Luego de su crecimiento, colocar los tubos con BHI en refrigeración a 3°C. (Ver Anexo N° 5)

4.3.3 Pruebas de identificación de *Listeria monocytogenes* ATCC 19114

A partir del tubo con caldo BHI, donde se mantiene la cepa patógena (cepa de trabajo), inocular en placas con Agar Tripticasa Soya con 0.6% de Extracto de Levadura (TSAye), de la siguiente manera: dos placas utilizando la técnica de estriado continuo, para la identificación de *Listeria monocytogenes* por medio del Sistema Óptico de Henry; y otras dos placas utilizando la técnica de estriado de tres campos, con la finalidad de aislar colonias, para la inoculación en medio de cultivo selectivo para *Listeria* (agar PALCAM) y para las pruebas de identificación por medio de tinción al Gram, hemólisis y la prueba CAMP. (Anexo N° 5)

4.3.3.1 Frotis bacteriano y tinción Gram. ⁽⁴⁾

Con una asa bacteriológica estéril, tomar una colonia aislada de *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, a partir del crecimiento en medio agar TSAye; extender sobre una gota de solución salina en un portaobjeto de vidrio, para formar una película. Pasar el frotis, por el mechero cerca de la llama y luego dejar secar cerca del mechero. Aplicar al frotis unas cuantas gotas de cristal violeta y dejar actuar durante un minuto. Enjuagar con agua destilada y agregar unas gotas de lugol, y dejar actuar un minuto. Enjuagar con agua destilada y decolorar de inmediato con alcohol-acetona. Luego enjuagar con agua destilada. Después adicionar gotas de safranina hasta cubrir el frotis, esperar un minuto y enjuagar con agua destilada. Eliminar el exceso de agua secar con papel toalla para quitar la humedad. Por último observar al microscopio y determinar la morfología. (Ver Anexo N° 5)

4.3.3.2 Sistema Óptico de Henry ⁽³⁰⁾

1. Armar el equipo que se muestra en el Anexo N° 5, Figura N° 37; colocando un haz de luz blanca, muy potente, en un soporte de manera que refleje el haz

de luz sobre un espejo plano, y este se refracte hacia placa de Petri, que contiene el patógeno.

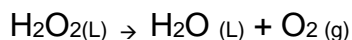
2. Observar con una posición ocular directamente encima de la placa, ya sea a simple vista o con ayuda de una lupa, las colonias de *Listeria spp* se observan de color azul-grisáceo a azul.

4.3.3.3 Inoculación en medio selectivo PALCAM

1. Inocular una colonia de *Listeria monocytogenes*, aislada de agar TSAye con asa bacteriológica estéril en medio selectivo PALCAM.
2. Incubar a 35°C por 24 – 48 horas
3. Observar colonias transparentes con halo de color negro.

4.3.3.4 CATALASA ⁽⁴⁵⁾

1. Seleccionar una colonia de *Listeria monocytogenes*, aislada de agar TSAye con palillo estéril y colocar sobre un porta objeto limpio.
2. Agregar una gota de peróxido de Hidrógeno al 3 % (H₂O₂). Un burbujeo en los primeros segundos indica reacción positiva. (Ver Anexo N° 5)



4.3.3.5 Prueba de Hemólisis ⁽³⁰⁾

1. Dibujar de 20-25 espacios en la base de la placa de Petri que contiene agar sangre de carnero al 5%.
2. Inocular con asa bacteriológica, en punta, colonias típicas de las placas de TSAye a placas de agar sangre de carnero al 5%, punzar una colonia por espacio dibujado en la placa.

Nota: Tener el cuidado de no romper el medio.

3. Incubar a 35°C por 24 – 48 horas
4. Observar la formación de un halo claro alrededor de la colonia color beige. (Ver Anexo N° 5)

4.3.3.6 Prueba MIO (MOVILIDAD-INDOL-ORNITINA) ⁽⁵⁴⁾

1. A partir de una cepa de trabajo de *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, inocular con asa bacteriológica en punta en medio SIM.
2. Incubar por 7 días a temperatura ambiente (25°C).
3. Observar diariamente. *Listeria* spp. es móvil, proporcionando un patrón característico en forma de paraguas. (Ver Anexo N° 5)

4.3.3.7 Prueba CAMP ⁽⁵⁴⁾

1. En una placa con agar sangre de oveja, sembrar una estría con cultivo puro de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (β hemolítico), y otra de *Rhodococcus equi* ATCC 13071, en forma vertical y paralelas entre sí, lo suficientemente separadas para sembrar horizontalmente y perpendicularmente la cepa de *Listeria monocytogenes*, sin que toquen las estrías verticales.
2. Incubar a 35°C por 24 – 48 horas.
3. Examinar las placas a fin de observar formación de flecha. (Ver Anexo N° 5)

4.3.3.8 Pruebas API

a) Preparación de la galería ⁽⁴²⁾

1. Reunir fondo y tapa de una cámara de incubación y repartir aproximadamente 3 mL de agua desmineralizada estéril en los alvéolos, para crear la atmósfera húmeda.

2. Escribir la referencia de la cepa en la lengüeta lateral de la cámara.
3. Sacar la galería de su envase individual.
4. Colocar la galería en la cámara de incubación.
5. Tirar la bolsa antihumedad. (Ver Anexo N° 5)

b) Preparación del inóculo ⁽⁴²⁾

1. Abrir una ampolla de API Suspensión Medium (2 mL).
2. Con la ayuda de una asa bacteriológica, tomar colonias bien aisladas de un subcultivo con sangre de carnero al 5%. Utilizar preferentemente cultivos jóvenes (18-24 horas).
3. Realizar una suspensión de turbidez igual a 1 de McFarland. Esta suspensión debe ser utilizada inmediatamente después de su preparación. (Ver Anexo N° 20)
4. Observar el tipo de hemólisis y anotarlo en la hoja de resultados, ya que esta característica constituye un ensayo adicional.

c) Procedimiento general de estandarización de McFarland ⁽⁴³⁾

1. Preparar el estándar de concentración deseada, agregando la cantidad indicada en la Tabla N° 10 (Anexo N° 20) de los reactivos: cloruro de bario dihidratado ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.048M; 1.175% P/V); y de ácido sulfúrico (0.18 M, 0.36 N, 1%V/V).
2. Verificar la densidad correcta del estándar usando un espectrofotómetro, cuya absorbancia a 625 nm debería ser 0,08 - 0,10 para el estándar 0.5 de McFarland. (Ver Anexo N° 20)
3. Distribuir de 4 – 6 mL dentro de tubos similares a los que va a usar para preparar inóculos.
4. Mantener los estándares guardados a temperatura ambiente al abrigo de la luz.

5. Agitar vigorosamente el estándar antes de su uso para lograr una turbidez homogénea.
6. Reemplazar o verificar la confiabilidad de los estándares mensualmente.

d) Preparación del microorganismo de prueba para la estandarización por medio de McFarland. ⁽⁴³⁾

1. Tomar con asa bacteriológica estéril, 4 – 5 colonias aisladas del microorganismo de un cultivo en TSAye.
2. Suspende las colonias en un tubo que contiene 4 mL de solución salina.
3. Por comparación visual, llegar a la concentración de 1 McFarland, diluyendo la suspensión del microorganismo o agregando más microorganismos y agitar en vortex. (Ver Anexo N° 20)
4. La suspensión estandarizada del inóculo debe de ser utilizada en los siguientes 15 minutos de su preparación.

e) Inoculación de la galería ⁽⁴²⁾

1. Repartir la suspensión bacteriana precedente en los tubos, evitando la formación de burbujas (para ello) inclinar la cámara de incubación hacia delante y colocar la pipeta en un lado de la cúpula.
2. Llenar el tubo y la cúpula del ensayo DIM (100µL aprox.), cuidando que no se produzca un menisco convexo.
3. Llenar solamente la parte del tubo de los ensayos ESC a TAG (50µL aprox.).
4. NOTA: La calidad de llenado es muy importante: los tubos excesiva o insuficientemente llenos originan resultados falsos positivos o negativos.
5. Cerrar la cámara de incubación.
6. Incubar de 18-24 horas a $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en atmósfera aerobia.

LECTURA E INTERPRETACIÓN⁽⁴²⁾

f) Lectura de la galería (Ver Anexo N° 5)

Después de la incubación:

1. Agregar una gota de reactivo ZYM B al ensayo DIM.
2. Pasados 3 minutos leer todas las reacciones haciendo referencia a la Tabla de Identificación (Cuadro N° 6)
3. Anotar las reacciones de +/- en la hoja de resultados.
4. Anotar igualmente el tipo de hemólisis. El resultado de este ensayo no se tiene en cuenta en la interpretación de la galería.

g) Interpretación (Ver Anexo N° 5)

La identificación se obtiene a partir de la lista de perfiles numéricos.

1. *Determinación del perfil numérico.*

En la hoja de resultados, los tests están separados en grupos de tres y se asigna para cada uno, un valor de 1, 2 ó 4. Sumando en el inferior de cada grupo los números que corresponden a reacciones positivas, se obtienen 4 cifras que constituye el perfil numérico.

2. *Identificación.*

Se realiza a partir de la base de datos:

- Con la ayuda del Perfil Numérico: localizar el perfil numérico en la lista (Ver Cuadro N° 7); esta lista no es exhaustiva, en caso de un perfil inexistente, consultar en el programa informático citados o con la Asistencia Técnica de bioMérieux.
- Por medio del software de identificación **apiweb™**: introducir manualmente por teclado el perfil numérico de 4 cifras.

4.3.4 Comprobación de la concentración de *B. coagulans* en el suplemento alimenticio. ⁽²⁾

La comprobación de la concentración de la bacteria *Bacillus coagulans* a partir del suplemento alimenticio, el cual rotula una concentración de 5 billones (5.0×10^{12}) de UFC por masticable, se realizó por medio del método de conteo en placa.⁽²⁾ El suplemento rotula que contiene 30 gomas masticables, por lo tanto se decidió tomar como muestra la tercera parte del contenido, es decir 10 masticables, y el procesamiento de muestras se realizó de acuerdo al Cuadro N°4.

Cuadro N° 4: Número de muestras a procesar.

Muestras	Primer Recuento	Segundo Recuento	Tercer Recuento	Total de muestras
Número de masticables a procesar	4	4	2	10

Se escogió esta forma de muestreo, para realizar las diluciones adecuadamente, por ello fue necesario separar la muestra en tres recuentos, debido a que el equipo “stomacher” no tiene la capacidad de contener 1000 mL de diluyente.

La técnica a seguir consiste en: tomar del suplemento alimenticio, el número de muestras requerido de acuerdo al cuadro N° 4, y cortarlos con cuchillo estéril en piezas pequeñas, agregarlas a una bolsa de stomacher estéril, la cual deberá contener 400 mL de solución salina estéril para los dos primeros recuentos y 200 mL para el tercer recuento (Ver Anexo N° 7). Mezclar por 2 minutos a 200 rpm, para asegurar que la distribución del microorganismo en la solución salina sea uniforme. La solución que se obtenga tendrá una concentración de 10^{10} UFC. Posteriormente, verter el contenido ya homogéneo de la bolsa, en un frasco de vidrio adecuado para contener la solución homogénea del suplemento alimenticio, obtenida en cada recuento. ⁽²⁾

Luego, realizar diluciones seriadas de manera que se reduzca un logaritmo en la concentración por cada dilución, para ello inocular con pipeta 10 mL de la suspensión de concentración 10^{10} de *Bacillus coagulans* utilizando una pipeta estéril de 10 mL y verter en un frasco de 100mL que contiene 90 mL de solución salina, lo que conforma una concentración de 10^9 (Dilución 1 en 10). Proseguir con este método hasta una concentración de 10^1 .

Proseguir tomando un mililitro de las concentraciones 10^{10} , 10^3 , 10^2 y 10^1 , utilizando pipetas estériles de 1 mL y verter en placas Petri estériles de 90x15mm. Realizar este paso por duplicado. Añadir 20 mL de agar MRS, enfriado a 45°C , a cada placa petri inoculada con la suspensión de *B. coagulans*. ^{(2) (32)}

Homogeneizar el medio de cultivo y el inóculo mezclando en movimientos rotativos alternados y en un movimiento de vaivén en una superficie plana. Permitir que el agar solidifique, colocar las placas en una jarra de anaerobiosis de forma invertida y colocar un sobre de anaerobiosis activado, cerrar la jarra e incubar a 37°C por 48-72 horas.

Pasado el tiempo de incubación, realizar el conteo de colonias de las concentraciones 10^3 , 10^2 y 10^1 utilizando un contador de colonias. (Ver Anexo N°7)

4.3.5 Aislamiento del probiótico *Bacillus coagulans* del suplemento alimenticio comercial. ^{(36) (62)}

Para realizar el aislamiento del microorganismo *Bacillus coagulans* a partir del suplemento alimenticio, se utilizará la placa petri inoculada con una concentración 10^{10} del suplemento alimenticio. Verter sobre el crecimiento microbiano observado en el agar MRS de la placa, 10 mL de caldo BHI y arrastrar las colonias utilizando un asa bacteriológica previamente esterilizada.

Recolectar la suspensión de BHI con microorganismo y verter la suspensión utilizando pipeta de 5mL en dos tubos de ensayo estériles, 5mL de suspensión en cada tubo.

El microorganismo contenido en el caldo BHI se considera cepa de trabajo aislada. (Ver Anexo N° 8)

4.3.6 Pruebas de Identificación del probiótico *Bacillus coagulans*.

4.3.6.1 Tinción Gram ⁽⁴⁾ (Ver Anexo N° 5)

4.3.6.2 Prueba de Catalasa ⁽⁴⁵⁾ (Ver Anexo N° 5)

4.3.6.3 Prueba de Oxidasa. ^{(34) (39)}

Para realizar esta prueba, cortar tiras de papel filtro Whatman N° 1 de 6-8cm de ancho, saturar añadiendo gotas de tetrametil-p-fenilendiamina al 1% (Reactivo de Kovacs) y secar rápidamente.

Añadir a cada tira de papel impregnada con reactivo una colonia pura del cultivo de *Bacillus coagulans* utilizando un palillo de madera estéril.

La aparición de una coloración azul oscura en el sitio de inoculación a los 10 segundos denota una prueba positiva, la ausencia de coloración o la decoloración de la tira saturada es prueba negativa. Como control positivo de la prueba utilizar una colonia de la cepa de *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802. (Ver Anexo N°9)⁽³⁷⁾

4.3.6.4 Prueba de Reducción de Nitratos ⁽³⁹⁾

La reducción de nitratos se evidencia inoculando un medio de cultivo para nitratos tomando una colonia del cultivo de *Bacillus coagulans* e incubarlo a 37°C por 24 horas.

Esta prueba se realizó utilizando la galería API NE; usando el tubo que rotula “NIT”. Para el desarrollo de la prueba se siguió el siguiente procedimiento:

- a) Preparar una suspensión del microorganismo inoculando de 1 a 4 colonias de *Bacillus coagulans* en 2 mL de solución salina 0.85% o bien utilizar una ampolla de API NaCl 0.85% Medium (2 mL).
- b) Realizar una suspensión de turbidez igual a 0.5 de McFarland (Anexo N° 20) Esta suspensión debe ser utilizada de inmediato después de su preparación.
- c) Rellenar el tubo del ensayo de NO₃ con la suspensión al 0.5 de McFarland utilizando pipeta pasteur e inoculando sobre el lateral de la cúpula inclinando ligeramente la cámara de incubación hacia adelante.
- d) Tomar tapa de la cámara de incubación y repartir aproximadamente 5 mL de agua desmineralizada estéril en los alveolos para crear una atmósfera húmeda.
- e) Reunir fondo y tapa de la cámara de incubación. Cerrar la cámara e incubar a 29 ± 2°C durante 24 horas.
- f) Posterior a la incubación al tubo de ensayo NO₃ añadir una gota del reactivo NIT1 (α-naftilamina) y NIT 2 (ácido sulfanílico) en la cúpula NO₃.
- g) Pasados 5 minutos la aparición de un color rojo indica una reacción positiva. La ausencia de color denota una reacción negativa.
- h) Si existe una ausencia de coloración en la prueba anterior, añadir a la cúpula de NO₃ de 2-3 mg de reactivo de cinc.

- i) Después de 5 minutos una cúpula incolora denota reacción positiva en la reducción de nitratos y una cúpula color rosa-rojo denota una reacción negativa. (Ver Anexo N°9)

4.3.7 Prueba de Antagonismo Microbiano.

La prueba de antagonismo microbiano se realizó utilizando el ensayo de difusión en agar por medio de pozos; ⁽⁴⁰⁾ ⁽⁶⁵⁾ para ello se estandarizó los microorganismos utilizando espectrofotómetro UV-VIS

4.3.7.1 Estandarización de microorganismos por espectrofotometría UV-VIS.

Para preparar las bacterias de la prueba de antagonismo, sembrar un inóculo de *Listeria monocytogenes* en agar TSA y un inóculo de *Bacillus coagulans* en agar MRS, incubar a 37°C por 24h para *Listeria monocytogenes* y a 37°C por 48h para *B. coagulans*. Realizar este procedimiento 1 vez más para un total de 2 pases. Luego de este procedimiento, añadir a cada placa con crecimiento 10mL de solución salina al 0.9% ⁽⁶²⁾ y recoger el sembrado de microorganismos, verter la suspensión bacteriana en tubos de ensayo y agitar para obtener una suspensión bacteriana homogénea. (Ver Anexo N° 11)

Leer en espectrofotómetro UV-VIS a 620 nm y ajustar la suspensión añadiendo solución salina hasta una absorbancia de 0.3-0.4 para bacterias Gram positivas. Esta suspensión así ajustada corresponde entre $1-3 \times 10^8$ UFC/mL. A partir de la suspensión de *Bacillus coagulans*, ya estandarizada, realizar diluciones seriadas para obtener concentraciones de hasta 10^0 UFC/mL. Para obtener las diluciones de *Bacillus coagulans*, tomar 1.0 mL del tubo con suspensión estandarizada y

añadir a otro tubo con 9.0 mL de solución salina 0.9% utilizando pipeta de 1mL; ésta será la concentración 10^7 UFC/mL. Repetir el paso anterior tomando 1.0 mL del tubo con concentración 10^7 UFC/ mL de *Bacillus coagulans* para obtener una suspensión de concentración 10^6 UFC/mL y así sucesivamente hasta la concentración de 10^0 UFC/mL. Posteriormente realizar un recuento microbiano utilizando la técnica de placa vertida. Dicho recuento servirá para obtener la concentración exacta de la suspensión madre estandarizada. Las diluciones de concentración 10^7 UFC/mL y 10^6 UFC/mL así como la solución madre de concentración 10^8 UFC/mL se guardó para su uso posterior en la prueba de antagonismo microbiano y la prueba de resistencia a las barreras biológicas. (Ver Anexo N° 11)

4.3.7.2 Ensayo preliminar para determinar la concentración real de *Bacillus coagulans* en un disco impregnado con suspensión estandarizada de probiótico. ⁽²⁾

Para determinar la concentración real de *Bacillus coagulans* en los discos impregnados de probiótico: inocular 100 μ L de la suspensión estandarizada de *Bacillus coagulans* en un disco de papel filtro Whatman N° 1 estéril, dejar secar en cámara de flujo laminar y luego inocular el disco en un tubo con 10 mL de solución salina estéril. Esta suspensión es el factor de dilución 10^{-1} . Agitar el tubo vigorosamente para obtener una suspensión homogénea y luego realizar diluciones seriadas añadiendo 1 mL de la suspensión 10^{-1} a un tubo que contiene 9 mL de solución salina estéril y así sucesivamente hasta un factor de dilución de 10^{-8} . Inocular con pipeta en placas de Petri, 1 mL de las suspensiones 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} . Añadir a cada placa petri entre 15 y 20 mL de agar MRS a 45°C. Mezclar cuidadosamente con la técnica de mezclado en ocho y luego dejar solidificar. Incubar las placas en anaerobiosis por 48-72 horas y realizar conteo de las colonias obtenidas. (Ver Anexo N° 12)

4.3.7.3 Ensayo de antagonismo microbiano usando la técnica de Difusión en Agar por medio de Discos y Pozos. ⁽³⁶⁾⁽⁴⁰⁾⁽⁶⁵⁾

El ensayo de difusión en agar por medio de pozos, se realizó inoculando 1.0mL de una suspensión estandarizada de *Listeria monocytogenes* de concentración 10^8 UFC/mL en agar Mueller Hinton por esparcimiento en 3 planos de manera similar cada vez utilizando hisopo. Remover el exceso de suspensión de *Listeria monocytogenes* rotando el hisopo contra las paredes internas del tubo antes de la inoculación en el agar, dejar secar el inóculo por 3-5 min. ⁽³⁶⁾ Posteriormente utilizando un horador, abrir tres pocillos en el agar Mueller Hinton con una distancia suficiente entre los tres para observar la presencia de posibles halos de inhibición. Inocular 100 μ L de una suspensión estandarizada de *Bacillus coagulans* de concentración 10^8 UFC/mL, 10^7 UFC/mL y 10^6 UFC/mL en cada uno de los pocillos ⁽⁴⁰⁾ e incubar por 48 a 72 horas a 37°C. ⁽³⁶⁾⁽⁶⁵⁾ Realizar este paso por triplicado incubando dos de las repeticiones en condiciones de anaerobiosis y una en condiciones normales de oxígeno. (Ver Anexo N° 13)

Realizar el procedimiento anterior de nuevo por triplicado, reemplazando los pozos por discos impregnados con una suspensión estandarizada de *Bacillus coagulans* de concentración 10^8 UFC/mL. (Ver Anexo N° 13)

Como patrón de comparación de inhibición se realizará el mismo procedimiento, inoculando 1.0 mL de una suspensión estandarizada de *Listeria monocytogenes* de concentración 10^8 UFC/mL en agar Mueller Hinton por esparcimiento en 3 planos de manera similar cada vez utilizando hisopo. Remover el exceso de suspensión de *Listeria monocytogenes* rotando el hisopo contra las paredes internas del tubo antes de la inoculación en el agar, dejar secar el inóculo por 3-5 min. Posterior a este paso, depositar discos de antibióticos en el agar Mueller Hinton con una distancia suficiente entre los tres para observar la presencia de

posibles halos de inhibición. Cada uno de los discos contiene los siguientes antibióticos: Penicilina G (10 UI); Ampicilina (10µg) y Trimetroprin-sulfametoxazol (300 µg) e incubar por 48-72 horas. Realizar este procedimiento por triplicado incubando dos de las repeticiones en condiciones de anaerobiosis y una en condiciones normales de oxígeno. (Ver Anexo N° 13)

Repetir el mismo procedimiento de prueba y estándar alterando la concentración de inóculo de *Listeria monocytogenes*. Dicho inóculo tendrá una concentración de 10^3 .UFC/mL. (Ver Anexo N° 13)

4.3.7.4 Interpretación de resultados. ⁽³⁶⁾

Realizar una medida de los halos de inhibición tanto del probiótico como de los patrones utilizando un pie de rey.

Para determinar si el microorganismo patógeno *Listeria monocytogenes* es susceptible, medianamente susceptible, o resistente a las sustancias inhibitorias ya sea probiótico o antibiótico, se hará una comparación de la medida obtenida de los halos de inhibición en cada caso con las medidas de referencia establecidas por Kirby-Bauer para los quimioterapéuticos antimicrobianos más utilizados. (Ver Anexo N° 14, Cuadro N° 10)

Adicionalmente, realizar una comparación porcentual de las zonas de inhibición obtenidas de cada concentración ensayada de *Bacillus coagulans* (10^8 , 10^7 y 10^6), con las zonas de inhibición que presenten los antibióticos ensayados, de tal manera que cada concentración de *Bacillus coagulans* se compara con los tres diferentes antibióticos utilizados (Anexo N° 19). La fórmula a utilizar es la siguiente:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{DBC}}{\text{DA}} \times 100$$

Donde:

% Inhibición = Porcentaje de Inhibición

DBC = Diámetro de zona de inhibición de concentración de *B. coagulans* en milímetros.

DA = Diámetro de zona de inhibición de antibiótico en milímetros.

4.3.8 Evaluación del *Bacillus coagulans* frente a la resistencia contra el pH ácido del estómago y a sales biliares. ⁽³³⁾

El procedimiento se debe realizar en caldo MRS ajustado a pH de 2.0 y en caldo MRS enriquecido con sales biliares de origen bovino al 0.3%. Preparar 60 mL de caldo MRS, repartidos en cantidades de 25mL y 35mL en Erlenmeyers separados (Sistema A y Sistema B, respectivamente). Luego, se ajusta el pH del sistema "A" a pH de 2.0 con HCl 6M, luego distribuir en tubos con rosca en cantidades de 10mL; para el Sistema B, distribuir en tubos estériles en cantidades de 10 mL, sin modificar el pH. Esterilizar los 2 sistemas en autoclave a 121°C por 15min a 15lbs de presión. Después de la esterilización, a los tubos bacteriológicos del sistema "B", adicionar 30µL de sales biliares, de tal manera que se obtenga una concentración de 0.3% de sales biliares en el caldo MRS. (Ver Anexo N° 21)

4.3.8.1 Resistencia a acidez. ⁽³³⁾

El siguiente procedimiento se realiza por duplicado (Sistema "A"), dos tubos bacteriológicos con caldo MRS, pH=2.0; y un tubo bacteriológico con 10mL de caldo MRS, pH normal (6.5 ± 0.2) el cual será nuestro blanco. Se transfiere 100µL

del probiótico estandarizado (*Bacillus coagulans*) a una concentración de 10^8 UFC/mL a los cuatro tubos bacteriológicos con 10.0mL de caldo MRS. Se realiza recuento en tiempo inicial, pipeteando 1.0mL de cada uno de los tubos, inoculando en placa de Petri, y se añade por medio de la técnica de placa vertida, 20 mL de agar MRS, por duplicado.

Luego, se incuban los tubos con el probiótico inoculado a 37°C por 2 horas en jarra de anaerobiosis al 5% de CO₂, después de la incubación, pipetear 1.0mL de cada uno de los tubos, inoculando en placa de Petri, y añadir por medio de la técnica de placa vertida, 20 mL de agar MRS, por duplicado.

Incubar las placas de tiempo inicial (cero horas) y tiempo final (dos horas), a 37°C por 48-72 horas en condiciones de anaerobiosis al 5% de CO₂. (Ver Anexo N°21)

4.3.8.2 Resistencia a sales biliares. (33)

El siguiente procedimiento se realiza por duplicado (sistema "B"). Dos tubos bacteriológicos con caldo MRS, pH normal (6.5 ± 0.2) con 0.3% de sales biliares; y un tubo bacteriológico con 10mL de caldo MRS, pH normal (6.5 ± 0.2) (blanco). Transferir 100µL del probiótico estandarizado (*Bacillus coagulans*) a una concentración de 10^8 UFC/mL, a los cuatro tubos bacteriológicos con 10.0mL de caldo MRS. Realizar recuento en tiempo inicial, pipeteando 1.0mL de cada uno de los tubos, inoculando en placa de Petri, y añadir por medio de la técnica de placa vertida, 20 mL de agar MRS, por duplicado.

Luego, incubar los tubos con el probiótico inoculado a 37°C por 2 horas en jarra de anaerobiosis al 5% de CO₂, después de la incubación, pipetear 1.0mL de cada uno de los tubos, inoculando en placa de Petri, y añadir por medio de la técnica de placa vertida, 20 mL de agar MRS, por duplicado.

Incubar las placas de tiempo inicial (cero horas) y tiempo final (dos horas), a 37°C por 48-72 horas en condiciones de anaerobiosis al 5% de CO₂. (Ver Anexo N° 21)

4.3.8.3 Determinación del porcentaje de células viables. ⁽¹³⁾

La supervivencia de las cepas probióticas se realizó por medio del método conteo en placa utilizando agar MRS. Este porcentaje de supervivencia se calculó de la siguiente manera:

$$\% = \frac{\text{LogUFCN1}}{\text{LogUFCBo}} \times 100$$

Donde:

% = Porcentaje de supervivencia.

N1 = Total de unidades formadoras de colonias obtenidas en el recuento después de la incubación en agar MRS.

Bo = Número inicial de Probióticos inoculados.

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.1 Mantenimiento de la cepa de trabajo de *Listeria monocytogenes*.

Para obtener la cepa de trabajo de *Listeria monocytogenes* se procedió como establece el numeral 4.3.2

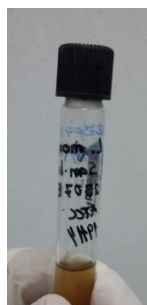


Figura N° 5: Cepa de trabajo de *Listeria monocytogenes*.

A partir del aislamiento del criovial se obtuvo una suspensión de bacteria que denominamos “cepa de trabajo de *Listeria monocytogenes*”, a partir de la cual se realizaron las subsecuentes pruebas de identificación.

5.2 Pruebas de identificación de *Listeria monocytogenes*.

La bacteria *Listeria monocytogenes* se identificó de acuerdo con la metodología que se detalla en el apartado 4.3.3. Los resultados de identificación de *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, confirman que efectivamente se trabajó con dicha bacteria patógena en los análisis realizados.

En primer lugar se llevó el proceso de reanimación de la cepa *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, proporcionada por el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), en criovial congelado. Una vez obteniendo la cepa de trabajo, se inoculó en placas con agar nutritivo enriquecido con 0.6% de extracto de levadura.

Posteriormente, se llevó a cabo el Frotis bacteriano y tinción Gram (Ver Anexo N° 5), en donde se observó que el patógeno pertenece al grupo de las bacterias Gram positivas, cuya morfología microscópica son bacilos cortos, color morado; además, se dedujo que el cultivo no estaba contaminado, por observarse únicamente dicha morfología en el frotis bacteriano. (Ver Figura N° 6)

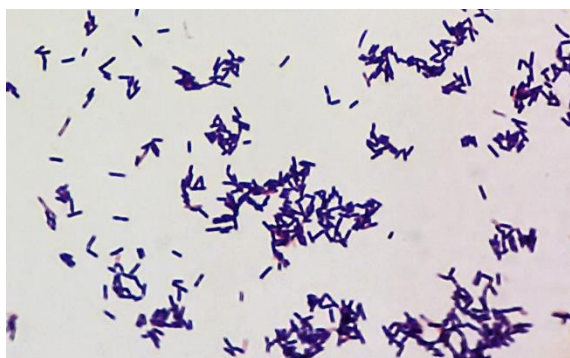


Figura N° 6: Resultados del frotis bacteriano y tinción Gram de *Listeria monocytogenes*.

Luego, se procedió a examinar una placa con colonias de *Listeria monocytogenes*, mediante el Sistema Óptico de Henry (Ver Figura N° 7), en el cual, se observó colonias color azul-grisáceo, debido a la refracción de un haz de luz blanca sobre un espejo plano.

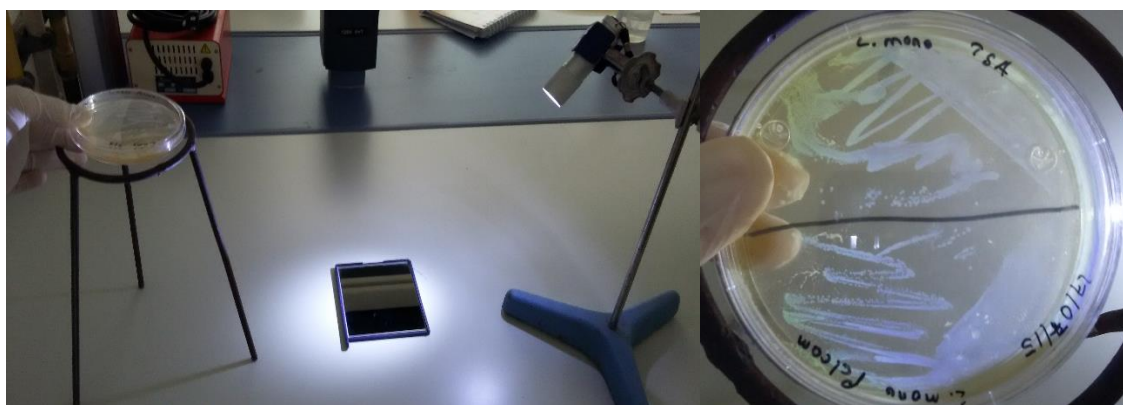


Figura N° 7: Resultados del Sistema Óptico de Henry.

En la inoculación en medio selectivo PALCAM, se observaron colonias transparentes con halo de color negro, lo cual indica la capacidad del patógeno de hidrolizar la esculina, tal como se observa en la Figura N° 8.

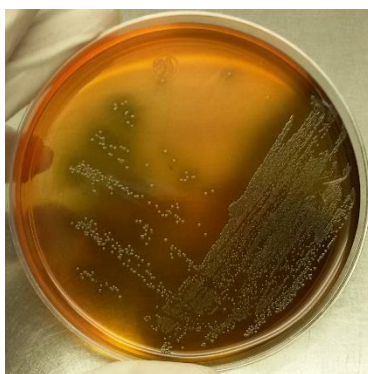


Figura N° 8: Resultados de la inoculación en medio selectivo PALCAM.

En la prueba catalasa, se observó burbujeo (Ver Figura N° 9), al agregar el peróxido de hidrógeno 3% sobre una colonia de *Listeria monocytogenes*, confirmando la presencia de la enzima de catalasa en el microorganismo patógeno.



Figura N° 9: Resultados de la prueba catalasa de *Listeria monocytogenes*.

En la prueba de hemólisis, se llevó a cabo la inoculación de colonias típicas de *Listeria monocytogenes*, mediante punción con asa bacteriológica en punta, en placas de agar sangre de carnero al 5%; luego del período de incubación, se observaron halos claros alrededor de la punción realizada, tal como se muestra en la Figura N° 10. Por consiguiente, se utilizó el microorganismo *Rhodococcus equi*, como control negativo, debido a que no produce hemólisis; y también se llevó como control positivo al microorganismo *Staphylococcus aureus*, el cual produce hemólisis.

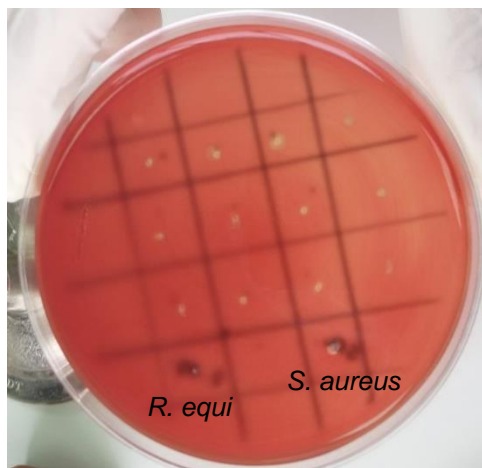


Figura N° 10: Resultados de la prueba de hemólisis.

En la prueba de movilidad, se inoculó la bacteria patógena, *Listeria monocytogenes*, en un tubo que contenía agar SIM, el cual se incubó por 7 días a 25°C. Posterior a su incubación (Ver Figura N° 11) se observó un crecimiento circular, simulando una forma característica en forma de paraguas, confirmando la presencia de *Listeria monocytogenes* de acuerdo a lo que establecido en la literatura.



Figura N° 11: Resultados de la prueba movilidad.

En la prueba CAMP, se utilizaron los microorganismos *Staphylococcus aureus* y *Rhodococcus equi*, los cuáles se inocularon realizando estrías verticales y paralelamente entre sí; luego se sembró horizontalmente y perpendicularmente la cepa de *Listeria monocytogenes*, sin que toquen las estrías verticales. Se incubó a 37 °C por 24 horas, posterior a su incubación, se observó un aumento de hemólisis de *Listeria monocytogenes*, cerca de la estría de *Staphylococcus aureus*, tal como se muestra en la Figura N° 12, confirmando efectivamente que la cepa en estudio es *Listeria monocytogenes*.

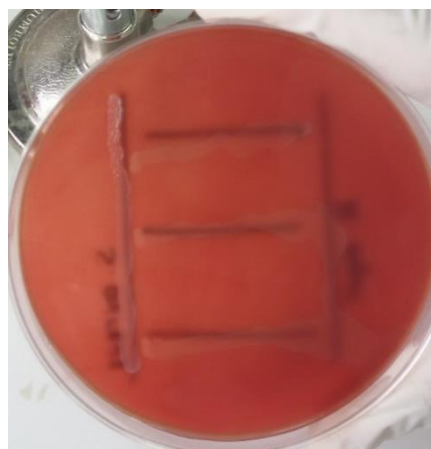


Figura N° 12: Resultados de la prueba CAMP.

Finalmente, se identificó el microorganismo patógeno *Listeria monocytogenes*, utilizando la galería de API® Listeria, el cual es un sistema estandarizado para la identificación de *Listeria*. Se obtuvo un perfil numérico de 4 cifras, el cual, se comparó con la lista de perfiles numéricos (Cuadro N° 7), proporcionado por el catálogo físico API® Listeria; además, se introdujo el perfil numérico obtenido en el software de identificación apiweb™, identificando efectivamente el microorganismo *Listeria monocytogenes*. Los resultados se detallan en el Cuadro N° 5

Cuadro N° 5: Resultado de la prueba API® *Listeria*.

Prueba	Reacciones	Resultados esperados		Resultado obtenido
		Negativo	Positivo	
DIM	Diferenciación <i>L. innocua</i> / <i>L. monocytogenes</i>	<u>ZYM B / < 3 min</u>		Rosa beige (-)
		Naranja pálido Rosa beige Gris beige	Naranja	
ESC	hidrólisis (ESCulina)	Amarillo pálido	Negro	Negro (+)
Aman	α-MANosidasa	Incoloro	Amarillo	Amarillo (+)
DARL	Acidificación (D-ARabitoL)	Rojo/	Amarillo/	Amarillo (+)
XYL	Acidificación (D-Xilosa)	Rojo anaranjado	Amarillo anaranjado	Rojo anaranjado (-)
RHA	Acidificación (RHAmnosa)			Amarillo (+)
MDG	Acidificación (Metil-αD-Glucopiranosido)			Amarillo (+)
RIB	Acidificación (RIBosa)			Rojo anaranjado (-)
G1P	Acidificación (Glucosa-1-Fosfato)			Rojo anaranjado (-)
TAG	Acidificación (TAGatosa)			Rojo anaranjado (-)

Con todo lo anterior realizado, se verificó e identificó que el microorganismo patógeno proporcionado por el laboratorio de CENSALUD es efectivamente *Listeria monocytogenes*, por lo que puede utilizarse para los ensayos de antagonismo microbiano

5.3 Comprobación de la concentración de *B. coagulans* en el suplemento alimenticio. ⁽²⁾

La comprobación de la concentración de *Bacillus coagulans* a partir del suplemento alimenticio se realizó siguiendo el procedimiento del numeral 4.3.4, tomando en cuenta el número de muestras establecido en el Cuadro N° 4. Los resultados obtenidos pueden observarse en la Tabla N° 1

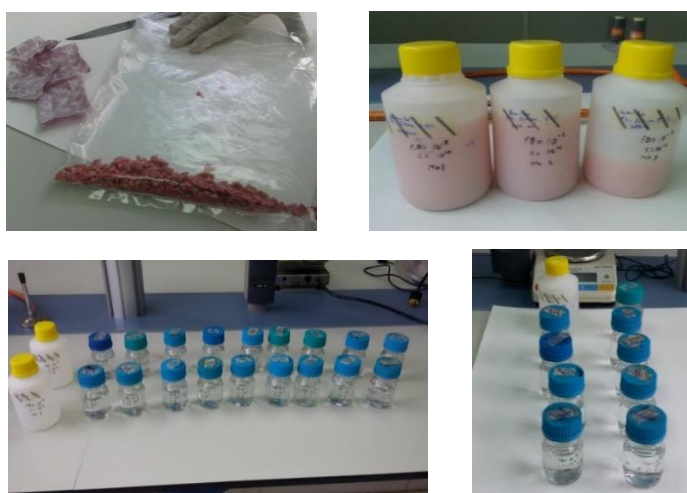


Figura N° 13: Muestras procesadas del suplemento alimenticio comercial.

Tabla N°1: Promedio de resultados de la concentración de *B. coagulans* en el suplemento alimenticio según recuento.

Concentración	N° de colonias	Dilución	Factor de Dilución (FD)	UFC/mL
1.00E+00	2	1.00E-12	1.00E+12	2.00E+12
1.00E+01	1	1.00E-11	1.00E+11	1.00E+11
1.00E+02	1	1.00E-10	1.00E+10	1.00E+10

Los resultados obtenidos demuestran que el suplemento alimenticio, si posee la concentración exponencial que rotula del microorganismo *Bacillus coagulans*, por cada dulce masticable contenido en el suplemento, obteniendo en los recuentos, concentraciones de hasta 2.0×10^{12} UFC/mL. Sin embargo, no se obtuvieron resultados iguales o mayores a 5.0×10^{12} UFC/dulce masticable

5.4 Aislamiento del probiótico *Bacillus coagulans* del suplemento alimenticio comercial.

El procedimiento para aislar el probiótico *Bacillus coagulans* del suplemento alimenticio comercial, se realizó como lo establece el numeral 4.3.5.

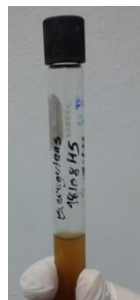


Figura N° 14: Cepa de trabajo, *Bacillus coagulans*.

Del aislamiento se obtuvo una suspensión de *Bacillus coagulans* la cual denominamos “cepa de trabajo” y a partir de la cual se realizaron las subsecuentes estandarizaciones del microorganismo y los posteriores ensayos.

5.5 Pruebas de Identificación del probiótico *Bacillus coagulans*.

5.5.1 Tinción Gram.

El procedimiento para la tinción Gram se desarrolló como lo establece el numeral 4.3.3.1.



Figura N° 15: Resultados del frotis bacteriano y tinción Gram de *B. coagulans*.

Según lo observado en el microscopio, el microorganismo demostró tener una morfología de bacilos largos, gram positivos y asociados en cadenas.

5.5.2 Prueba de Catalasa

La prueba de Catalasa se realizó de acuerdo al procedimiento del numeral 4.3.3.3.



Figura N° 16: Resultados de la prueba catalasa de *Bacillus coagulans*.

El microorganismo encontrado en el suplemento alimenticio demostró mantener un burbujeo abundante al frotar una colonia de la bacteria en una gota de peróxido de hidrógeno al 3%. Por lo que el microorganismo encontrado en el suplemento alimenticio posee la enzima catalasa, es decir se considera como catalasa positivo.

5.5.3 Prueba de Oxidasa.

La prueba de oxidasa se desarrolló como lo establece el numeral 4.3.6.3.

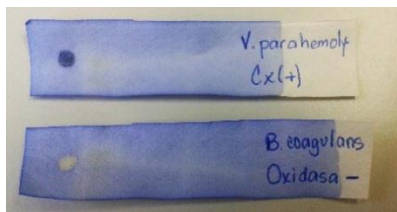


Figura N° 17: Resultados de la prueba de oxidasa.

La inoculación de una colonia del microorganismo encontrado en el suplemento alimenticio, resultó en la decoloración del color púrpura característico de una tira saturada con reactivo de oxidasa. Esto demuestra una reacción negativa, lo que implica que la bacteria no posee la enzima citocromo - c oxidasa, y utiliza otros medios para obtener energía en lugar de oxígeno o bien utiliza otra enzima citocromo para aprovechar el oxígeno en la cadena transportadora de electrones.

Como contraste a la prueba, se utilizó *Vibrio parahaemolyticus* para demostrar la prueba positiva, evidenciada por la formación de un color morado intenso al inocular una colonia en la tira saturada con reactivo de oxidasa.

5.5.4 Prueba de Reducción de Nitratos

Se desarrolló la prueba de reducción de nitratos según el numeral 4.3.6.4.



Figura N° 18: Resultados de la prueba de Reducción de Nitratos.

Los resultados obtenidos demuestran que la reacción presentó una coloración rosa oscuro posterior a la adición de los reactivos NIT 1 y NIT 2 lo que es presuntivo de una reacción negativa, y luego al añadir el reactivo de cinc metálico se observó la formación de un color rojo alrededor de las trazas de cinc, lo que confirma una reacción negativa y la incapacidad del microorganismo de reducir los nitratos a nitritos como fuente de nutrientes.

5.6 Prueba de Antagonismo Microbiano

El ensayo de antagonismo microbiano se realizó en distintos pasos según lo detalla el numeral 4.3.7.

5.6.1 Estandarización de microorganismos por espectrofotometría UV- Vis.



Figura N° 19: Absorbancias del blanco, *Bacillus coagulans* y *Listeria monocytogenes*, respectivamente.

Los valores de la estandarización resultaron ser de 0.329 de absorbancia para *B. coagulans* y de 0.334 para *L. monocytogenes*. Los valores obtenidos de los recuentos bacterianos realizados a dichas estandarizaciones se muestran en la Tabla N° 2.

Tabla N° 2: Valores obtenidos en UFC/mL para los estándares de *B. coagulans* y *L. monocytogenes*.

Microorganismo	Absorbancia	UFC/mL
<i>Bacillus coagulans</i>	0.329	2.0E+08
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.334	5.0E+08

Los resultados obtenidos muestran que se obtuvieron las concentraciones exponenciales esperadas de una estandarización. ⁽⁶⁴⁾

5.6.2 Ensayo preliminar para determinar la concentración real de *Bacillus coagulans* en un disco impregnado con suspensión estandarizada de probiótico.

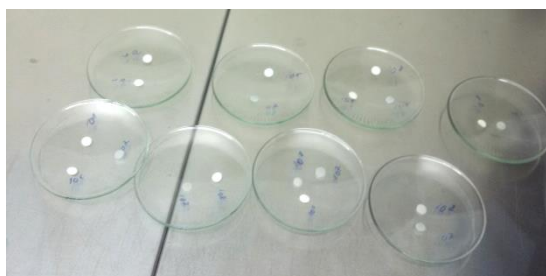


Figura N° 20: Discos impregnados con la suspensión estandarizada de *Bacillus coagulans*.

Al realizar esta prueba, se observó que los discos de papel filtro sólo eran capaces de absorber 10 μ L de suspensión estandarizada de probiótico, debido al escaso grosor del papel filtro. Se procedió con el ensayo y se obtuvieron recuentos con concentraciones exponenciales de 10^8 ; sin embargo, para cumplir con el método propuesto, se repitió la prueba utilizando discos más gruesos. Se comprobó que los discos mayor grosor fueron capaces de absorber 100 μ L de suspensión estandarizada de probiótico. Luego de realizados los recuentos microbianos, los datos obtenidos se muestran en la Tabla N° 3.

Tabla N° 3: Resultados de recuentos microbianos para determinar la concentración de *B. coagulans* en un disco impregnado con suspensión estandarizada de probiótico.

Concentración	Dilución	Factor de Dilución	Número de Colonias	UFC/ mL
10^0	10^{-8}	10^8	9	9.0E+08
10^1	10^{-7}	10^7	15	1.5E+08

Los datos obtenidos para este ensayo preliminar, muestran que los discos de papel filtro, son capaces de absorber la concentración exponencial estandarizada

de microorganismo inoculada en ellos, bajo las condiciones del ensayo. Estos resultados demuestran que los discos de mayor grosor impregnados con microorganismo, pueden ser utilizados para la prueba de antagonismo microbiano.

5.6.3 Ensayo de antagonismo microbiano usando la técnica de Difusión en Agar por medio de Discos y Pozos.

Los halos de inhibición obtenidos, tanto del probiótico como de los patrones, fueron medidos con pie de rey y la capacidad de inhibición del patógeno se comparó con las medidas de referencia para los quimioterapéuticos antimicrobianos establecidas por Kirby-Bauer para determinar sensibilidad.

Adicionalmente, se realizó una comparación porcentual de las zonas de inhibición obtenidas para cada concentración ensayada de probiótico, con las obtenidas de los patrones. Este paso se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{DBC}}{\text{DA}} \times 100$$

Donde:

% Inhibición = Porcentaje de Inhibición

DBC = Diámetro de zona de inhibición de concentración de *B. coagulans* en milímetros.

DA = Diámetro de zona de inhibición de antibiótico en milímetros.

Se realizó la prueba como lo establece el numeral 4.3.7.3; sin embargo, no se observaron halos de inhibición ni en los ensayos con pocillos ni en los ensayos con discos impregnados, por lo que se procedió a repetir la prueba, esta vez repitiendo el procedimiento tanto en agar Mueller Hinton como en agar MRS y en condiciones de aerobiosis. Adicionalmente, se sembraron blancos de las

diferentes concentraciones de *Bacillus coagulans* y de *Listeria monocytogenes* en ambos medios de cultivo para evaluar su crecimiento.

Los resultados muestran que *Listeria monocytogenes* es capaz de crecer en agar MRS a concentraciones de 10^8 , pero no así a concentraciones de 10^3 . (Ver Anexo N° 16). Por lo que se descartan todos los ensayos de antagonismo realizados en agar MRS de la última concentración mencionada.

Los resultados obtenidos de la prueba de antagonismo microbiano, utilizando discos impregnados con probiótico se muestran en las Tabla N° 4 y N° 5.

Tabla N° 4: Resultados de prueba de antagonismo para discos impregnados con *Bacillus coagulans* de concentración 2.0×10^8 UFC/mL en agar Mueller Hinton

Halo de inhibición de <i>B. coagulans</i>	Halo de inhibición de antibióticos		Valores de referencia según Kirby-Bauer			% Inhibición de <i>B. coagulans</i> vs antibióticos.
			R	I	S	
11 mm	PG	28mm	≤20mm	21-28mm	≥29mm	39.29
	AMP	25mm	≤11mm	12-13mm	≥14mm	44.0
	TZX	25mm	≤14mm	15-18mm	≥19mm	44.0

El ensayo con discos impregnados de suspensión estandarizada de probiótico solo demostró la formación de halo para las concentraciones de *Listeria monocytogenes* de 5.0×10^8 UFC/mL cuando la concentración del disco impregnado con probiótico fue de 2.0×10^8 UFC/mL habiendo realizado el ensayo en agar Mueller-Hinton. El halo de inhibición obtenido por difusión de *Bacillus coagulans* fue de 11 mm de diámetro. El diámetro del halo de inhibición del probiótico se comparó con los valores de referencia de sensibilidad según Kirby-Bauer. En este caso se observa que *Listeria monocytogenes* es resistente a la acción de *Bacillus coagulans* al comparar el halo de inhibición obtenido, con los valores de referencia para Penicilina G, Ampicilina y Trimetoprim-Sulfametoxazol. Al comparar de manera porcentual el diámetro del halo de inhibición del probiótico, con los diámetros de los halos obtenidos por los

antibióticos utilizados como patrón, se encontró que el *Bacillus coagulans* solo es capaz de inhibir un 39.29% de lo que inhibe la Penicilina G. Para el caso de Ampicilina y Trimetoprim-Sulfametoxazol el probiótico solo es capaz de inhibir un 44.0% de lo que estos antibióticos son capaces de inhibir.

Tabla N° 5: Resultados de prueba de antagonismo para discos impregnados con *Bacillus coagulans* de concentración 2.0×10^8 UFC/mL en agar MRS

Halo de inhibición de <i>B. coagulans</i>	Halo de inhibición de antibióticos		Valores de referencia según Kirby-Bauer			% Inhibición de <i>B. coagulans</i> vs antibióticos.
			R	I	S	
14 mm	PG	28mm	≤20mm	21-28mm	≥29mm	50.0
	AMP	25mm	≤11mm	12-13mm	≥14mm	56.0
	TZX	25mm	≤14mm	15-18mm	≥19mm	56.0

El ensayo con discos impregnados de suspensión estandarizada de probiótico solo demostró la formación de halo para las concentraciones de *Listeria monocytogenes* de 5.0×10^8 UFC/mL cuando la concentración del disco impregnado con probiótico fue de 2.0×10^8 UFC/mL habiendo realizado el ensayo en agar MRS. El halo de inhibición obtenido por difusión de *Bacillus coagulans* fue de 14 mm de diámetro. El diámetro del halo de inhibición del probiótico se comparó con los valores de referencia de sensibilidad según Kirby-Bauer. En este caso se observa que *Listeria monocytogenes* es resistente a la acción de *Bacillus coagulans* al comparar el halo de inhibición obtenido, con los valores de referencia para Penicilina G y Trimetoprim-Sulfametoxazol; pero de sensibilidad Intermedia al compararlo con el valor de referencia para Ampicilina. Al comparar de manera porcentual el diámetro del halo de inhibición del probiótico, con los diámetros de los halos obtenidos por los antibióticos utilizados como patrón, se encontró que el *Bacillus coagulans* solo es capaz de inhibir un 50.00% de lo que inhibe la Penicilina G. Para el caso de Ampicilina y Trimetoprim-Sulfametoxazol el probiótico solo es capaz de inhibir un 56.0% de lo que estos antibióticos son capaces de inhibir.

Los discos de concentraciones 2.0×10^7 UFC/mL y 2.0×10^6 UFC/mL impregnados con *Bacillus coagulans* no desarrollaron halos de inhibición en ningún medio de cultivo.

En el ensayo de antagonismo microbiano por la técnica de difusión en pozos, se observó la formación de halos solamente en los pozos que se encuentran en agar MRS a concentraciones de 2.0×10^8 UFC/mL y 2.0×10^7 UFC/mL de *Bacillus coagulans* cuando la concentración de *Listeria monocytogenes* es de 5.0×10^8 UFC/mL. Estos resultados pueden observarse en la Tabla N° 6 y la Tabla N° 7:

Tabla N° 6: Resultados de prueba de antagonismo por difusión en pozos a concentración 2.0×10^8 UFC/mL de *Bacillus coagulans* en agar MRS.

Halo de inhibición de <i>B. coagulans</i> en	Halo de inhibición de antibióticos		Valores de referencia según Kirby-Bauer			% Inhibición de <i>B. coagulans</i> vs antibióticos.
			R	I	S	
16 mm	PG	28mm	≤20mm	21-28mm	≥29mm	57.0
	AMP	25mm	≤11mm	12-13mm	≥14mm	64.0
	TZX	25mm	≤14mm	15-18mm	≥19mm	64.0

El ensayo por la técnica de difusión en pozos inoculados con suspensión estandarizada de probiótico, demostró la formación de halo para las concentraciones de *Listeria monocytogenes* de 5.0×10^8 UFC/mL cuando la concentración del disco impregnado con probiótico fue de 2.0×10^8 UFC/mL habiendo realizado el ensayo en agar MRS. El halo de inhibición obtenido por difusión de *Bacillus coagulans* fue de 16 mm de diámetro. El diámetro del halo de inhibición del probiótico se comparó con los valores de referencia de sensibilidad según Kirby-Bauer. En este caso se observa que *Listeria monocytogenes* es resistente a la acción de *Bacillus coagulans* al comparar el halo de inhibición obtenido, con los valores de referencia para Penicilina G, sin embargo posee sensibilidad intermedia al compararlo con los valores de

referencia para Ampicilina y Trimetoprim-Sulfametoxazol. Al comparar de manera porcentual el diámetro del halo de inhibición del probiótico, con los diámetros de los halos obtenidos por los antibióticos utilizados como patrón, se encontró que el *Bacillus coagulans* solo es capaz de inhibir un 57.00% de lo que inhibe la Penicilina G. Para el caso de Ampicilina y Trimetoprim-Sulfametoxazol el probiótico solo es capaz de inhibir un 64.0% de lo que estos antibióticos son capaces de inhibir.

Tabla N° 7: Resultados de prueba de antagonismo por difusión en pozos a concentración 2.0×10^7 UFC/mL de *Bacillus coagulans* en agar MRS.

Halo de inhibición de <i>B. coagulans</i> en	Halo de inhibición de antibióticos		Valores de referencia según Kirby-Bauer			% Inhibición de <i>B. coagulans</i> vs antibióticos.
			R	I	S	
14 mm	PG	28mm	≤20mm	21-28mm	≥29mm	50.0
	AMP	25mm	≤11mm	12-13mm	≥14mm	56.0
	TZX	25mm	≤14mm	15-18mm	≥19mm	56.0

El ensayo por la técnica de difusión en pozos inoculados con suspensión estandarizada de probiótico, demostró la formación de halo para las concentraciones de *Listeria monocytogenes* de 5.0×10^8 UFC/mL cuando la concentración del disco impregnado con probiótico fue de 2.0×10^8 UFC/mL habiendo realizado el ensayo en agar MRS. El halo de inhibición obtenido por difusión de *Bacillus coagulans* fue de 16 mm de diámetro. El diámetro del halo de inhibición del probiótico se comparó con los valores de referencia de sensibilidad según Kirby-Bauer. En este caso se observa que *Listeria monocytogenes* es resistente a la acción de *Bacillus coagulans* al comparar el halo de inhibición obtenido, con los valores de referencia para Penicilina G y Trimetoprim-Sulfametoxazol; pero de sensibilidad Intermedia al compararlo con el valor de referencia para Ampicilina. Al comparar de manera porcentual el diámetro del halo de inhibición del probiótico, con los diámetros de los halos obtenidos por los antibióticos utilizados como patrón, se encontró que el *Bacillus*

coagulans solo es capaz de inhibir un 50.00% de lo que inhibe la Penicilina G. Para el caso de Ampicilina y Trimetoprim-Sulfametoxazol el probiótico solo es capaz de inhibir un 56.0% de lo que estos antibióticos son capaces de inhibir.

Los cálculos de las comparaciones porcentuales entre los halos de inhibición de *Bacillus coagulans* y los halos de inhibición de los antibióticos utilizados como patrón, pueden encontrarse en el Anexo N° 19.

5.7 Evaluación del *Bacillus coagulans* frente a la resistencia contra el pH ácido del estómago y a sales biliares.

Para determinar si el probiótico, *Bacillus coagulans*, contenido en el suplemento alimenticio, cumple con los requisitos establecidos por la OMS/FAO ⁽⁵²⁾ para ser considerado probiótico se realizó el procedimiento de la metodología detallado en el numeral 4.3.8.

El porcentaje de sobrevivencia de las células se determinó mediante la fórmula detallada a continuación:

$$\% = \frac{\text{LogUFCN1}}{\text{LogUFCBo}} \times 100$$

Donde:

% = Porcentaje de supervivencia.

N1 = Total de unidades formadoras de colonias obtenidas en el recuento después de la incubación en agar MRS.

Bo = Número inicial de probióticos inoculados. (Blanco)

En la Tabla N° 8, se detalla los resultados promedios de evaluación del *Bacillus coagulans* frente a la resistencia contra el pH ácido del estómago y a sales biliares. Se describe el conteo de UFC/mL de probióticos del blanco y luego de haber estado en contacto en un medio de pH ácido (pH=2.0) (sistema A) y con sales biliares 0.3% (sistema B), en tiempo inicial (t=0h) y tiempo final (t=2h). Se

utilizó el dato promedio de las UFC/mL de cada sistema y del blanco, para calcular el porcentaje de supervivencia del probiótico en las barreras biológicas.

Tabla N° 8: Conteo de UFC/mL de probióticos del blanco, sistema A (pH ácido) y Sistema B (sales biliares).

	Blanco		Sistema "A" HCl pH=2.0		Sistema "B" Sales biliares 0.3%	
	UFC/mL t=0h (Bo)	UFC/mL t=2h (Bo)	UFC/mL t=0h (N1)	UFC/mL t=2h (N1)	UFC/mL t=0h (N1)	UFC/mL t=2h (N1)
	6.60E+03	1.04E+04	1.20E+03	3.70E+03	6.00E+02	8.00E+02
	8.70E+03	1.06E+04	3.70E+03	1.70E+03	3.00E+02	9.00E+02
	-	-	2.70E+03	2.60E+03	9.00E+02	2.10E+03
	-	-	2.00E+03	1.30E+03	6.00E+02	2.10E+03
Promedio UFC/mL	7.65E+03	1.05E+04	2.40E+03	2.33E+03	6.00E+02	1.48E+03

La Tabla N° 8 indica que el resultado del blanco (Bo) fue de 7.65E+03 UFC/mL para t=0h, y de 1.05E+04 UFC/mL para t=2h, es decir el número inicial de probióticos, para cada tiempo. También indica las UFC/mL del probiótico luego de someterse a los dos factores de estrés (N1), resultando 2.40E+03 UFC/mL para t=0h, y de 2.33E+03 UFC/mL para t=2h, luego de estar en contacto en un medio de pH 2.0. Se obtuvieron resultados de 6.00E+02 UFC/ml para t=0h, y de 1.48E+03 UFC/mL para t=2h, luego de estar en contacto con las sales biliares 0.3%.

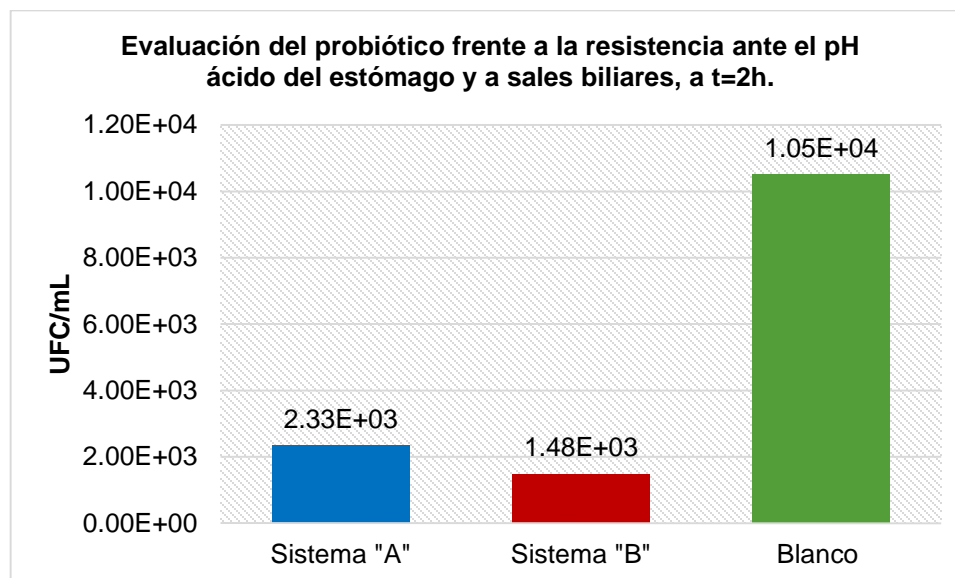


Figura N° 21: Evaluación del *Bacillus coagulans* frente a la resistencia ante el pH ácido del estómago y a sales biliares, a t=2h.

En la Figura N° 21, se visualiza la diferencia entre la reducción de las UFC/mL en cada sistema, luego de haberse sometido por dos horas a las condiciones de estrés. Siendo el rectángulo verde, el blanco de comparación, el cual tiene una concentración inicial de 1.05E+04 UFC/mL. Al comparar los resultados con las UFC/mL de los sistemas "A" y "B", se observa una disminución de la concentración del probiótico, debido a las condiciones de estrés al que se ve sometido el microorganismo *Bacillus coagulans*, simulando las barreras biológicas del organismo. Sin embargo, la disminución observada no es significativa, ya que ambas condiciones de estrés sólo redujeron en un logaritmo la concentración inicial del probiótico en el medio de cultivo.

En la Tabla N° 9, se describen los resultados del porcentaje de supervivencia del *Bacillus coagulans* frente a la resistencia ante el pH ácido del estómago y a sales biliares.

Tabla N° 9: Resultados del porcentaje de supervivencia del *Bacillus coagulans* frente a la resistencia ante el pH ácido del estómago y a sales biliares.

Blanco		Sistema "A" HCl pH 2.0				Sistema "B" Sales biliares 0.3%			
UFC/mL t=0h (Bo)	UFC/mL t=2h (Bo)	UFC/mL t=0h (N1)	%	UFC/mL t=2h (N1)	%	UFC/mL t=0h (N1)	%	UFC/mL t=2h (N1)	%
7.65E+03	1.05E+04	2.40E+03	87.04	2.33E+03	83.72	6.00E+02	71.53	1.48E+03	78.80

Al comparar los valores del tiempo inicial del blanco con los valores del tiempo inicial del sistema "A", se observa una reducción menor a un logaritmo de concentración, obteniendo un 87.04% de recuperación del microorganismo en condiciones de pH 2.0, con respecto al blanco.

En el sistema "A", se observa una reducción en el porcentaje de supervivencia en tiempo final (83.72%) con respecto al tiempo inicial (87.04%); después de dos horas de incubación en condiciones de pH 2.0. Al comparar el valor final de la concentración del sistema "A" con el valor final de la concentración en el blanco se observa una reducción de un logaritmo, obteniendo un 83.72% de recuperación del microorganismo en condiciones de pH 2.0.

En el sistema "B", se observa una reducción de un logaritmo de concentración, al comparar los valores iniciales obtenidos para 0.3% de sales biliares, con los valores iniciales del blanco, obteniendo un 71.53% de recuperación del microorganismo probiótico.

Se observa un aumento en el porcentaje de supervivencia en tiempo final (78.80%) con respecto al tiempo inicial (71.53%); después de dos horas de incubación en condiciones de 0.3% de sales biliares. Al comparar el valor final de la concentración del sistema "B" con el valor final de la concentración en el blanco, se mantiene una reducción de un logaritmo a pesar del incremento en la concentración del blanco luego de dos horas de incubación, obteniendo un 78.80% de recuperación del microorganismo en condiciones de 0.3% de sales

biliares. Estos resultados demuestran que el probiótico *Bacillus coagulans* es capaz de crecer en presencia de sales biliares, lo que concuerda con el incremento en el porcentaje de supervivencia obtenido. (Ver cálculos en Anexo N° 23)

Los ensayos realizados, comprueban que el suplemento alimenticio, contiene efectivamente *Bacillus coagulans*, a una concentración de 2.0×10^{12} UFC/unidad masticable, presenta actividad contra *Listeria monocytogenes* y es capaz de resistir adecuadamente la acción del ácido gástrico y de las sales biliares.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. El suplemento alimenticio seleccionado rotula 5×10^{12} UFC de *Bacillus coagulans* por unidad masticable; sin embargo, se analizó la concentración de este suplemento mediante la técnica de recuento en placa, y aunque el coeficiente obtenido demuestra que hay una menor cantidad de *Bacillus coagulans* (2.0×10^{12} UFC por unidad masticable), la concentración exponencial se mantiene, siendo suficiente para que el probiótico realice su efecto benéfico en el organismo.
2. El microorganismo aislado del suplemento alimenticio comercial, resultó ser efectivamente *Bacillus coagulans*, de acuerdo a las pruebas de identificación.
3. Los valores obtenidos en UFC/mL para los estándares de *Bacillus coagulans* y *Listeria monocytogenes*, demostraron cumplir con los valores esperados de acuerdo a la literatura,⁽⁶⁴⁾ ya que se obtuvieron entre $1-3 \times 10^8$ UFC/mL para *Bacillus coagulans*. Sin embargo, se obtuvo un valor de 5×10^8 UFC/mL para *Listeria monocytogenes*, lo que supera los valores esperados, pero mantiene la concentración exponencial necesaria para desempeñar el ensayo de antagonismo microbiano.
4. El microorganismo *Bacillus coagulans* demostró ser capaz de formar halos de inhibición contra la bacteria patógena *Listeria monocytogenes*, a concentraciones específicas de 10^8 UFC/mL o superiores y en condiciones específicas.
5. El microorganismo *Listeria monocytogenes* presenta resistencia o sensibilidad intermedia ante la acción de *Bacillus coagulans*, y puede

utilizarse como tratamiento profiláctico ante una infección por *Listeria* en personas inmunocomprometidas.

6. Al comparar los resultados de inhibición obtenidos a partir del ensayo de antagonismo, con los resultados obtenidos de los patrones hechos con discos de antibióticos, se deduce que el probiótico tiene una capacidad inhibitoria entre 39.29% y 64.0% de la que poseen los antibióticos utilizados como tratamiento de elección, siempre y cuando se cumplan con las condiciones ambientales que favorezcan el crecimiento de *Bacillus coagulans*.
7. La evaluación del *Bacillus coagulans* frente al pH ácido del estómago y las sales biliares, demostró tener un buen porcentaje de supervivencia ante dichas barreras biológicas, siendo del 83.72% y de 78.80%, respectivamente. De acuerdo con estos resultados, el microorganismo evaluado, es considerado como probiótico, según las directrices de evaluación de la FAO/OMS.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Proponer a las autoridades correspondientes de la Universidad de El Salvador que provean los insumos necesarios al laboratorio de control de calidad microbiológico del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), para la identificación de microorganismos no comunes y probióticos.
2. Realizar ensayos con diferentes medios de cultivo sólido (agar), que permitan el desarrollo óptimo de los ensayos de antagonismo microbiano entre *Listeria monocytogenes* y *Bacillus coagulans* para futuras investigaciones.
3. Adquirir un tipo de papel filtro que posea el grosor adecuado, capaz absorber 100 μ L de una suspensión estandarizada de probiótico, para realizar los ensayos de antagonismo microbiano mediante la técnica de Difusión en Agar por medio de Discos.
4. Utilizar sales biliares de extracción reciente, para garantizar un resultado más exacto en el ensayo de resistencia de *Bacillus coagulans* a la acción de las sales biliares.
5. Evaluar el efecto *Bacillus coagulans* sobre la cinética de muerte de *Listeria monocytogenes*, para futuras investigaciones.
6. Realizar ensayos de antibiogramas de muestras bacteriológicas de pacientes inmunocomprometidos con síntomas de infección para determinar si efectivamente ésta es causada por *Listeria monocytogenes*, para que la

autoridad de salud correspondiente, provea un diagnóstico real a los infectados y lleve un mejor control estadístico de esta infección.

7. Promover el consumo de suplementos alimenticios que contengan el probiótico *Bacillus coagulans*, mediante la autoridad de salud correspondiente; de manera regular, para que pueda encontrarse en concentraciones óptimas en el sistema gastrointestinal de pacientes inmunocomprometidos, y le permita realizar su mecanismo de inhibición contra bacterias patógenas, como *Listeria monocytogenes*.

BIBLIOGRAFIA

1. Aguirre, M y Collins M.D. (1993) Lactic acid bacteria and human clinical infection. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(2), 95-107
2. Andrew, W.; Hammack, T. Bacteriological Analytical Manual Chapter 1: Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate, section G: Blending and diluting of samples requiring enumeration of microorganisms. [En línea] [Accedido el 20 de mayo de 2015] Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063335.htm>
3. Arribas, M.B. (2009) Probióticos: una estrategia en la modulación del sistema inmune. Tesis de Doctorado no publicada, Universidad de Granada, Facultad de Farmacia, Departamento de Farmacología, España.
4. Arteaga, H.Y. y De León, F.M. (2014) Formulación de un alimento para nutrición infantil libre de lactosa a base de caseína con mezcla de probióticos *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus acidophilus* y su efecto sobre la cinética de muerte de *Escherichia coli*, cepa hospitalaria. Tesis de Licenciatura, Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia, El Salvador.
5. Bernet, M., Brassart, D., Neeser, J. and Servin, A. (1993). Adhesion of Human Bifidobacterial Strains to Cultured Human Intestinal Epithelial Cells and Inhibition of Enteropathogen Cell Interactions. *Applied and Environmental Microbiology*. 59: 4121 –4128.

6. Breed, R.S.; Murray, E.G.; Smith, N.R. (1957) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*; Seventh Edition, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, United States of America.
7. Brooks, G.F.; Carrol, K.C.; Butel, J.S.; Morse, S.A.; Mietzner, T.A. (2010) *Microbiología médica*; 25a. edición, McGraw Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V.; México D. F.
8. Bruno, Z. y Suárez, M. *Listeria y Listeriosis*. Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria. [On line] [Consultado: 10 de febrero de 2015] Disponible en: <http://www.colvema.org/PDF/5667Listeria.pdf>
9. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). (Última vez modificado: 25 de septiembre de 2014.) Listeriosis y el embarazo. [On line] [Consultado: 9 de marzo de 2015]. <http://www.cdc.gov/pregnancy/Spanish/infections-Listeria.html>
10. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). (Última vez modificado: 27 de agosto de 2014.) *Listeria* (listeriosis). [On line] [Consultado: 9 de marzo de 2015] <http://www.cdc.gov/listeria/statistics.html>
11. Cervantes, J.M. (2013). Antagonismo microbiano como alternativa para controlar el desarrollo de *Salmonella entérica* y *Escherichia coli O157* en germinados de alfalfa. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro.
12. Cisternas, A.; Lagos, N.; Galstuch, J.; González C.; García, C. y Díaz J. (2002) Infección por *Listeria monocytogenes* y embarazo con buen resultado perinatal. *Revista Chilena Obstetricia y Ginecología*, 67(3), 237-241

13. Cueto-Vigil, M.C.; Acuña-Monsalve, Y. y Valenzuela-Riaño, J. (2010). Evaluación in vitro del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño. *Actualidades biológicas*, 32 (93), 129-138.
14. De Vecci, E. y Drago, L. (2006). *Lactobacillus sporogenes* or *Bacillus coagulans*: misidentification or mislabeling? *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 1(1), 3-10.
15. Endress, J.R.; Clewell, A.; Jade, K.A.; Farber, T.; Hauswirth, J.; Shauss, A.G. (2009). Safety Assessment of a proprietary preparation of a novel Probiotic, *Bacillus coagulans*, as a food ingredient.
16. Estrada, A.C.; Gutiérrez, L.A. y Montoya, O.I. (2005). Evaluación in vitro del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus sp.* Contra *Salmonella sp.* y *Escherichia coli*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín*, 58 (1), p.2601-2609.
17. Farber, J. M. y Peterkin P. I. (1991) *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. *Microbiological Reviews*. American Society for Microbiology. 55(3), 476-483.
18. Food and Agriculture Organization (FAO). Repositorio de Documentos Corporativos. Manual de capacitación sobre cultivo de *Gracilaria* y procesamiento de algas en China. Capítulo III: Propiedades, fabricación y aplicación de los polisacáridos de algas agar, carragenina y alginato. [En línea] [Accedido el 20 de mayo de 2015] Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB730E/AB730E03.htm> Revisado el 25/05/2015

19. Food and Drug Administration (FDA). (Última vez modificado: 07/02/2014) Seguridad alimentaria para futuras mamás: Durante el embarazo Listeria [On line] [Consultado: 9 de marzo de 2015] <http://www.fda.gov/Food/ResourcesForYou/HealthEducators/ucm083476.htm>
20. Food and Drug Administration (FDA). (Última vez modificado:06/04/2015) Generally Recognized as Safe (GRAS) [En línea] [Consultado: 23 de Junio de 2015] <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/>
21. Food and Drug Administration (FDA). (2012). Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Second Edition. Gram-Positive Bacteria: *Listeria monocytogenes*. [On line] Consultado: 12/04/2015 <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM297627.pdf>
22. Food and Drug Administration (FDA). Generally Recognized As Safe (GRAS): *Bacillus coagulans*. (Última actualización: 12/02/2014) [En línea]. [Consultado: 14/04/2015]. Disponible en: <http://www.fda.gov/food/ingredientpackaginglabeling/gras/noticeinventory/ucm314145.htm>
23. Fuller, R. (1994) History and development of probiotics. Christian Hansen, Denmark.
24. Garza, R.; Silva, T. y Hernández, L. La listeriosis humana y el ciclo infeccioso asociado a su agente etiológico. Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Alberto Masferrer. [On line]. [Consultado: 10 de febrero de 2015] Disponible: <http://depa.fquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/ART%20CDC-Listeria.pdf>

25. Gutiérrez, I.; Barber, M.; Cabrera, F.; Valle, L. y García, J. (2007) Infección perinatal por *Listeria monocytogenes* durante el embarazo y el parto. *Progresos de Obstetricia y Ginecología*, 50 (8), 457-466.
26. Himedia Labs (2011) Lactobacillus MRS Agar [En línea]. [Accedido el 24 de mayo de 2015]. Disponible en: <http://himedialabs.com/TD/M641.pdf>
27. Himedia Labs (2011) Soybean Casein Digest Agar (Tryptone Soy Agar) [En línea]. [Accedido el 4 de junio de 2015]. Disponible en: <http://himedialabs.com/TD/M290.pdf>
28. Himedia Labs (2015, mayo 2015) Mueller Hinton Agar [En línea]. Disponible en: <http://himedialabs.com/TD/M173.pdf>
29. Himedia Labs. Yeast Extract Powder [En línea]. [Accedido el 4 de junio de 2015]. Disponible en: <http://himedialabs.com/TD/RM027.pdf>
30. Hitchins, A. y Jinneman, K. (2011) BAM: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. Bacteriological Analytical Manual Chapter 10. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. [On line] [Consultado: 7 de marzo de 2015] <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071400.htm>
31. Hoover, D. (1993) Bifidobacteria: activity and potential benefits. *Food Technology*. 47 (6): 120-124

32. Hyronimus, B.; Le Marrec C. y Urdaci, M. C. (1997). Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I4. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 42-50.
33. Hyronimus, B.; Le Marrec, C.; Sassi, A. y Deschamps, A. (2000). Acid and Bile tolerance of Sporeforming Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 61, 193-197.
34. Isenberg HD, editor. (2004) *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. American Society for Microbiology. Páginas: 3.3.2 – 3.3.2.13
35. Jawetz, M. y Adelberg (2011) *Microbiología Médica*. 25ª Edición. McGraw-Hill Interamericana Editores. México. Páginas: 180,181.
36. Kirby W. M.; Bauer, A. W.; Sherris, J. C. y Turck, M. (1966) Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45, 493 – 496.
37. Koneman, E.W.; Allén, S.D.; Janda, W.M.; Schreckenberger, P.C. y Winn, W.C. (1999) *Diagnóstico Microbiológico*. (5a Ed.) Buenos Aires, Argentina:Editorial Médica Panamericana. p. 85 - 87,177-179, 186, 189-190, 590-591, 647, 1265-1266, 1269.
38. Le Marrec, C.; Hyronimus, B.; Bressollier, P.; Verneuil, B. y Urdaci, M. (2000) Biochemical and Genetic Characterization of Coagulin, a New Antilisterial Bacteriocin in the Pediocin Family of Bacteriocins, Produced by *Bacillus coagulans* I4. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5213-5220.

39. MacFaddin JF, editor. (2000) Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Philadelphia:Lippincott Williams and Wilkins. Páginas: 363-367
40. Mahdhi, A.; Kamoun, F. y Bakhrouf, A. (2009). Inhibitory activity and adhesive ability of potential probiotic Bacillus species to confer protection for Artemia gnotobiotic culture against pathogenic *Vibrio spp.* *Tubitak*, 35(4), 227-233
41. Maldonado, E.J. (2013). Determinación del efecto de *Lactobacillus acidophilus* con potencial probiótico sobre la bacteria patógena: *Salmonella typhimurium* y su tiempo de sobrevivencia a los ácidos biliares y pH ácido del estómago. Tesis de Licenciatura, Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia, El Salvador.
42. Manual BioMérieux. (2010). api ® Listeria. Francia.
43. Manual de Procedimientos de Control de Calidad. Páginas: 16-17 [En línea] [Consultado: 24 de Junio de 2015] http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/gss/publications/documents/Argentina-Level1/ManualProcedimientos_controldeCalidad_2001.pdf
44. Martin, A. D. (2002) Capacidad antagonista frente a *Listeria monocytogenes* de dos sustancias tipo bacteriocina utilizadas en combinación con NaCl y CO₂. Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
45. MediaUHM-Google Sites. Catalasa. [On line] [Consultado el 3 de marzo de 2015] <https://sites.google.com/a/goumh.umh.es/practicas-demicrobiologia/indice/identificacion-bacteriana/catalasa>

46. Merck Merck Millipore (2015, Junio 4), Brain Heart Broth. [En Línea]. Disponible: https://www.merckmillipore.com/GT/en/product/Brain-heart-broth,MDA_CHEM-1104930500#anchor_TI
47. Merck Microbiology Manual. SIM Medium. (12a. Ed.) [En línea] [Consultado: 19/06/2015] Disponible en: http://www.merckmillipore.com/GT/es/product/brazil/chemicals/meio-de-cultura-sim,MDA_CHEM-105470#anchor_TI
48. Merck Millipore (2009, Enero 20). Agar Base (sangre) [En Línea] . Disponible: http://www.merckmillipore.com/GT/en/product/Blood-agar-%28base%29,MDA_CHEM-110886#anchor_TI
49. Muriana, P. y Kushwaha, K. Food Pathogens of Concern: Listeria monocytogenes. Oklahoma State University [On line] Consultado: 12/04/2015 <http://pods.dasnr.okstate.edu/docushare/dsweb/Get/Document-2980/FAPC-136web.pdf>
50. Neogen Corporation. (2010). Ficha técnica – Lactobacilli MRS Broth [En línea] [Accedido 18 de junio de 2015] Disponible en: http://www.neogen.com/Acumentia/pdf/ProdInfo/7406_P1.pdf
51. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2004) Evaluación de riesgos de Listeria monocytogenes en alimentos listos para el consumo. Roma: Italia. p.5 [On line] [Consultado: 8 de Marzo de 2015] <http://www.fao.org/3/a-y5393s.pdf>
52. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/ Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS). (2006). Probióticos en los alimentos: Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Informe del Grupo de Trabajo Conjunto FAO/OMS; Estudios FAO alimentación y nutrición.

53. Oteo, J. y Alós, J. Listeria y Listeriosis. Servicio de Microbiología. Hospital de Móstoles. Móstoles. Madrid: Control Calidad SEIMC. [On line] [Accedido el 8 de febrero de 2015] Disponible: <http://www.seimc.org/control/revisiones/bacteriologia/listeria.pdf>
54. Pérez, N.L. y Sigaran, P.M. (2012) Determinación de la resistencia en cepas de *Listeria monocytogenes* aislada a partir de muestras de espinaca *Spinacea oleracea* utilizando germicidas para la desinfección de alimentos. Tesis de Licenciatura, Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia, El Salvador.
55. Ray B., Bhunia A. (2010) Fundamentos de microbiología de los alimentos. Cuarta Edición. McGraw-Hill Interamericana Editores. México. Páginas: 206-210.
56. Rossi, L.; Paiva, A.; Tornese, M.; Chianelli, S. y Troncoso, A. (2008) Brotes de infección por *Listeria monocytogenes*: Una revisión de las vías que llevan a su aparición. Universidad de Buenos Aires, Argentina Facultad de Medicina, Escuela de Nutrición Cátedra de Microbiología y Parasitología 25 (5): 330. [On line] Consultado: 12/04/2015 <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v25n5/art02.pdf>
57. Roy, D. (2005). Technological Aspects Related to the Use of Bifidobacteria in Dairy Products. *Le Lait* 85: 39 - 56.
58. Sanders, M. E.; Morelli, L.; Tompkins, T. A. (2003). "Sporeformers as Human Probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevi-bacillus*". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2 (3):101

59. Schöbitz, R.; Ciampi, L. y Nahuelquin, Y. (2009). *Listeria monocytogenes* un peligro latente para la Industria Alimentaria. Universidad Austral de Chile. *Agro Sur*, 37(1), 1-2.
60. Thermo Fisher Scientific Inc. (2001-2015). Ficha Técnica de Agar PALCAM Base [En línea] Consultado: 4/06/2015. Disponible en: http://www.oxoid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0877&org=91&c=uk&lang=en revisado el 25/05/2015.
61. Torres, K.; Sierra, S.; Poutou, R.; Carrascal, A. y Mercado, M. (2005) Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente. *Revista MVZ Córdoba*, 10(1) [On line] [Consultado: 10 de febrero de 2015] Disponible: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S012202682005000100003&script=sci_arttext
62. United States Pharmacopeial Convention (2011) United States Pharmacopeial USP 34 - National Formulary NF24. <81>, <1117>
63. Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de Microbiología y Parasitología (Última revisión 6 febrero 2014) Glosario. (Consultado: 23/06/2015) <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/glosario.html#letral>
64. Vargas, R.; Alcántara, A.; Rodríguez, E. (2001). Valoración de desinfectantes. Método de dilución-neutralización. *Higiene y Sanidad Ambiental*, 1:1-5.
65. Vaseeharan, B. y Ramasamy, P. (2003). Control of pathogenic *Vibrio* spp. By *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology*, 36, 83–87.

66. Vásquez, J.A.; Kuhn, M.; Berche, P.; Chakraborty, T.; Domínguez, G.; Goebel, V.; González, B. (2001) *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, American Society for Microbiology. 14(3). 585-586.
67. Venema, G; Chikindas, M.L.; García, M. J.; Driessen, A.J.; Ledebøer, A. M.; Nissen, J.; Nes, I.F.; Abee, T. y Kornings W.N. (1993). Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (11), 3577.

GLOSARIO (4) (18) (31) (62)

- **Anaerobios facultativos:** microorganismos que no requieren de oxígeno, pero puede crecer en condiciones microaeróbicas o anaeróbicas.
- **Bacterias ácido lácticas:** Microorganismos productores de ácido láctico como producto final de su metabolismo.
- **Bacteriocinas:** son péptidos biológicamente activos que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de otros miembros de la misma especie productora o miembros de distintos géneros bacterianos.
- **Cepa:** Unidad taxonómica. La cepa o clon puede considerarse como una población de características idénticas.
- **Dosis de infección:** se refiere al número de microorganismos necesarios para causar enfermedades.
- **Enterocito:** Células epiteliales del intestino encargadas de absorber diversas moléculas alimenticias y transportarlas al interior del organismo (perteneciente en ser humano y en animales). Se encuentran en el intestino delgado, intestino grueso y en el colon.
- **Generalmente reconocido como seguro:** GRAS (por sus siglas en inglés “**Generalmente Recognized As Safe.**”) es un aditivo alimentario, que se agrega intencionalmente a los alimentos que está sujeto a la revisión y aprobación previa a la comercialización por la FDA, a menos que la sustancia generalmente se reconoce, entre expertos cualificados, como si hubieran sido demostrado adecuadamente para ser seguro en las condiciones de su uso

previsto, o que el uso de la sustancia se estén excluidas de la definición de un aditivo alimentario.

- **Inmunoglobulina A:** Clase predominante de anticuerpo en las secreciones seromucosas del organismo como saliva, lágrimas, calostro, leche y secreciones respiratorias, gastrointestinales y genitourinarias. Actúan como la defensa inicial contra los patógenos invasores (virus y bacterias) antes de que penetren en el plasma; identifican los antígenos patógenos e impiden que se instalen en las mucosas.
- **Probiótico:** Microorganismos vivos que, cuando son suministrados en cantidades adecuadas, promueven beneficios en la salud del organismo huésped.

ANEXOS

ANEXO N° 1

 **FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA**
Ciudad Universitaria, 13 de Abril de 2014 **UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR** 

Doctor
Roberto Edmundo Sánchez Ochoa
Director
Hospital Nacional de la Mujer
Presente.

Estimado Dr. Sánchez:

La presente es para saludarle y desearle éxitos en el desempeño de su gestión, ocasión que aprovechamos para informar que realizaremos nuestro Trabajo de Graduación de la carrera de Licenciatura en Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, con el tema **"Evaluación in vitro de un suplemento alimenticio comercial que contiene *Bacillus coagulans* como probiótico para el tratamiento preventivo de listeriosis en mujeres embarazadas en El Salvador"**, por lo que solicitamos su apoyo, para que el Área de Epidemiología nos pueda entregar un informe sobre los casos de listeriosis anuales que hayan presentado en mujeres embarazadas y niños de edades entre cero y dos años de edad que ha atendido el hospital.

No omitimos señalarle que los datos anteriormente solicitados son para ser utilizados exclusivamente en el desarrollo de un trabajo de graduación de pre grado.

En espera de contar con su amable atención y respuesta favorable a nuestra petición pudiéndonos contactar al número de celular: 7852-7327 con Br. Samuel Castillo ó al 7063-6329 con Br. Lucía Segura.

Agradeciendo de antemano, la comprensión a la presente, nos despedimos.

Atentamente,


Br. Samuel Enrique Castillo Grande


Br. Lucía Esmeralda Segura Figueroa


Msc. Coralia de los Angeles González de Díaz
Asesora de Trabajos de Graduación
Docente de Microbiología Aplicada
Facultad de Química y Farmacia
Universidad de El Salvador



2206-6239

Final Avenida "Mártires Estudiantes del 30 de julio", Ciudad Universitaria, San Salvador, El Salvador, C.A. Apdo. Postal 3026
Telefax: (503) 2225-1645 Teléfonos: (503) 2225-4967, (503) 2225-2326, (503) 2511-2000 Extensiones 7510 y 7515

Figura N° 22: Solicitud de datos epidemiológicos de listeriosis al Hospital Nacional de la Mujer.

ANEXO N° 2



Hospital Nacional Especializado de Maternidad
"Dr. Raúl Argüello Escolán" EL SALVADOR
UNIDOS CRECEMOS TODOS

Hospital Nacional de la Mujer DIRECCION
Unidad de epidemiología

FECHA: 13 ABR 2015
HORA: EPID.01.00.15.30

PARA: Bo. Samuel Enrique Castillo Grande
Estudiante de Química y farmacia

De: Dra. Nancy Ruiz
Jefe de Unidad de Epidemiología

A través de: Dr. Roberto Edmundo Sánchez Ochoa
Director

Fecha: 13 de abril de 2015

Sirva la presente para saludarle.

Reporto casos positivos a Listeriosis durante los años 2012 al 2015 reportados por bacteriología del Hospital Nacional de la Mujer.

Año	Mes	Servicio	Medio
2012	Febrero	Ambulatorio	Orina
	Marzo	Obstetricia	Placenta
		Recién nacidos	Sangre
	Noviembre	Emergencia	Ovario
2013	Diciembre	Recién nacido	Sangre
2014	Mayo	Recién nacidos	Sangre
	Diciembre	Recién nacidos	Sangre
2015	Enero	Recién nacidos	Sangre

Espero sean de su utilidad.

Atentamente.

Figura N° 23: Datos epidemiológicos de listeriosis provistos por el Hospital Nacional de la Mujer.

ANEXO N° 3

 FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA
Ciudad Universitaria, 13 de Abril de 2014
UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR 

Doctor
Álvaro Hugo Salgado
Director
Hospital Nacional Benjamín Bloom
Presente.

Estimado Dr. Salgado

La presente es para saludarle y deseárselo éxitos en el desempeño de su gestión, ocasión que aprovechamos para informarle que realizaremos nuestro Trabajo de Graduación de la carrera de Licenciatura en Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, con el tema "Evaluación in vitro de un suplemento alimenticio comercial que contiene *Bacillus coagulans* como probiótico para el tratamiento preventivo de listeriosis en mujeres embarazadas en El Salvador", por lo que solicitamos su apoyo, para que el Área de Epidemiología nos pueda entregar un informe sobre los casos de listeriosis anuales que hayan presentado en niños de edades entre cero y dos años de edad que ha atendido el hospital.

No omitimos señalarle que los datos anteriormente solicitados son para ser utilizados exclusivamente en el desarrollo de un trabajo de graduación de pre grado.

En espera de contar con su amable atención y respuesta favorable a nuestra petición pudiéndonos contactar al número de celular: 7852-7327 con Br. Samuel Castillo ó al 7063-6329 con Br. Lucía Segura.

Agradeciendo de antemano, la comprensión a la presente, nos despedimos.

Atentamente,


Br. Samuel Enrique Castillo Grande


Br. Lucía Esmeralda Segura Figueroa


Msc. Coralia de los Angeles González de Díaz
Asesora de Trabajos de Graduación
Docente de Microbiología Aplicada
Facultad de Química y Farmacia
Universidad de El Salvador

en Alianza
Tel: 2133-3222



Final Avenida "Mártires Estudiantes del 30 de julio", Ciudad Universitaria, San Salvador, El Salvador, C.A. Apdo. Postal 3026
Telefax: (503) 2225-1645 Teléfonos: (503) 2225-4967, (503) 2225-2326, (503) 2511-2000 Extensiones 7510 y 7515

Figura N° 24: Solicitud de datos epidemiológicos de listeriosis al Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom.

ANEXO N° 4
PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

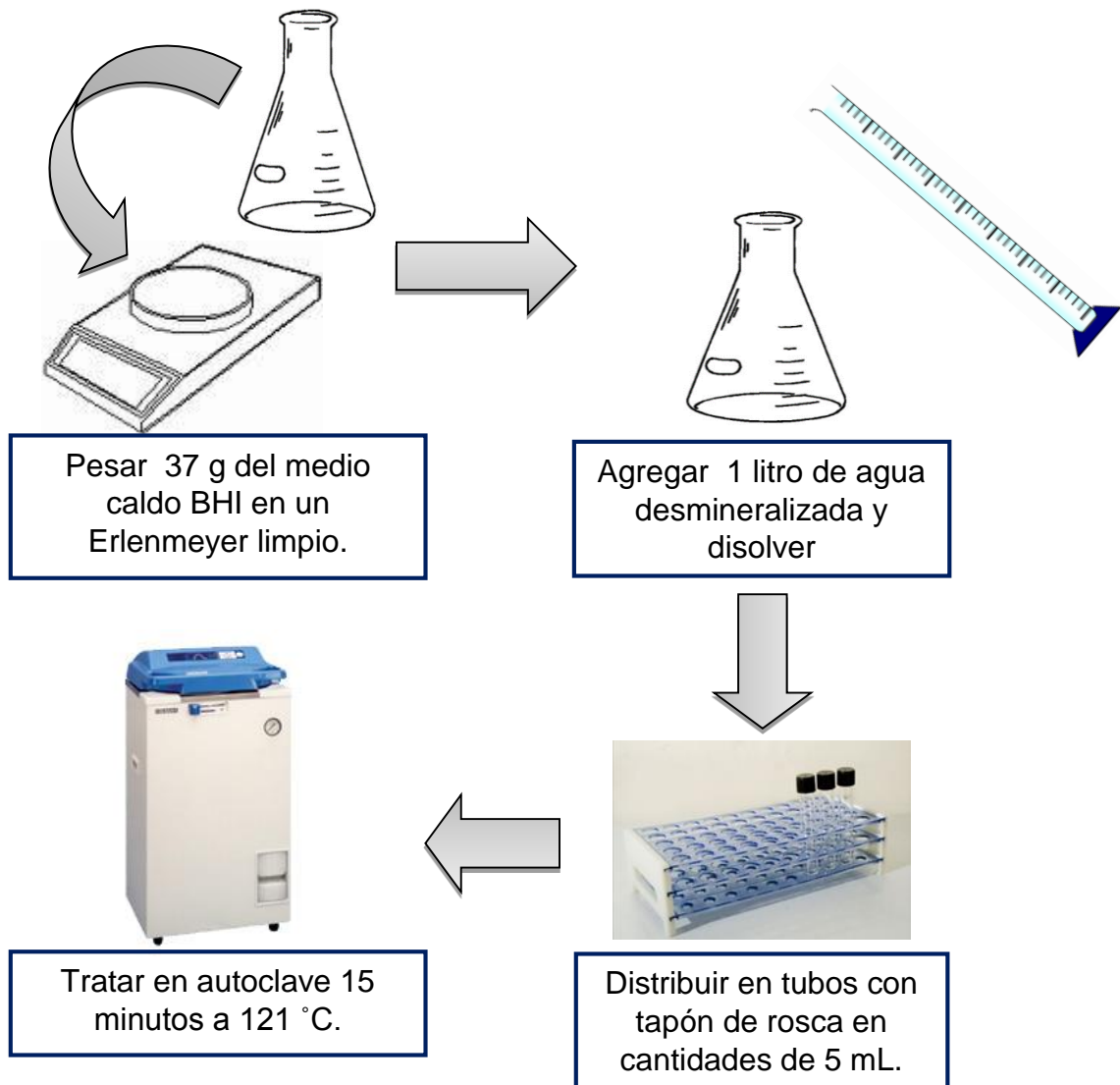


Figura N° 25: Preparación del medio caldo BHI.

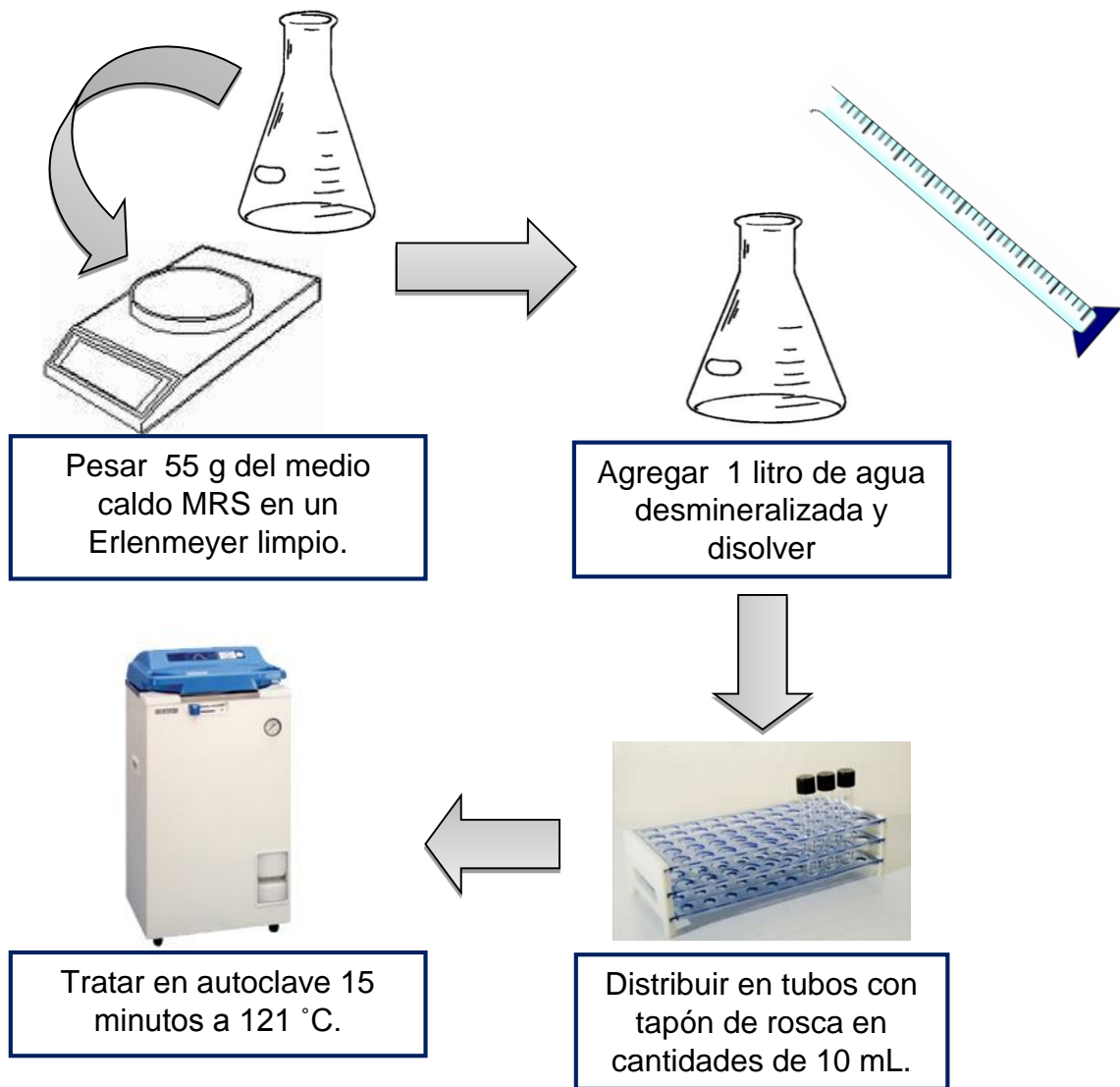


Figura N° 26: Preparación del medio caldo MRS.

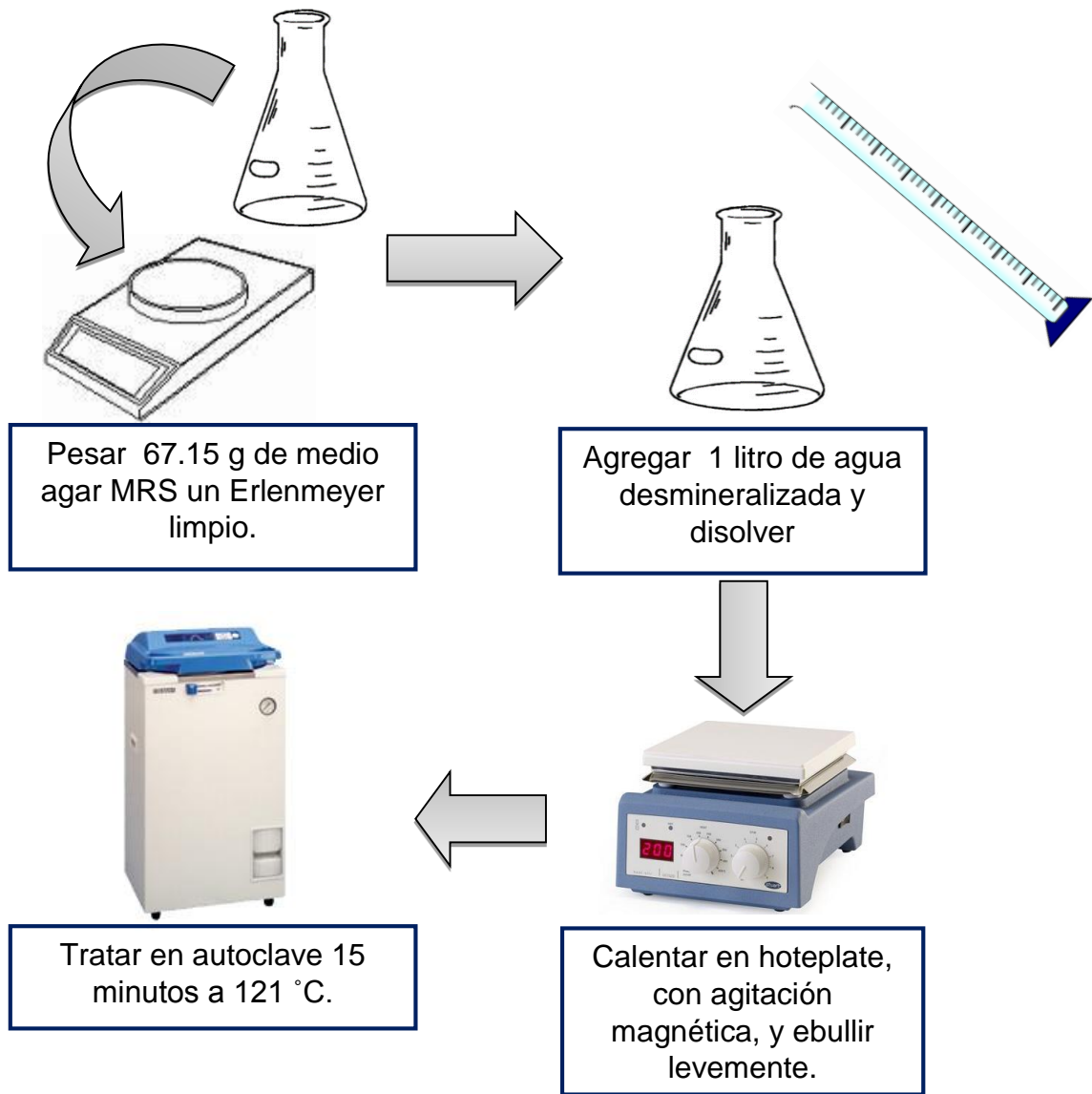


Figura N° 27: Preparación del medio agar MRS

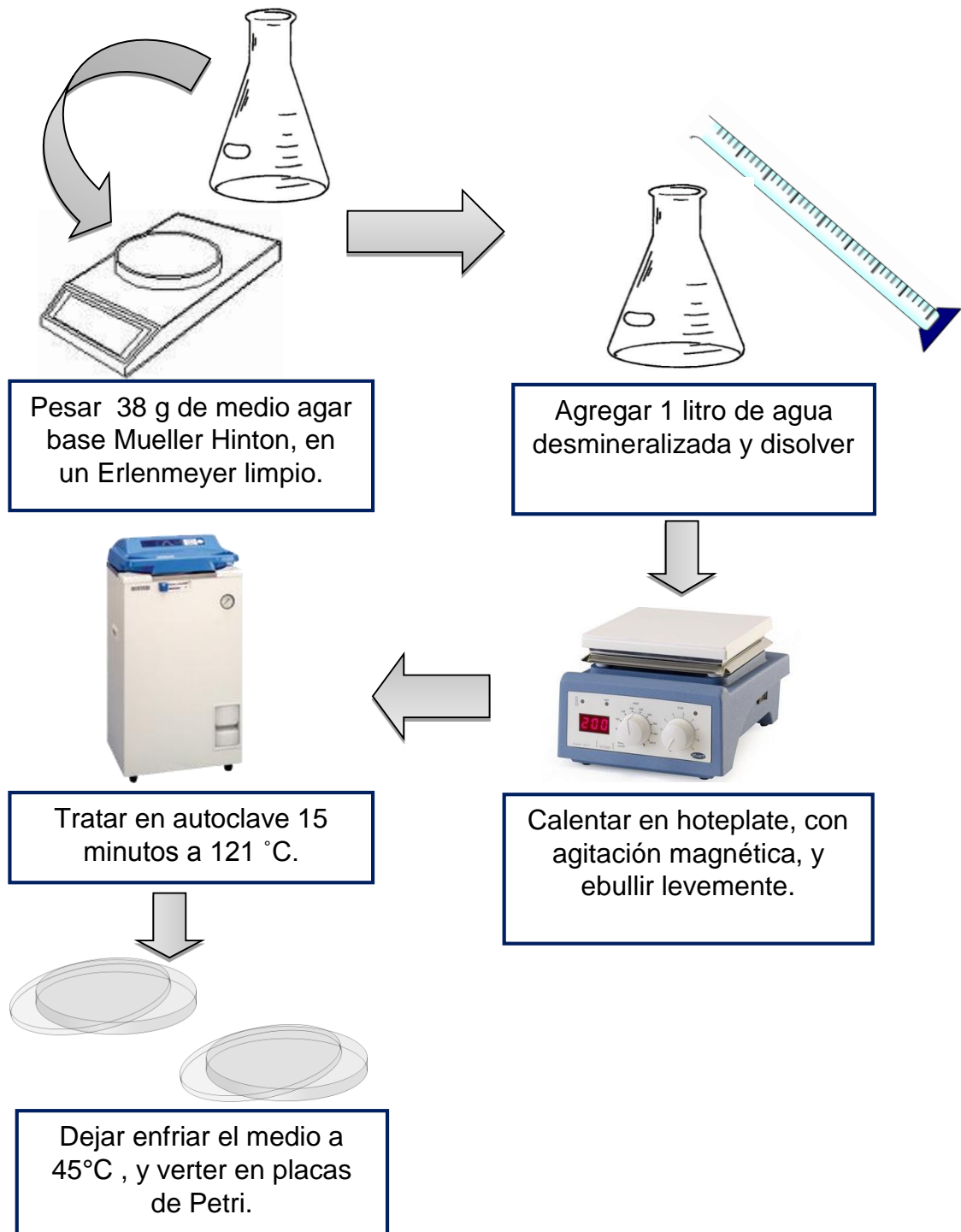


Figura N° 28: Preparación del medio agar Mueller Hinton

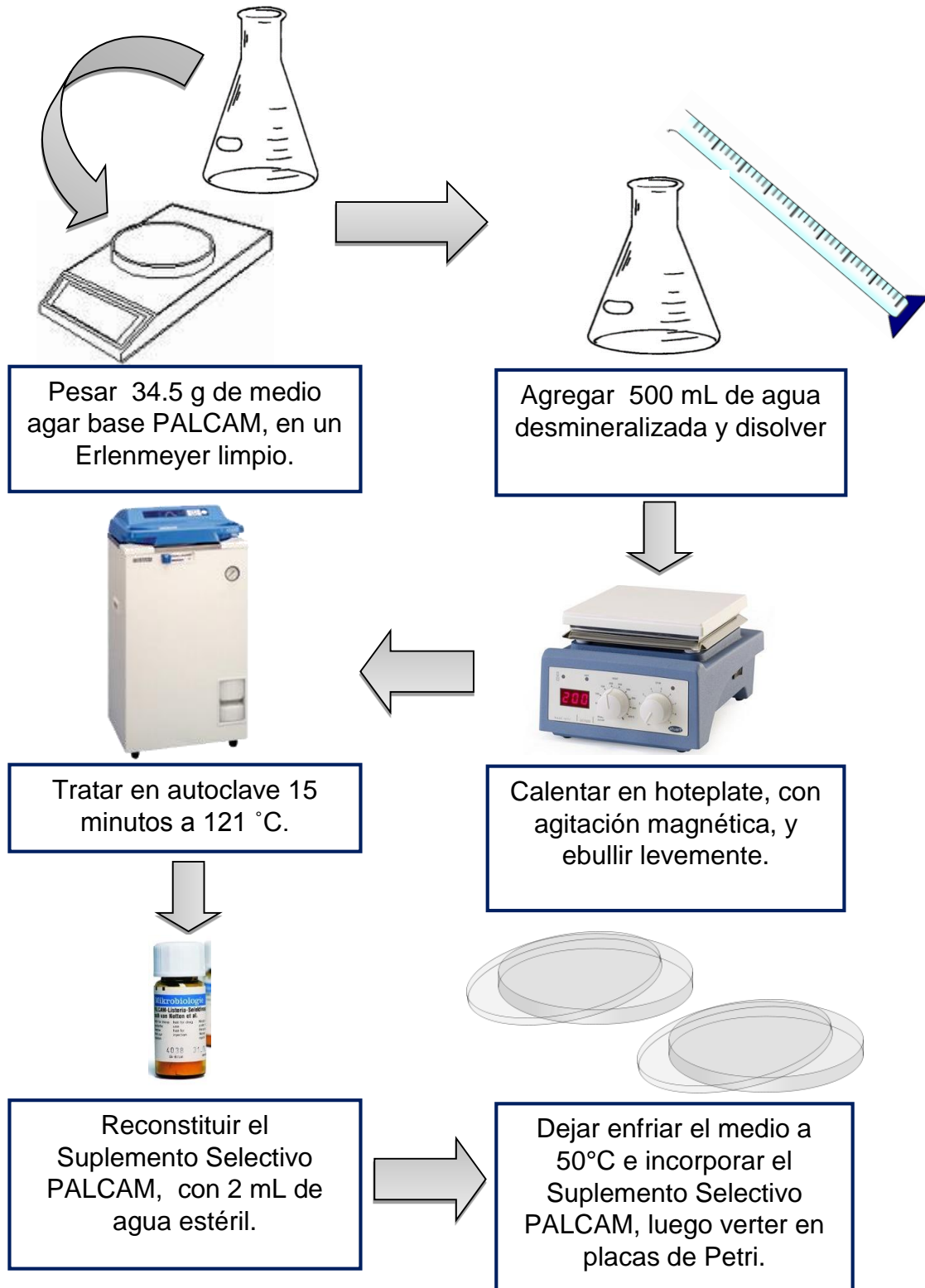


Figura N° 29: Preparación del medio agar PALCAM.

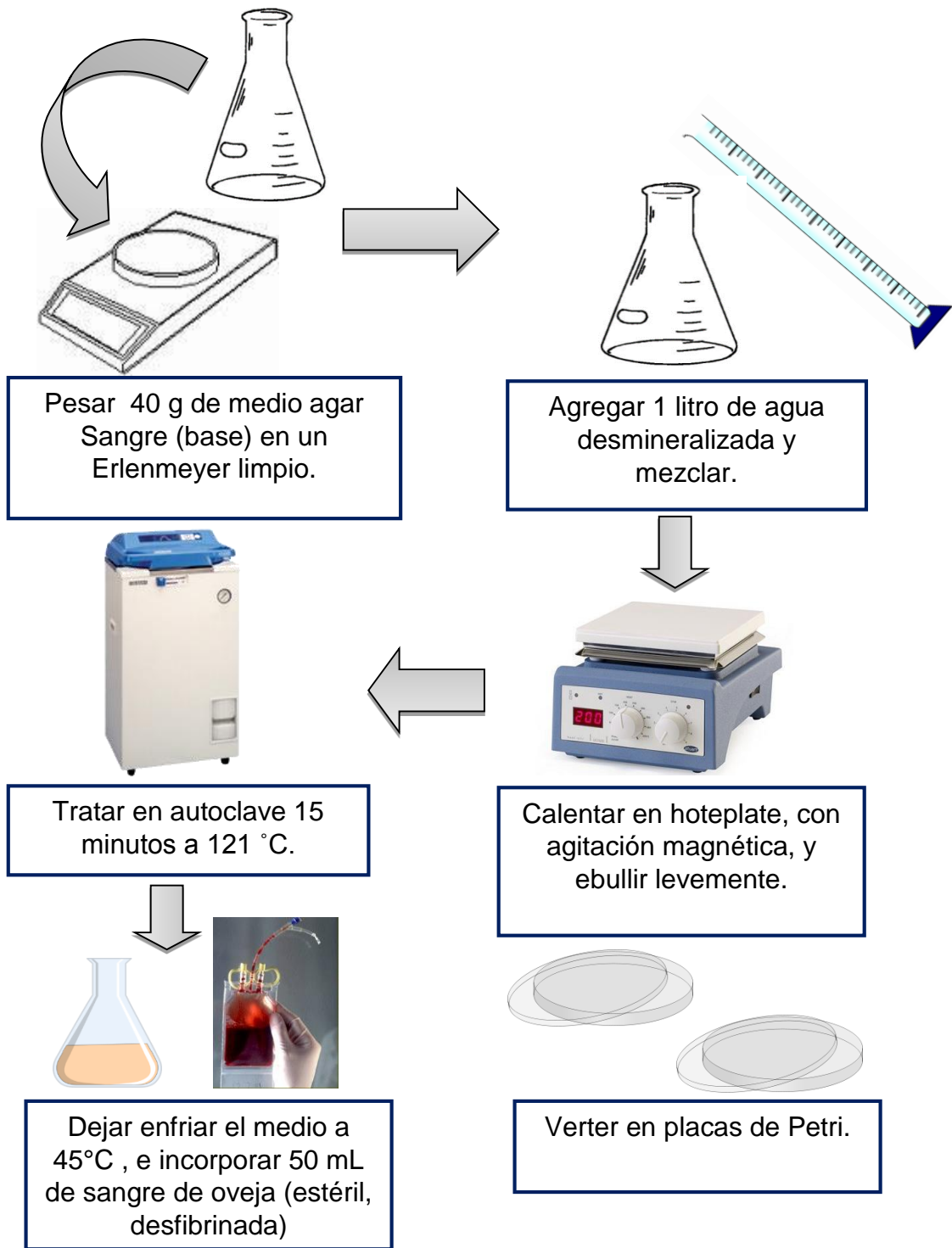


Figura N° 30: Preparación del medio Agar Sangre (Base)

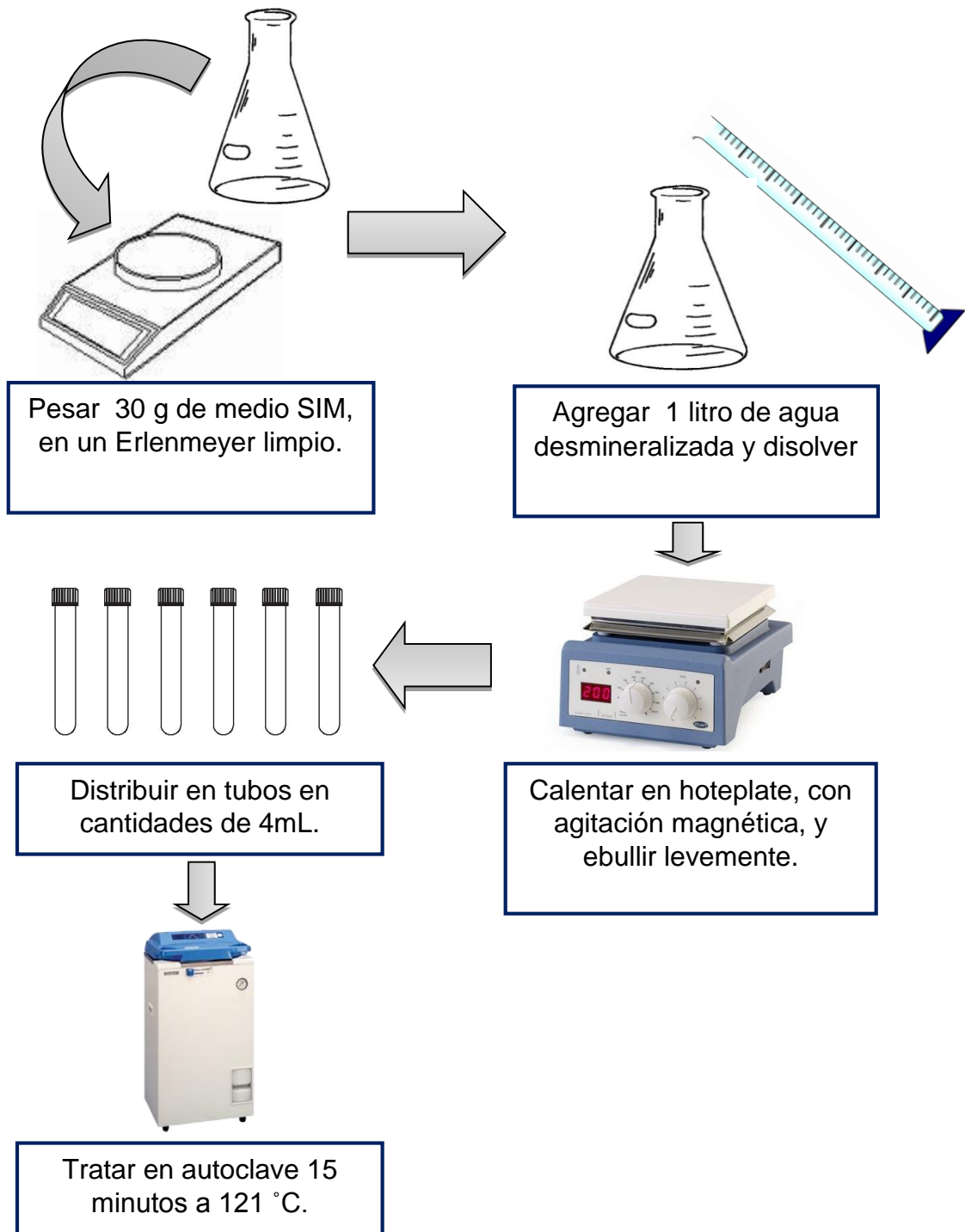


Figura N° 31: Preparación del medio SIM.

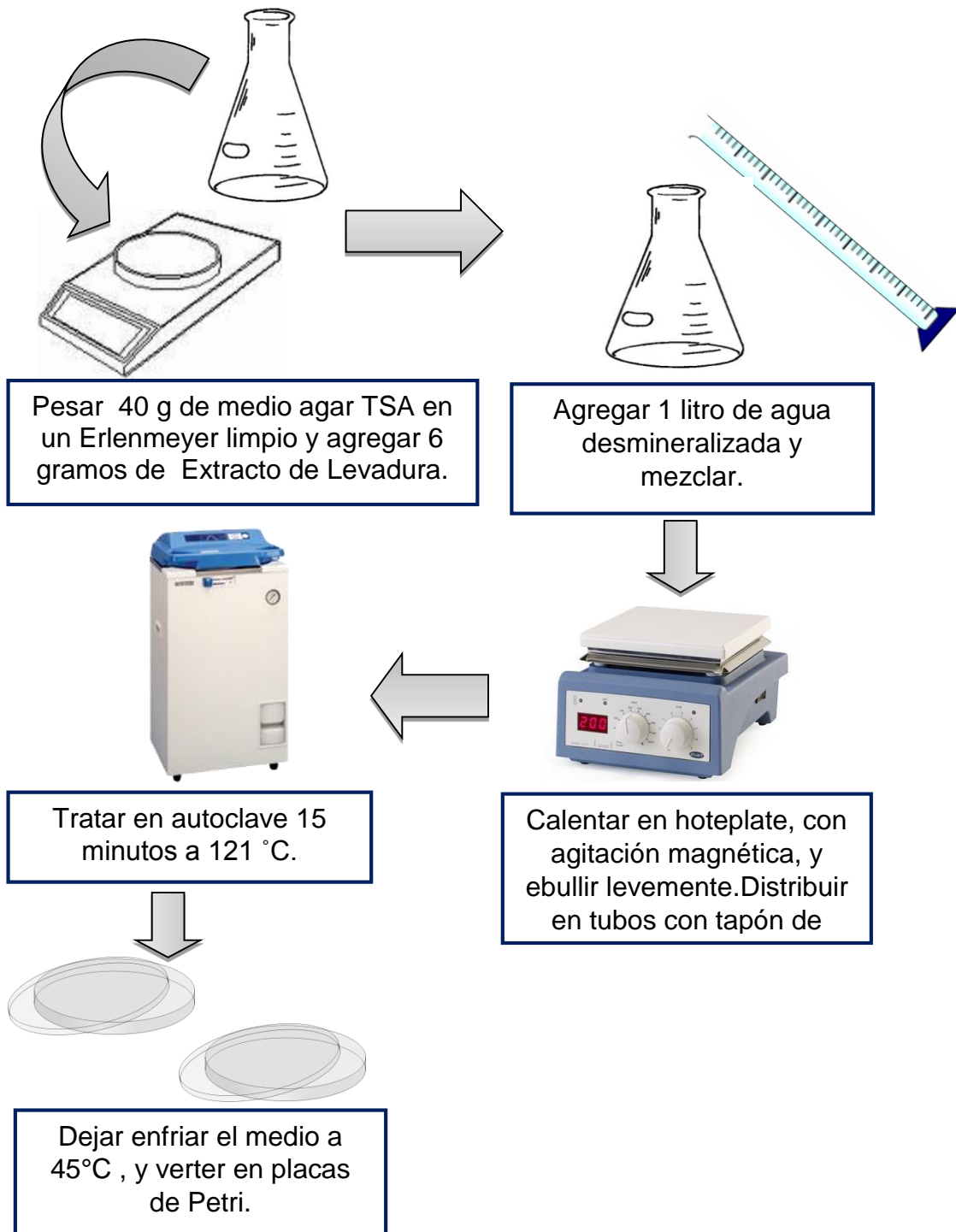


Figura N° 32: Preparación del medio agar TSAye

ANEXO N° 5
PROCEDIMIENTOS PARA LA IDENTIFICACION DE LA CEPA
PATOGENA *Listeria monocytogenes*.

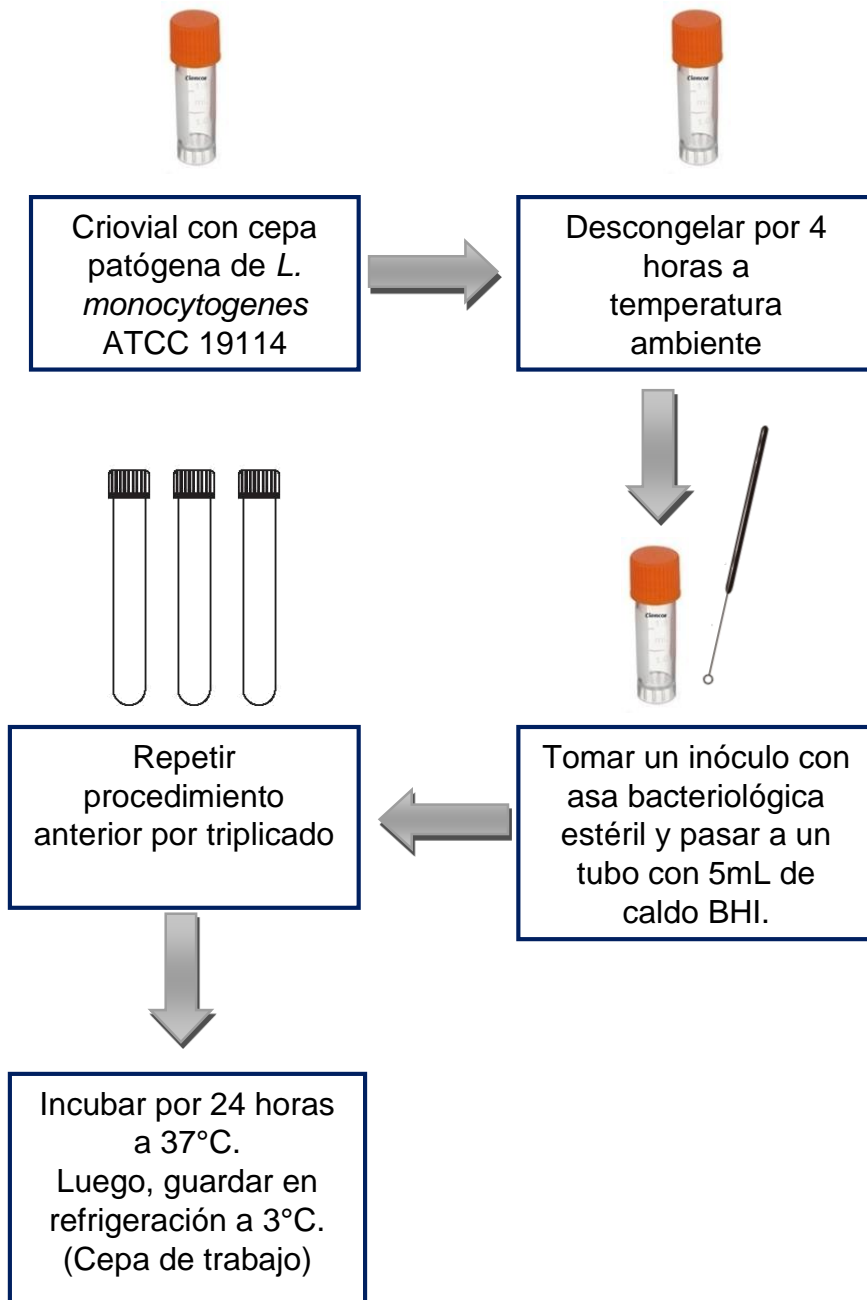
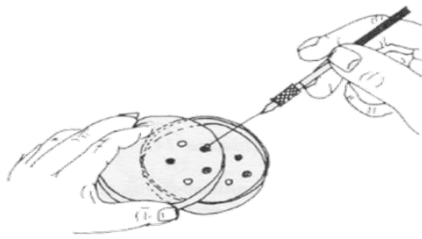
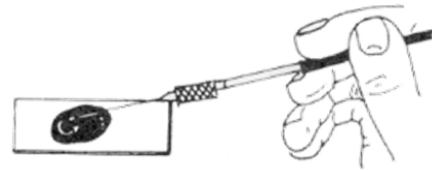


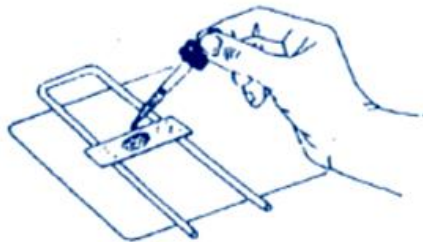
Figura N° 33: Procedimiento para obtener la cepa de trabajo de *Listeria monocytogenes*.



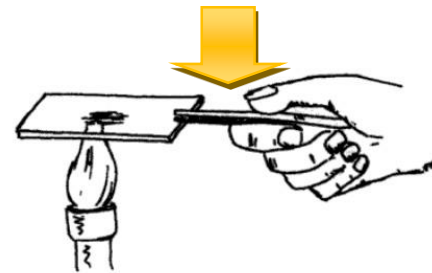
Tomar con asa estéril una colonia aislada de *Listeria monocytogenes* ATCC 19114



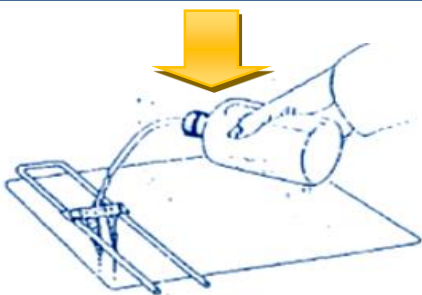
Extender la colonia sobre una gota de solución salina en un portaobjeto de vidrio, para formar una película.



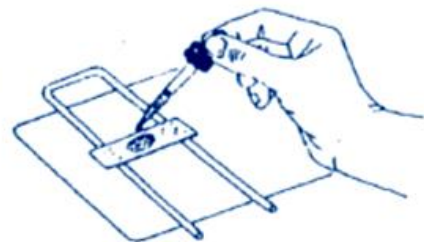
Aplicar al frotis unas cuantas gotas de **solución de cristal violeta** y dejar actuar durante un minuto.



Flamear el frotis y luego deje secar cerca del mechero.

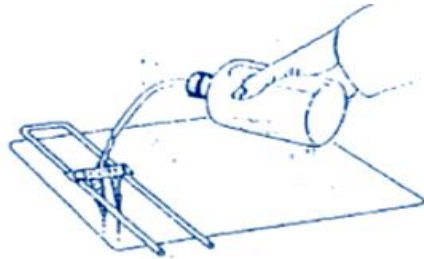


Enjuagar con agua destilada y agregar unas gotas de **lugol**, dejar actuar un minuto.

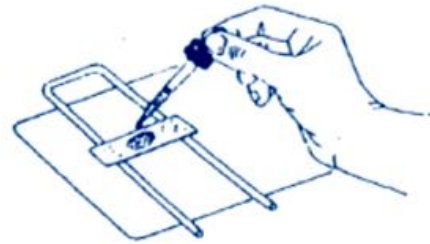


Enjuagar con agua desmineralizada y decolorar de inmediato con **alcohol-acetona**.

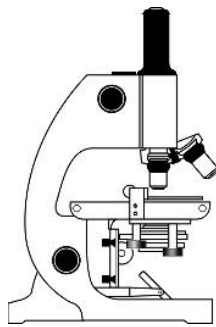
Figura N° 34: Frotis bacteriano y tinción Gram.



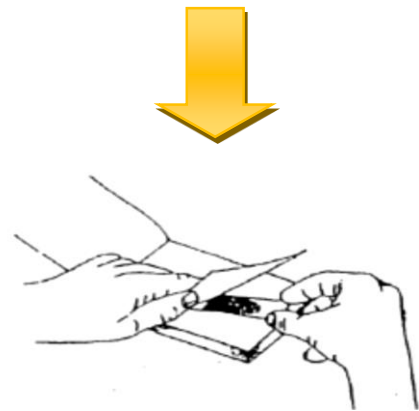
Enjuagar con agua desmineralizada.



Adicionar gotas de **safranina** hasta cubrir el frotis, esperar 1 minuto y enjuagar con agua desmineralizada.

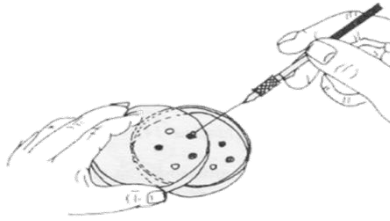


Observar al microscopio y determinar la morfología.



Eliminar el exceso de agua y secar con papel toalla para quitar la humedad.

Figura N° 34: Continuación.



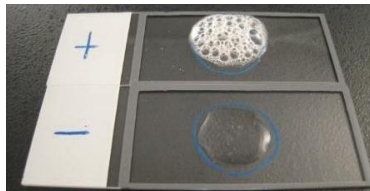
Tomar una colonia aislada de *Listeria monocytogenes* ATCC 19114 o *Bacillus coagulans*, con palillo de madera, estéril, a partir de un cultivo



Colocar la colonia aislada sobre un portaobjeto de vidrio limpio.

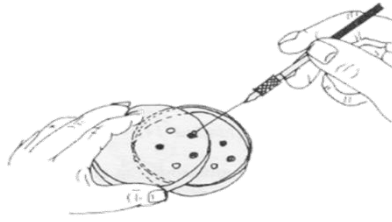


Agregar 1 gota de Peróxido de Hidrógeno 3%.



Un burbujeo en los primeros segundos indica reacción positiva.

Figura N° 35: Prueba catalasa.



Inocular una colonia aislada de *Listeria monocytogenes* ATCC 19114 en medio selectivo PALCAM.



Incubar a 35°C por 24 – 48h.



Observar colonias transparentes con precipitado negro alrededor.

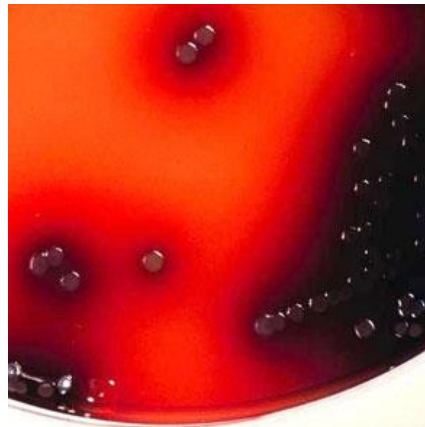


Figura N° 36: Inoculación en medio selectivo PALCAM.

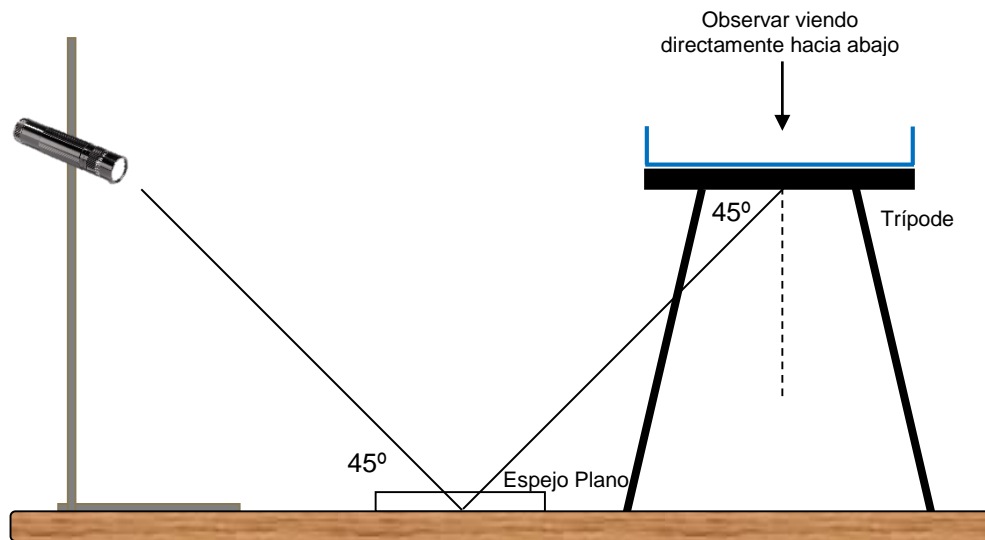


Figura N° 37: Examinación de colonias sospechosas de *Listeria monocytogenes* por el Sistema Óptico de Henry.

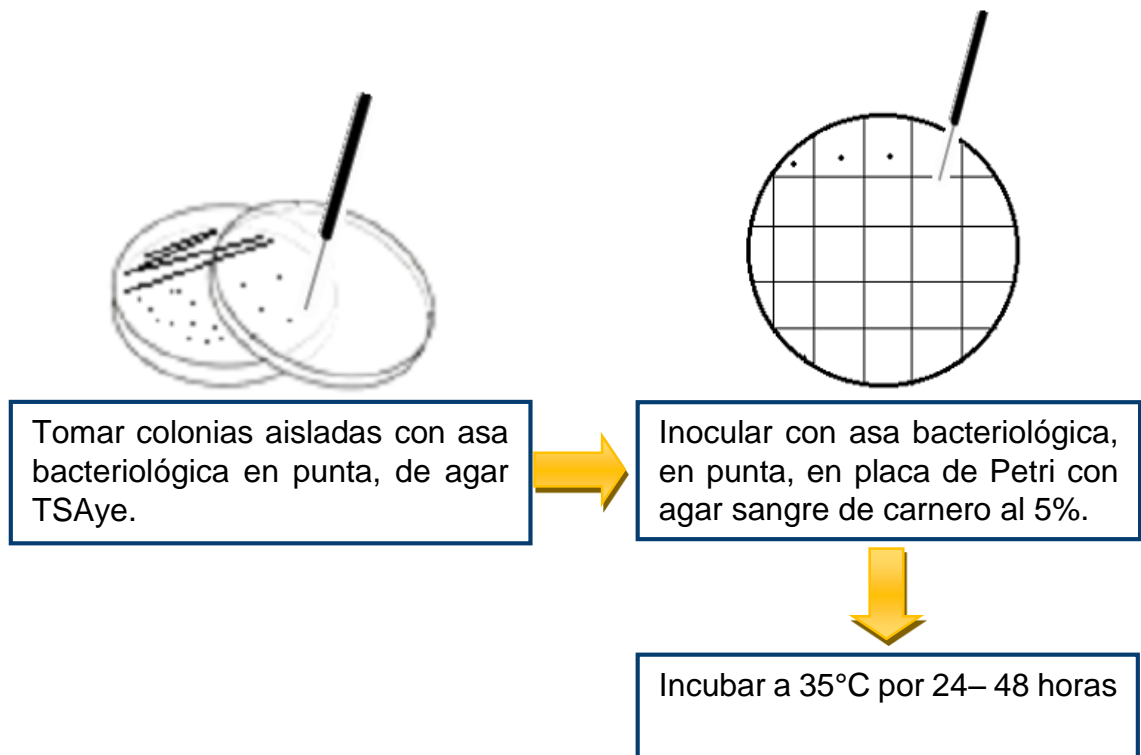


Figura N° 38: Prueba de hemólisis.



Tomar un inóculo con asa bacteriológica en punta estéril, desde un cultivo de *L. monocytogenes* ATCC 19114 (cepa de trabajo)



Inocular con asa bacteriológica en punta en medio SIM.



Incubar por 7 días a temperatura ambiente (25°C).



Observar diariamente, un patrón característico en forma de paraguas.

Figura N° 39: Prueba de movilidad.

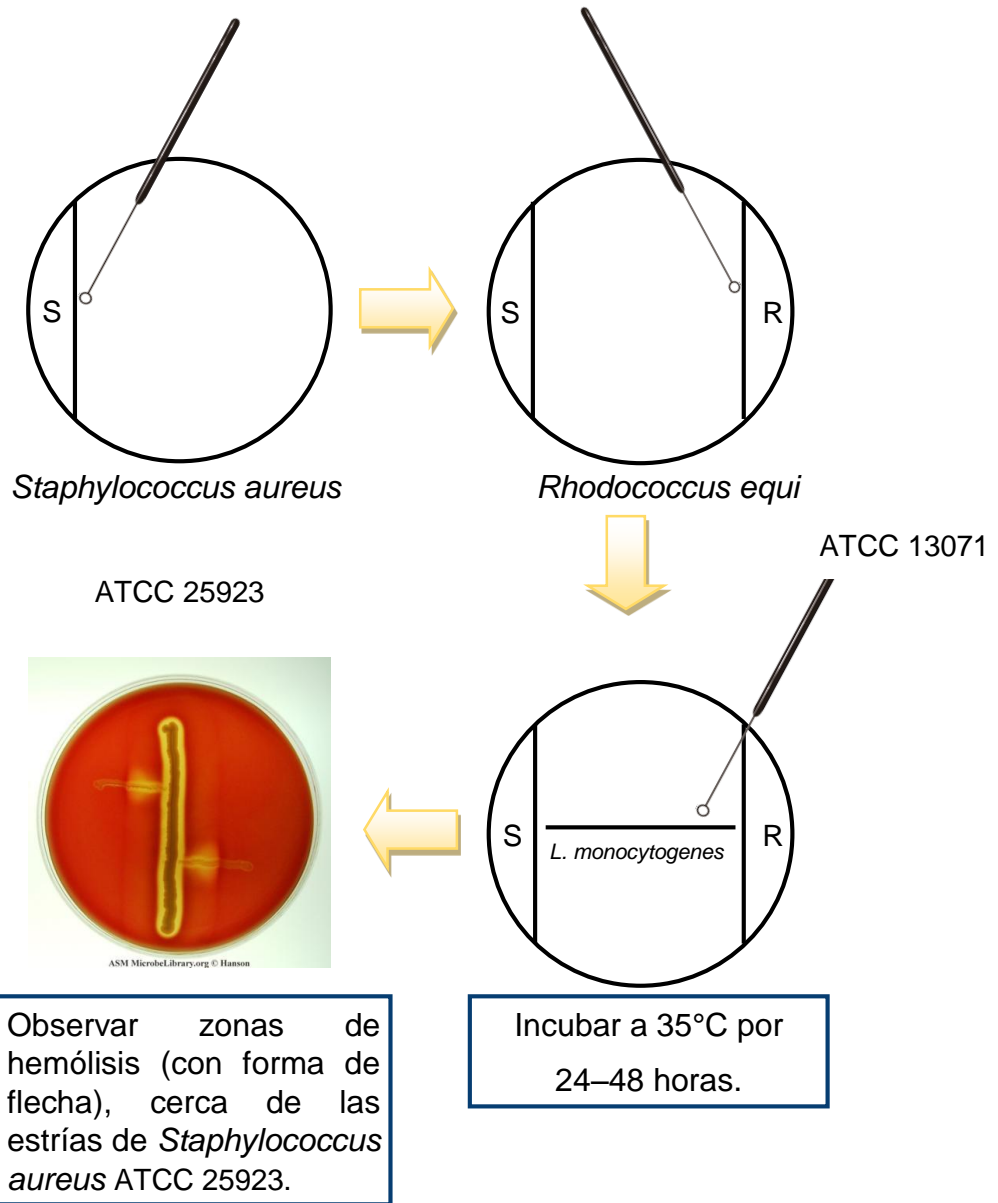


Figura N° 40: Prueba CAMP.

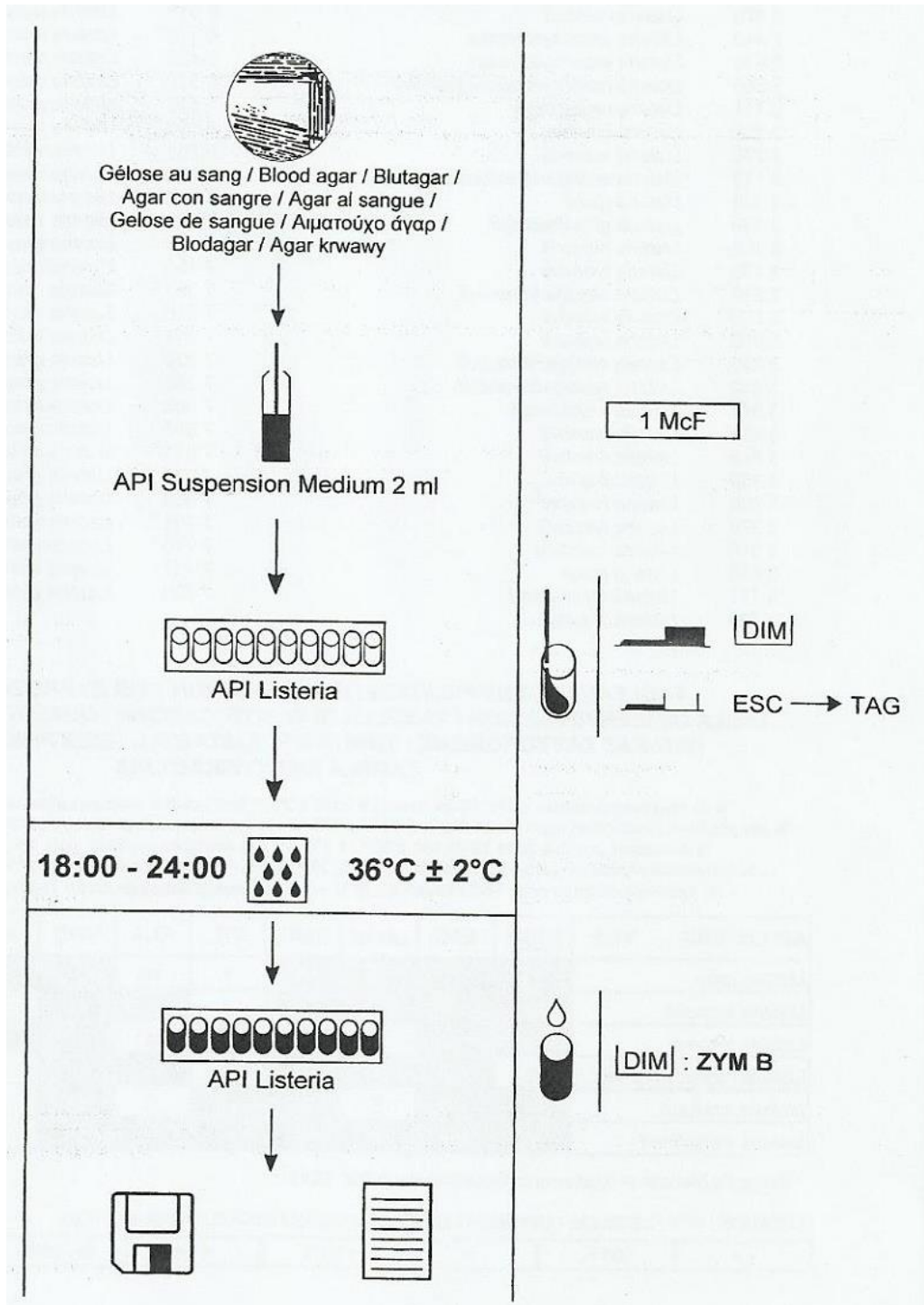


Figura N° 41: Procedimiento para la identificación de *Listeria monocytogenes* por medio de galería API® Listeria.

Cuadro N° 6: Identificación de las reacciones de pruebas API® Listeria.

Tests	Componentes activos	Reacciones	Resultados	
			Negativo	Positivo
DIM	Substrato enzimático	Diferenciación <i>L. innocua</i> / <i>L. monocytogenes</i>	<u>ZYM B / < 3 min</u>	
			Naranja pálido Rosa beige Gris beige	Naranja
ESC	Esculina, Citrato férrico	hidrólisis (ESculina)	Amarillo pálido	Negro
Aman	4-nitrofenil- α D-manopiranosida	α -MANosidasa	inoloro	Amarillo
DARL	D-Arabitól	Acidificación (D-ARabitol)	Rojo/ Rojo anaranjado	Amarillo/ Amarillo anaranjado
XYL	D-Xilosa	Acidificación (D-Xilosa)		
RHA	L-Rhamnosa	Acidificación (RHAmnosa)		
MDG	Metil- α D-glucopiranosido	Acidificación (Metil- α D-Glucopiranosido)		
RIB	D-Ribosa	Acidificación (RIBosa)		
G1P	Glucosa-1-Fosfato	Acidificación (Glucosa-1-Fosfato)		
TAG	D-Tagatosa	Acidificación (TAGatosa)		

Cuadro N° 7: Lista de perfiles numéricos.

2 150	<i>Listeria ivanovii</i>	3 750	<i>Listeria ivanovii</i>
2 170	<i>Listeria ivanovii</i>	3 770	<i>Listeria ivanovii</i>
2 250	<i>Listeria ivanovii</i>	6 010	<i>Listeria monocytogenes</i>
2 310	<i>Listeria seeligeri/ivanovii</i>	6 110	<i>Listeria monocytogenes/innocua</i>
2 311	<i>Listeria welshimeri</i>	6 120	<i>Listeria grayi</i>
2 330	<i>Listeria ivanovii</i>	6 130	<i>Listeria grayi</i>
2 340	<i>Listeria ivanovii</i>	6 150	<i>Listeria monocytogenes</i>
2 350	<i>Listeria ivanovii</i>	6 310	<i>Listeria seeligeri/welshimeri</i>
2 370	<i>Listeria ivanovii</i>	6 311	<i>Listeria welshimeri</i>
2 410	<i>Listeria monocytogenes</i>	6 410	<i>Listeria monocytogenes</i>
2 510	<i>Listeria monocytogenes</i>	6 450	<i>Listeria monocytogenes</i>
2 550	<i>Listeria monocytogenes/ivanovii</i>	6 510	<i>Listeria monocytogenes</i>
2 711	<i>Listeria welshimeri</i>	6 520	<i>Listeria grayi</i>
2 750	<i>Listeria ivanovii</i>	6 550	<i>Listeria monocytogenes</i>
2 770	<i>Listeria ivanovii</i>	6 701	<i>Listeria welshimeri</i>
3 110	<i>Listeria seeligeri/innocua/ivanovii</i>	6 711	<i>Listeria welshimeri</i>
3 120	<i>Listeria grayi</i>	7 110	<i>Listeria innocua</i>
3 130	<i>Listeria grayi/ivanovii</i>	7 111	<i>Listeria welshimeri</i>
3 150	<i>Listeria ivanovii</i>	7 120	<i>Listeria grayi</i>
3 170	<i>Listeria ivanovii</i>	7 130	<i>Listeria grayi</i>
3 210	<i>Listeria seeligeri/ivanovii</i>	7 301	<i>Listeria welshimeri</i>
3 250	<i>Listeria ivanovii</i>	7 310	<i>Listeria seeligeri/welshimeri/innocua</i>
3 270	<i>Listeria ivanovii</i>	7 311	<i>Listeria welshimeri</i>
3 300	<i>Listeria seeligeri/ivanovii</i>	7 320	<i>Listeria grayi</i>
3 310	<i>Listeria seeligeri/ivanovii</i>	7 330	<i>Listeria grayi</i>
3 311	<i>Listeria welshimeri</i>	7 500	<i>Listeria innocua</i>
3 330	<i>Listeria ivanovii</i>	7 510	<i>Listeria innocua</i>
3 340	<i>Listeria ivanovii</i>	7 511	<i>Listeria welshimeri</i>
3 350	<i>Listeria ivanovii</i>	7 520	<i>Listeria grayi</i>
3 360	<i>Listeria ivanovii</i>	7 530	<i>Listeria grayi</i>
3 370	<i>Listeria ivanovii</i>	7 701	<i>Listeria welshimeri</i>
3 510	<i>Listeria innocua</i>	7 710	<i>Listeria welshimeri/innocua</i>
3 520	<i>Listeria grayi</i>	7 711	<i>Listeria welshimeri</i>
3 711	<i>Listeria welshimeri</i>	7 720	<i>Listeria grayi</i>
3 730	<i>Listeria ivanovii</i>		

ANEXO N° 6

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE

Listeria monocytogenes

Cuadro N° 8: Resultados de la pruebas de identificación para *Listeria monocytogenes*.

Prueba	Resultado esperado	Resultado real
Tinción de Gram	Bacilos cortos, Gram positivo	Bacilos cortos, color morado. Gram positivo.
Sistema Óptico de Henry	Colonias de color azul-grisáceo a azul.	Colonias de color azul-grisáceo a azul.
Catalasa	Burbujeo positivo	Burbujeo positivo
Hemólisis	Halo claro alrededor de las colonias.	Halo claro alrededor de las colonias.
MIO	Formación de paraguas	Formación de paraguas
CAMP	Positivo	Positivo
Pruebas API® Listeria	Positivo	Positivo



Tiempo= 0h



Tiempo= 24h

CE 12814 REF: 2015/07/30

Origin / Source / Herkunft /
Origen / Origen / Πηγή/Παράγωγο /
Ursprung / Oprijdelde / Prochozzeria :

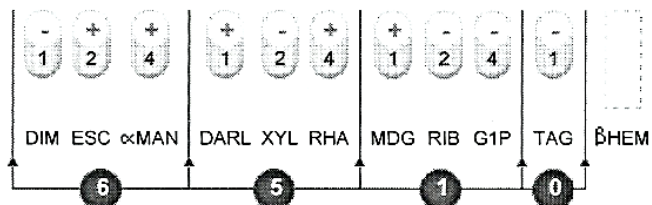
WIDIA BIOLUX

-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	
[DIM]	ESC	αMAN	DARL	XYL	RHA	MDG	RIB	G1P	TAG	βHEM
6			5			1			0	

Autras tests / Other tests / Andere Tests /
Citas pruebas / Altri test / Outros testes /
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
Andra tests / Inne testy : *Catalasa (+), Hemólisis (+), CAMP (+)*

Ident. / Ταυτοποίηση: *6510 Listeria monocytogenes*

Figura N° 42: Resultados de la prueba API® Listeria

API LISTERIA V1.2


REFERENCIA FECHA
 18/08/15

COMENTARIO
 Listeria monocytogenes

BUENA IDENTIFICACION

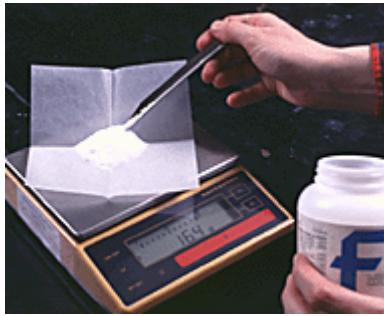
Galería	API LISTERIA V1.2
Perfil	6 5 1 0
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra
Listeria monocytogenes	98.6	1.0	

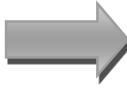
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra
Listeria innocua	1.3	0.58	DIM 99%

Figura N° 43: Resultados de la prueba API® Listeria, mediante apiweb.

ANEXO N° 7
PROCEDIMIENTO PARA COMPROBACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN
DE *Bacillus coagulans* EN EL SUPLEMENTO ALIMENTICIO.



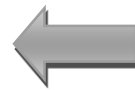
Pesar 9.0 g de Cloruro de Sodio



Agregar el NaCl a un beaker con capacidad para 1000 mL e incorporar 1 litro de agua desmineralizada.



Distribuir en frascos de vidrio en cantidades de 100mL o 90mL



Tratar en autoclave 15 minutos a 121 °C.

Figura N° 44: Preparación de solución salina 0.9%.

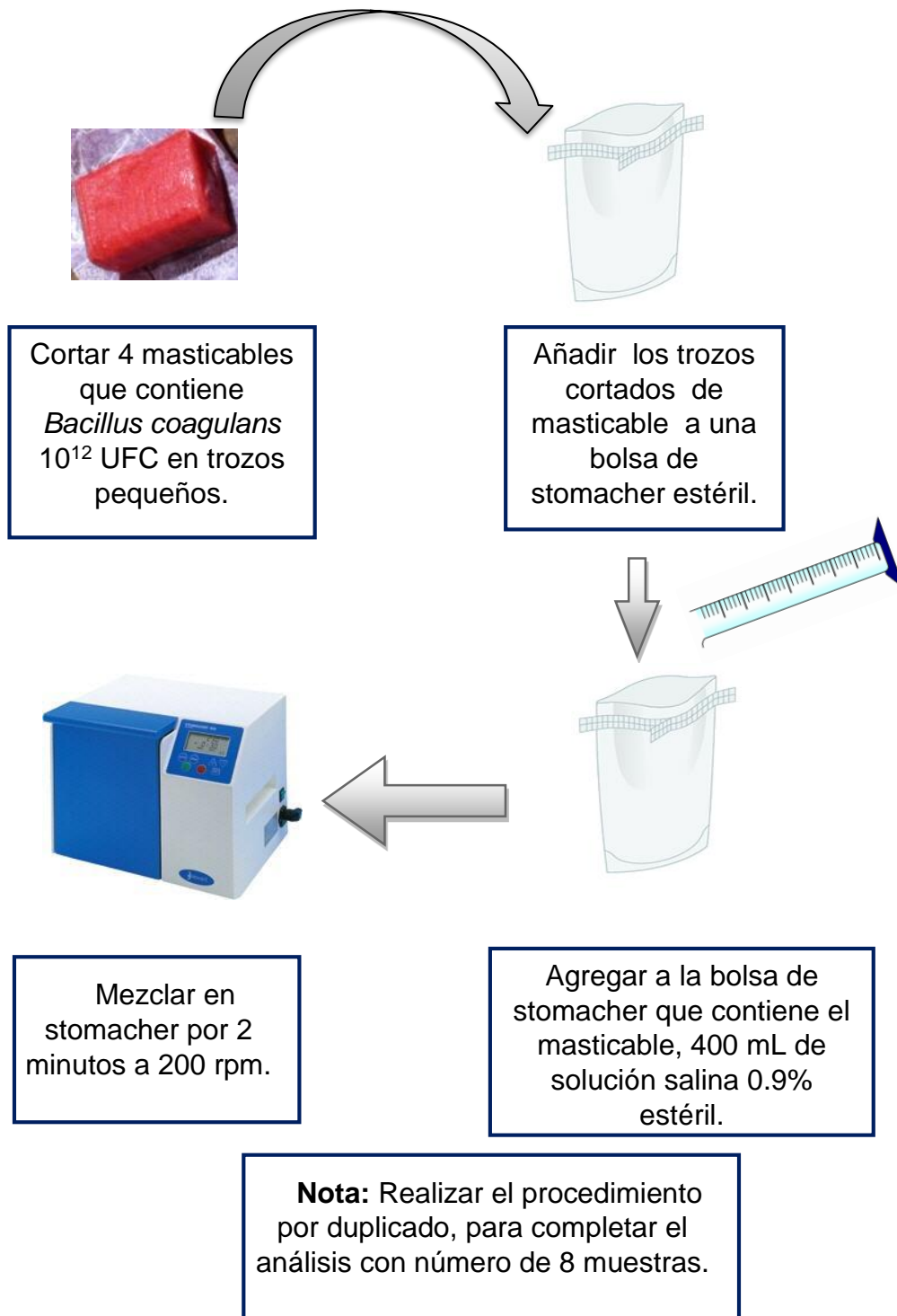


Figura N° 45: Procedimiento para la comprobación de la concentración de *Bacillus coagulans* en el suplemento alimenticio.

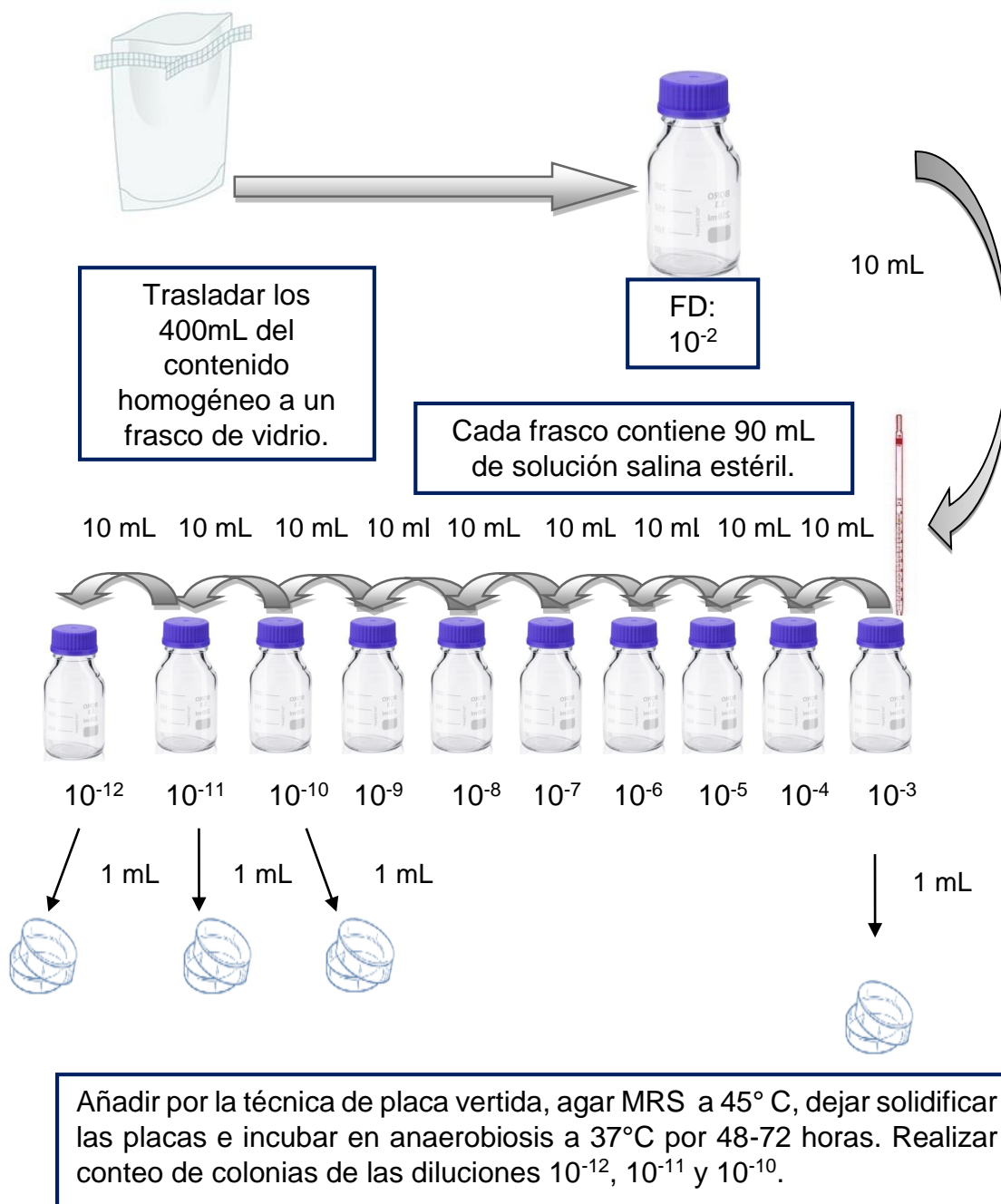


Figura N° 45: Continuación.



Figura N° 45: Continuación.

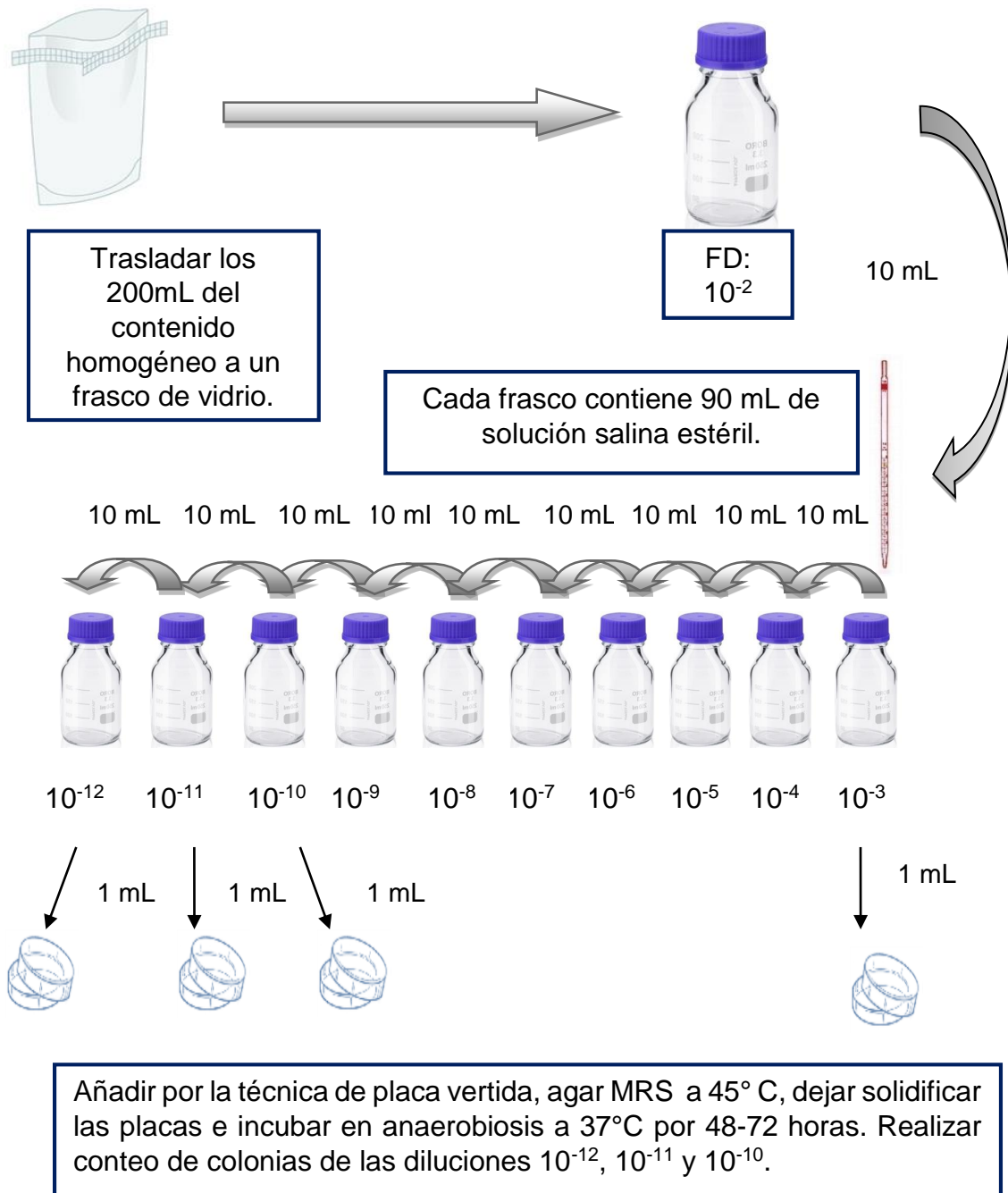


Figura N° 45: Continuación.

ANEXO N° 8

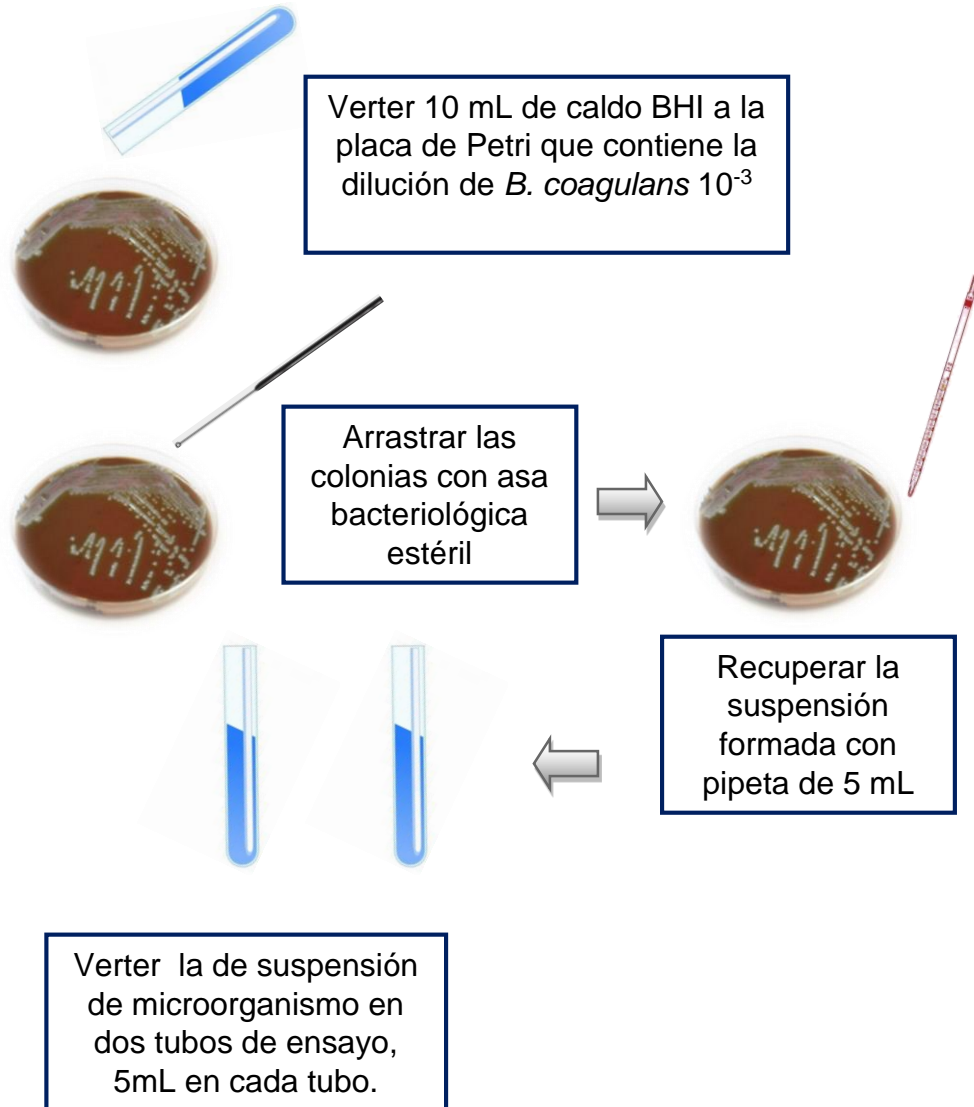
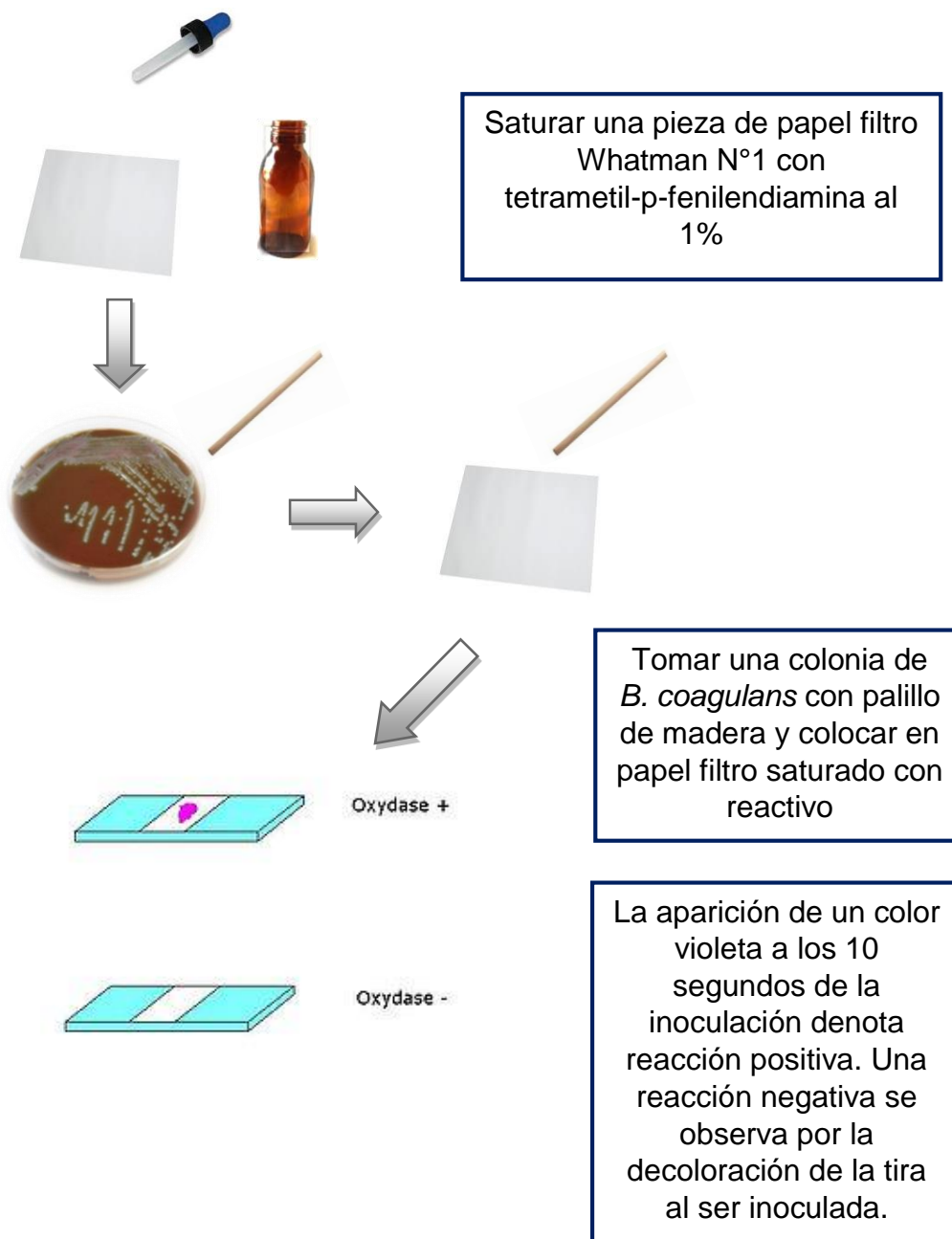


Figura N° 46: Procedimiento para aislar el probiótico *Bacillus coagulans* del suplemento alimenticio comercial.

ANEXO N° 9

PRUEBAS DE IDENTIFICACION DEL PROBIOTICO *Bacillus coagulans*.



Como control positivo de la prueba utilizar una una colonia de la cepa de *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802

Figura N° 47: Procedimiento para realizar la prueba de oxidasa

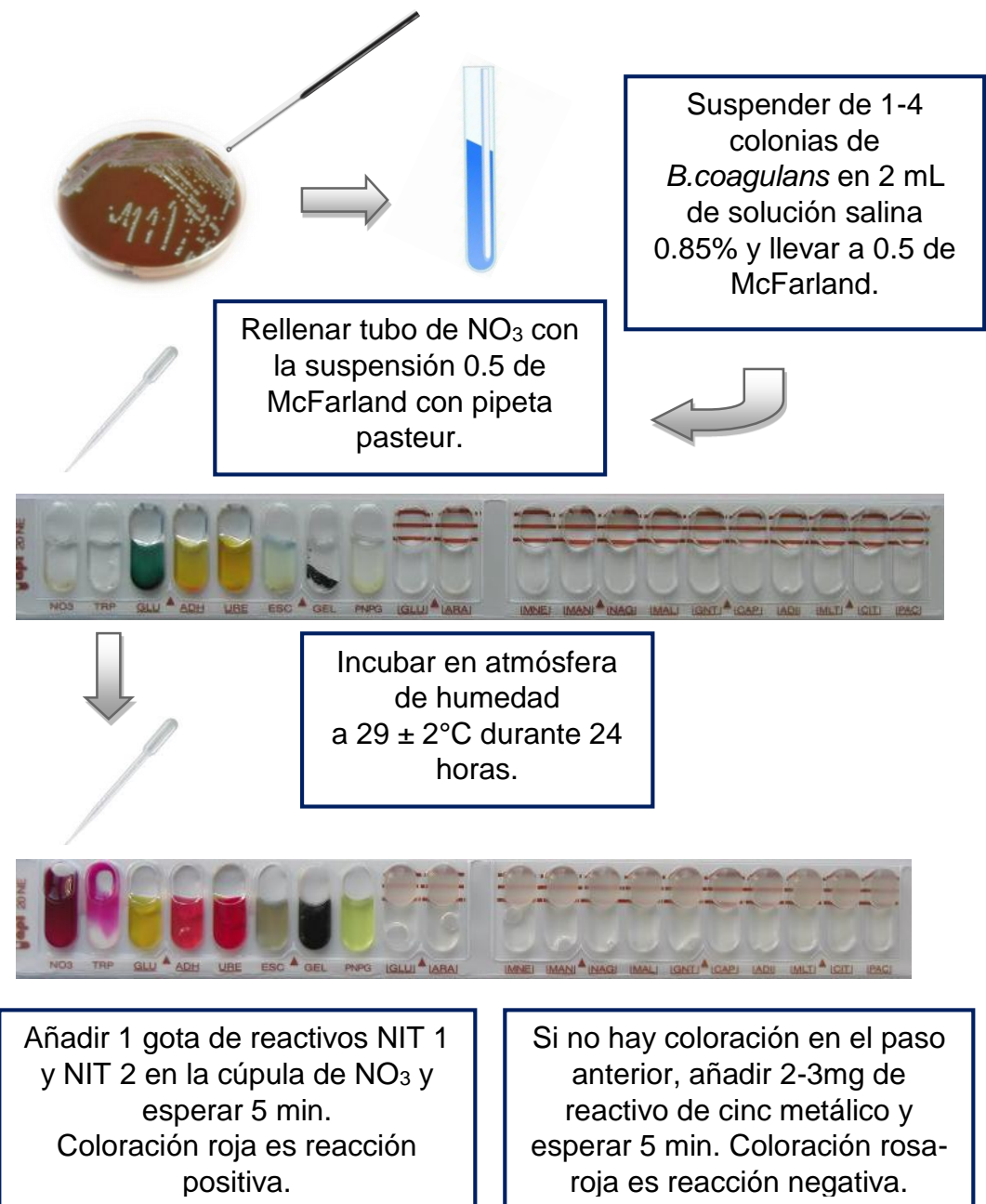


Figura N° 48: Procedimiento para realizar la prueba de reducción de nitratos

ANEXO N° 10

Cuadro N° 9: Resultados de las pruebas de identificación para *Bacillus coagulans*

Prueba	Resultado esperado	Resultado real
Tinción de Gram	Bacilos cortos, Gram positivo	Bacilos cortos, Gram positivo, asociados en cadena
Catalasa	Burbujeo positivo	Burbujeo positivo
Oxidasa	Negativo	Negativo
Reducción de nitratos	Negativo	Negativo

ANEXO N° 11
PROCEDIMIENTO PARA ESTANDARIZACIÓN POR
ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS.

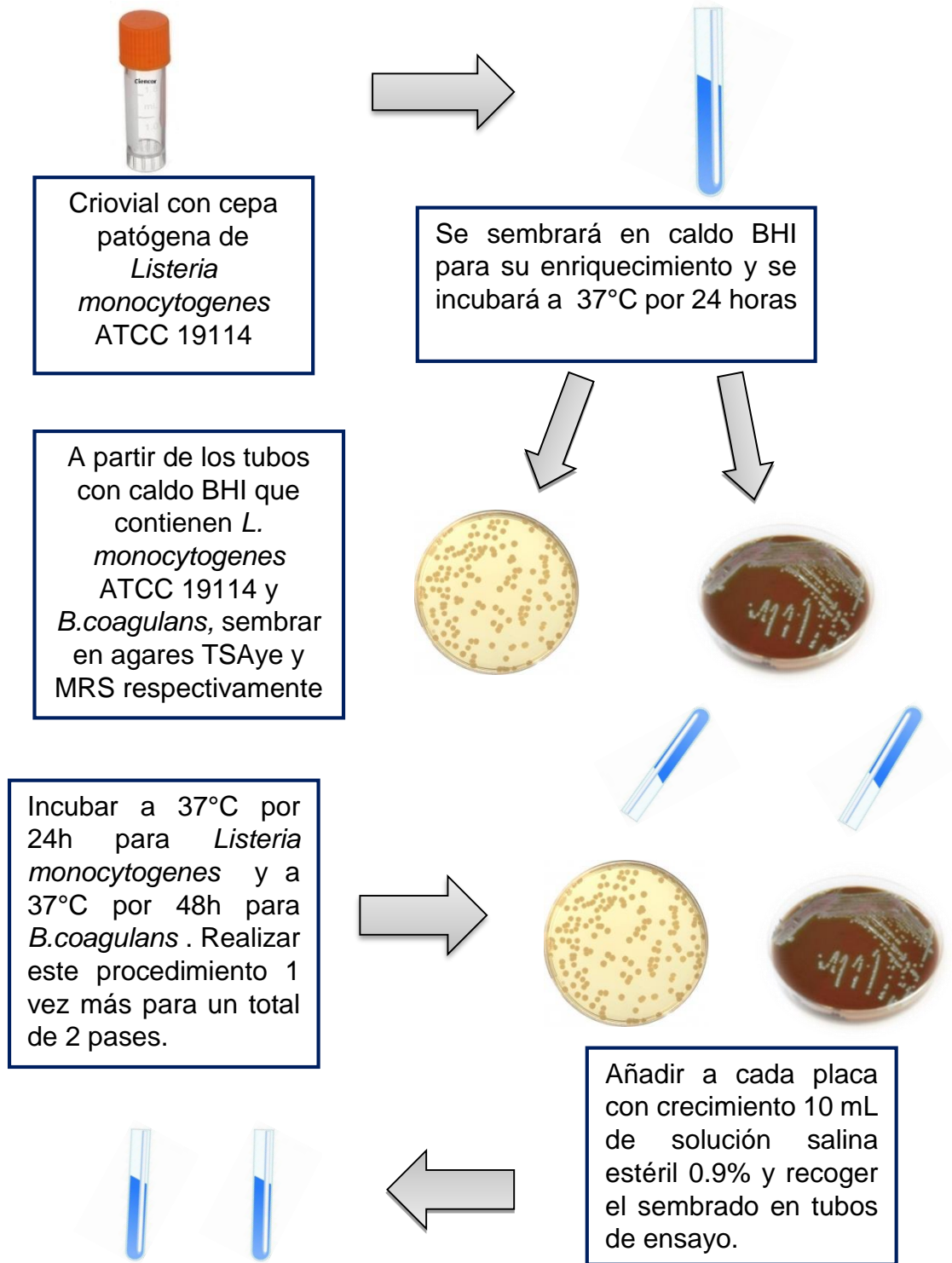


Figura N° 49: Procedimiento para estandarización por espectrofotometría UV-VIS.

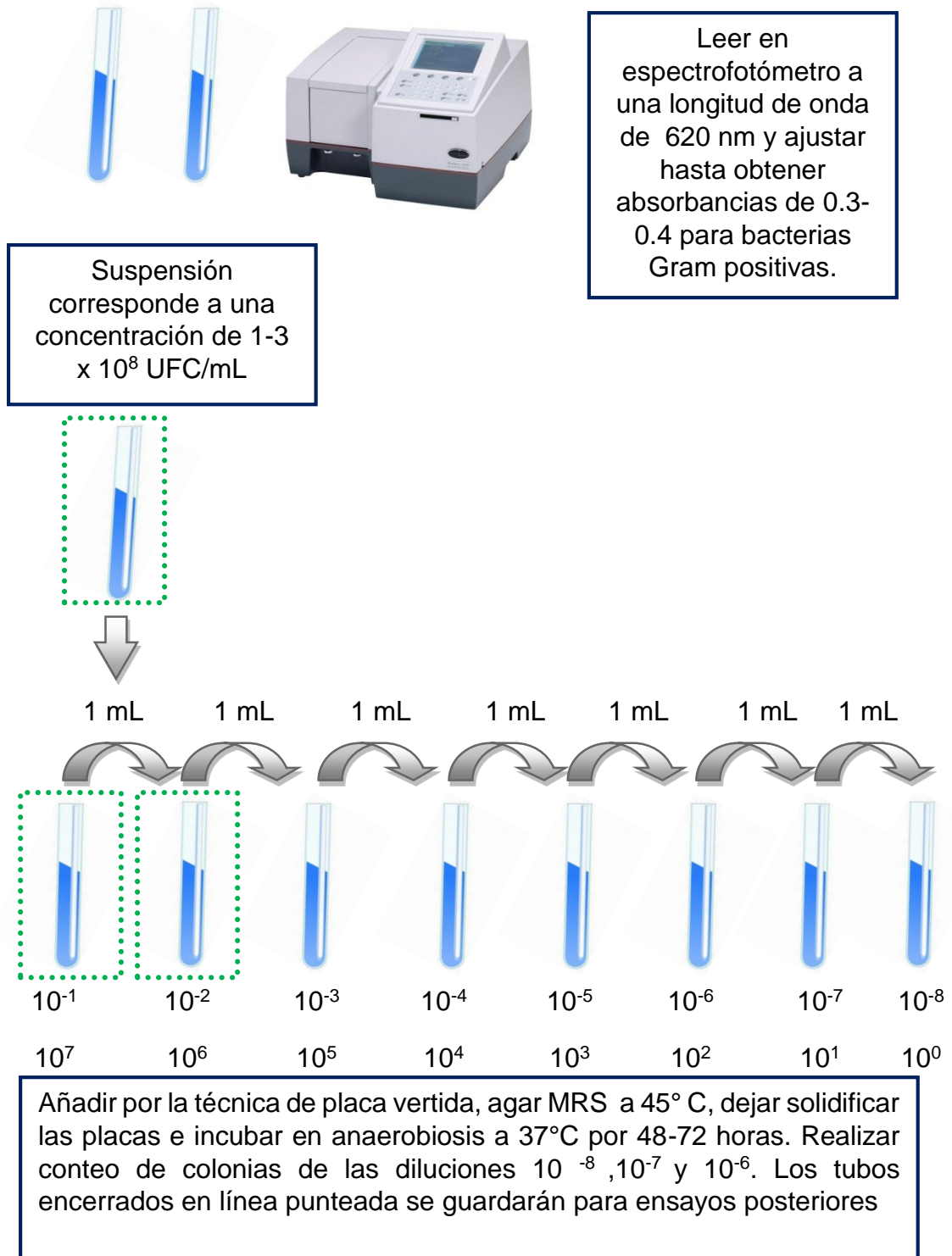


Figura N° 49: Continuación.

ANEXO N° 12

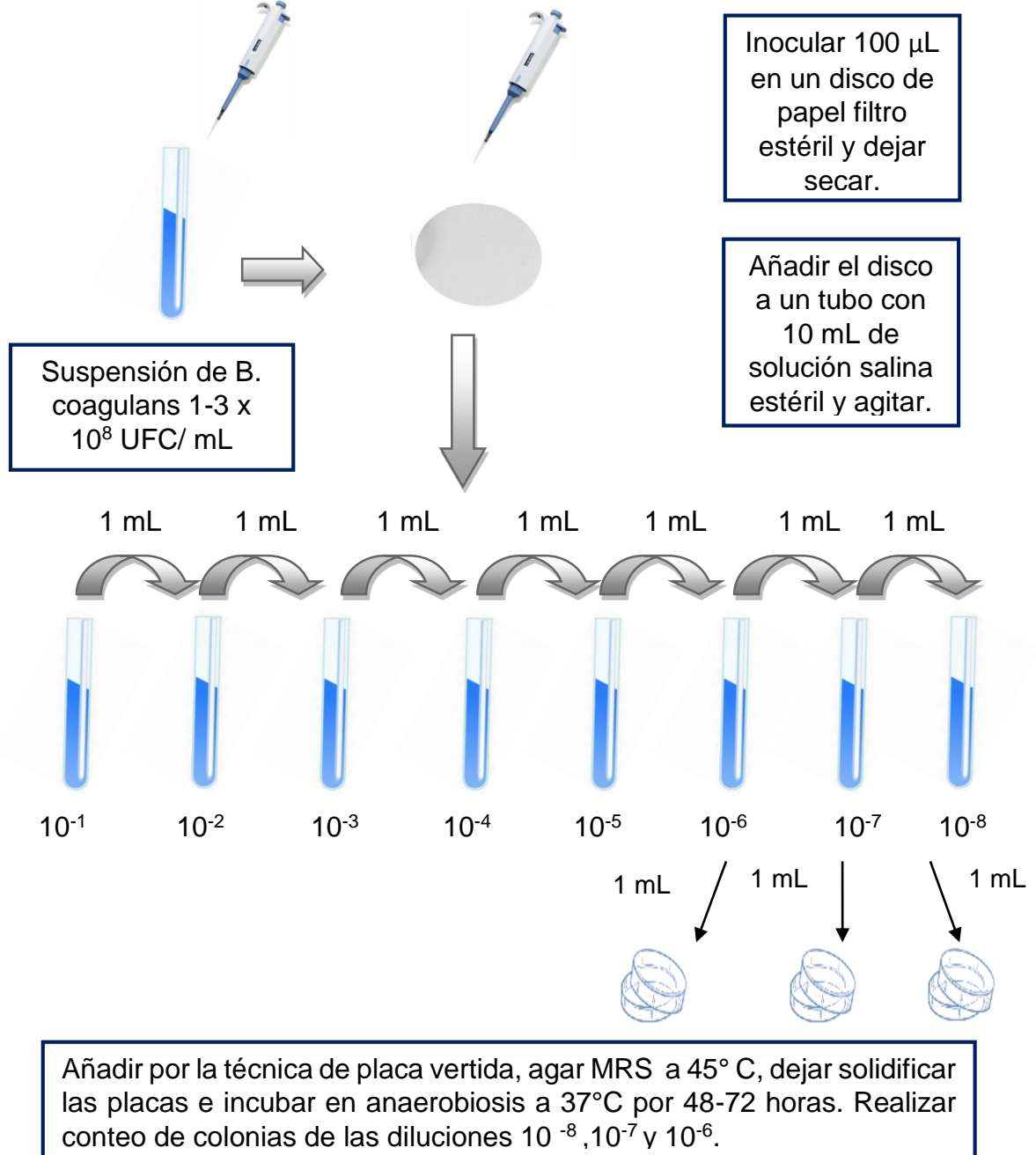


Figura N° 50: Procedimiento para determinar la concentración real de *Bacillus coagulans* en un disco impregnado con suspensión estandarizada de probiótico.

ANEXO N° 13
ENSAYO DE ANTAGONISMO MICROBIANO USANDO LA TECNICA DE
DIFUSION EN AGAR POR MEDIO DE DISCOS Y POZOS

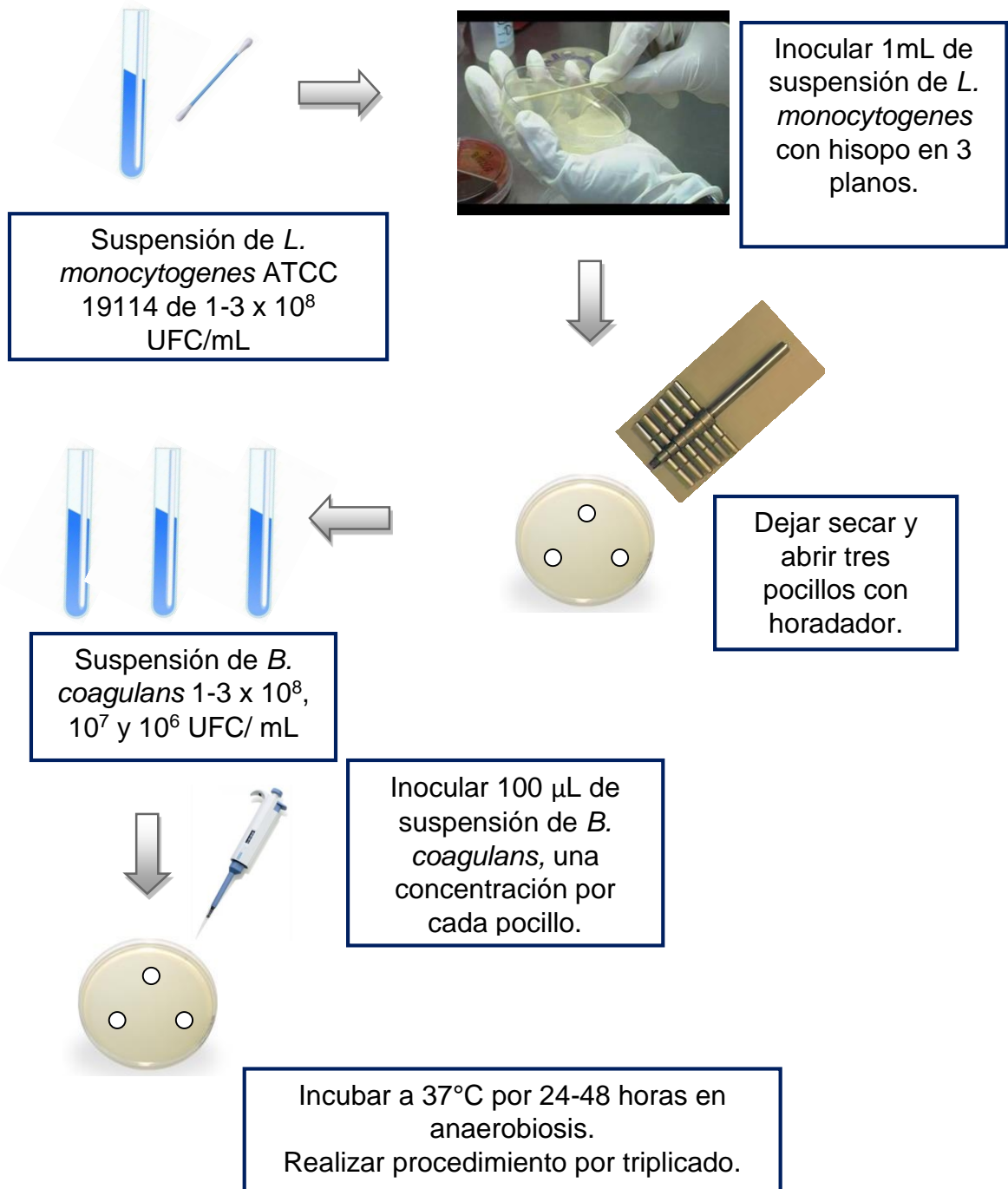


Figura N° 51: Ensayo de Antagonismo microbiano usando la técnica de Difusión en Agar por medio de Pozos.

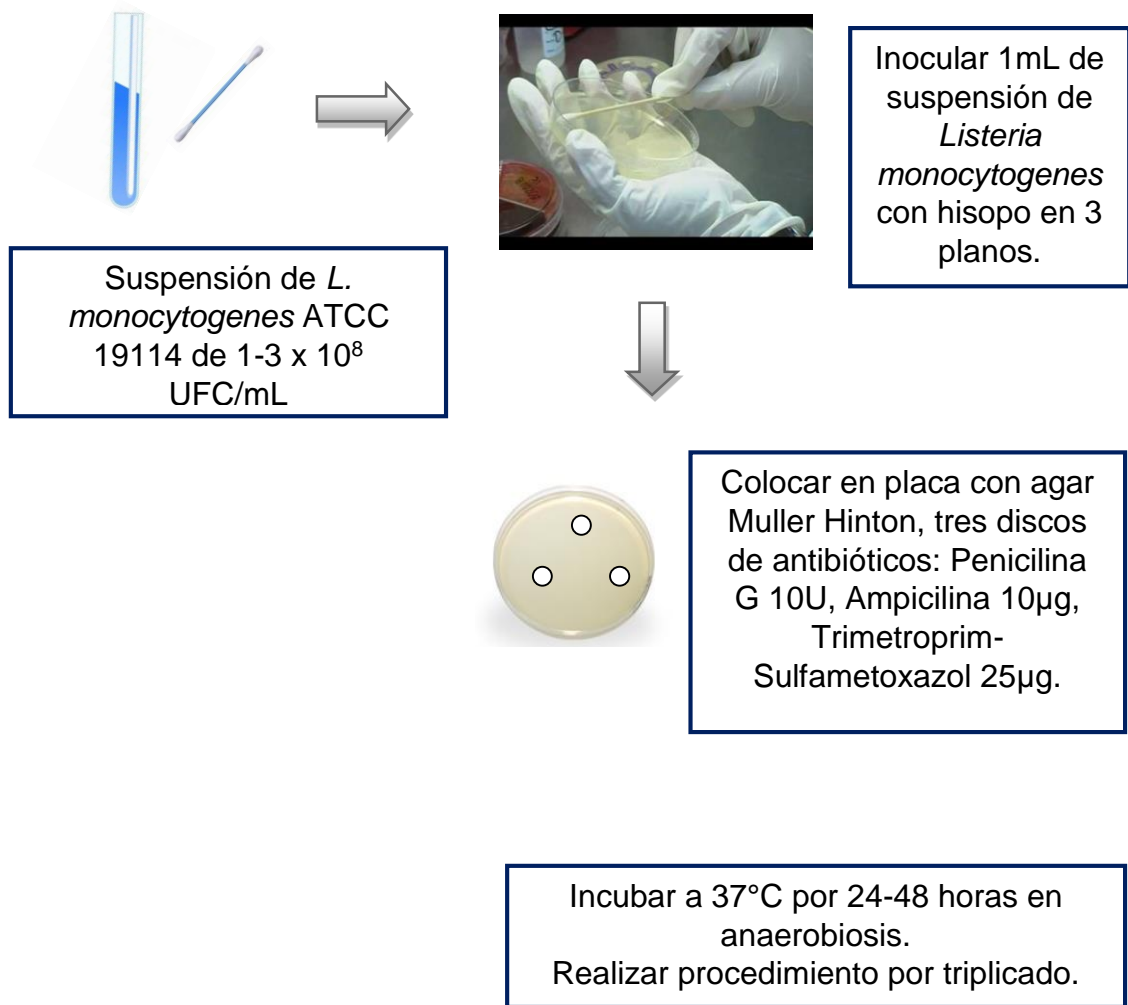


Figura N° 53: Patrón de referencia para ensayo de Antagonismo microbiano usando la técnica de Difusión en Agar por medio de Pozos y Discos.

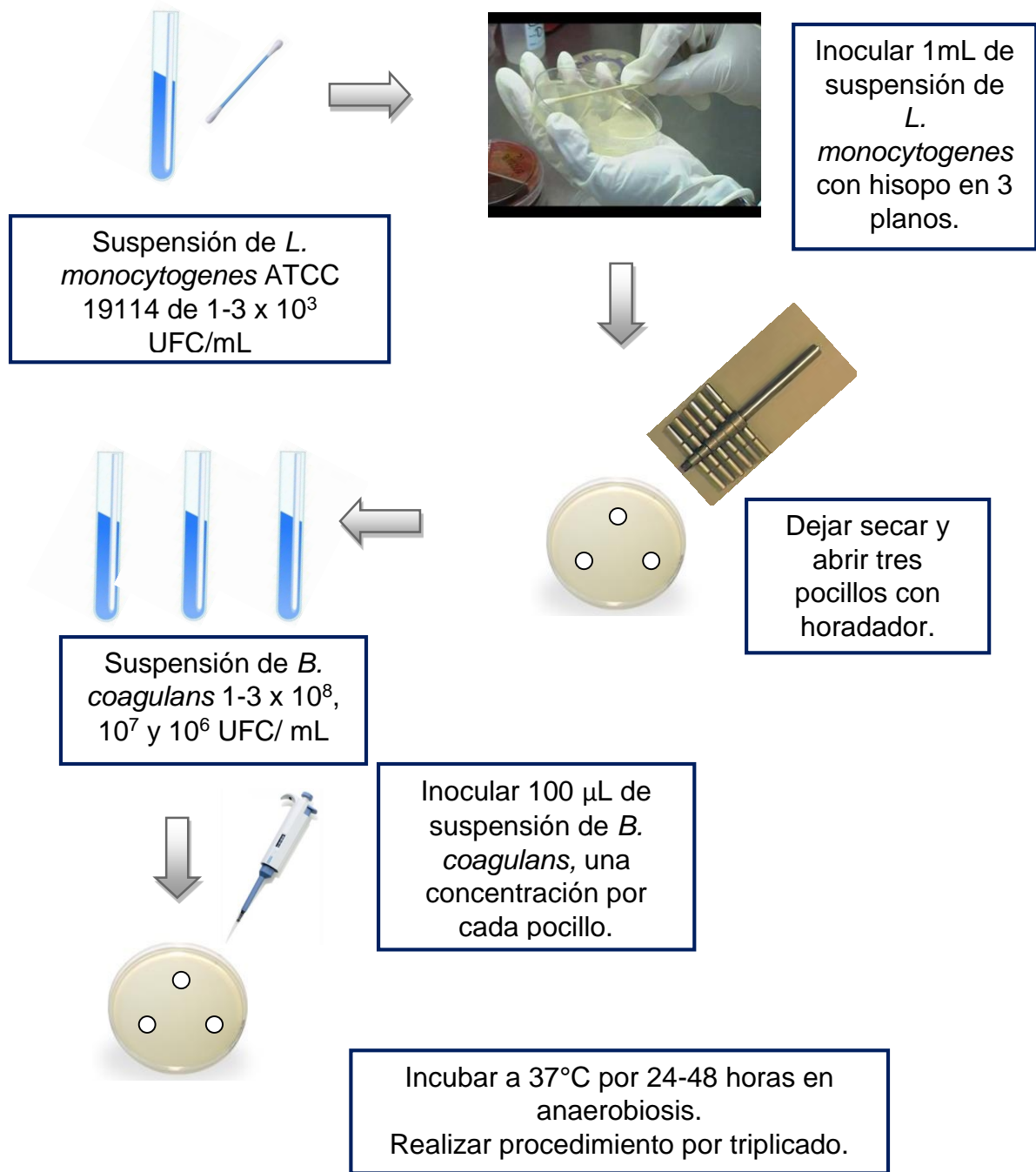


Figura N° 54: Ensayo de Antagonismo microbiano usando la técnica de Difusión en Agar por medio de Pozos.

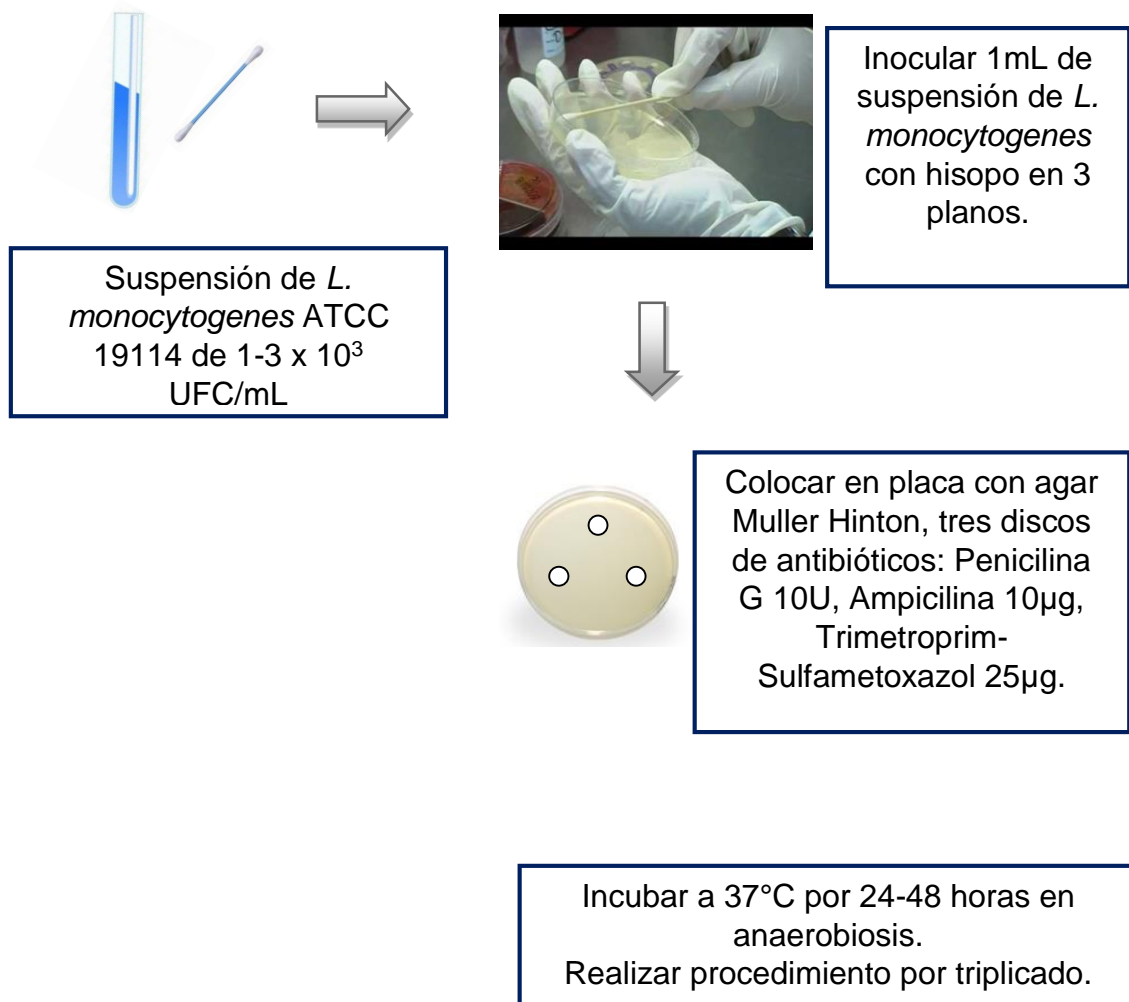


Figura N° 56: Patrón de referencia para ensayo de Antagonismo microbiano usando la técnica de Difusión en Agar por medio de Pozos y Discos.

ANEXO N° 14

Cuadro N° 10: Tamaño de zonas de inhibición y su interpretación para quimioterapéuticos de uso frecuente. ⁽³⁶⁾

Antibiotic or Chemotherapeutic Agent	Disk Potency	Inhibition Zone Diameter to Nearest Millimeter		
		Resistant	Intermediate	Sensitive
Ampicillin				
<i>S. aureus</i>	10 µg.	20 or less	21-28	29 or more
All other organisms	10 µg.	11 or less	12-13	14 or more
Bacitracin	10 units	8 or less	9-12	13 or more
Cephalothin	30 µg.	14 or less	15-17	18 or more
Chloramphenicol	30 µg.	12 or less	13-17	18 or more
Colistin	10 µg.	8 or less	9-10	11 or more
Erythromycin	15 µg.	13 or less	14-17	18 or more
Kanamycin	30 µg.	13 or less	14-17	18 or more
Lincomycin§	2 µg.			17 or more
Methicillin	5 µg.	9 or less	10-13	14 or more
Nalidixic acid*	30 µg.	13 or less	14-18	19 or more
Neomycin	30 µg.	12 or less	13-16	17 or more
Nitrofurantoin*	300 µg.	14 or less	15-16	17 or more
Novobiocin†	30 µg.	17 or less	18-21	22 or more
Oleandomycin	15 µg.	11 or less	12-16	17 or more
Penicillin-G	10 units	20 or less	21-28	29 or more
Polymyxin-B	300 units	8 or less	9-11	12 or more
Streptomycin	10 µg.	11 or less	12-14	15 or more
Sulfonamides‡	300 µg.	12 or less	13-16	17 or more
Tetracycline	30 µg.	14 or less	15-18	19 or more
Vancomycin	30 µg.	9 or less	10-11	12 or more

ANEXO N° 15

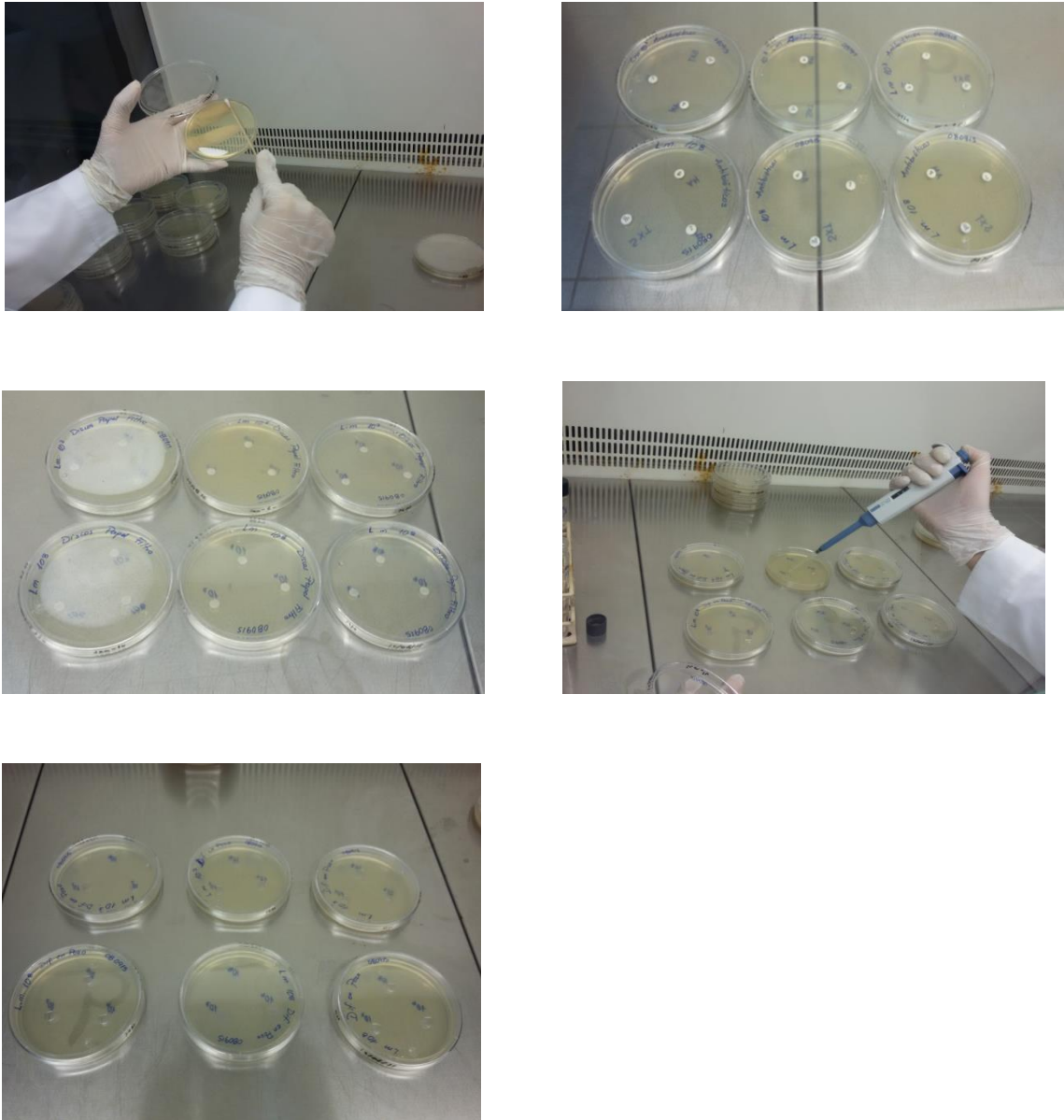


Figura N° 57: Ensayo de Antagonismo microbiano por medio de la técnica de discos y pozos.

ANEXO N° 16

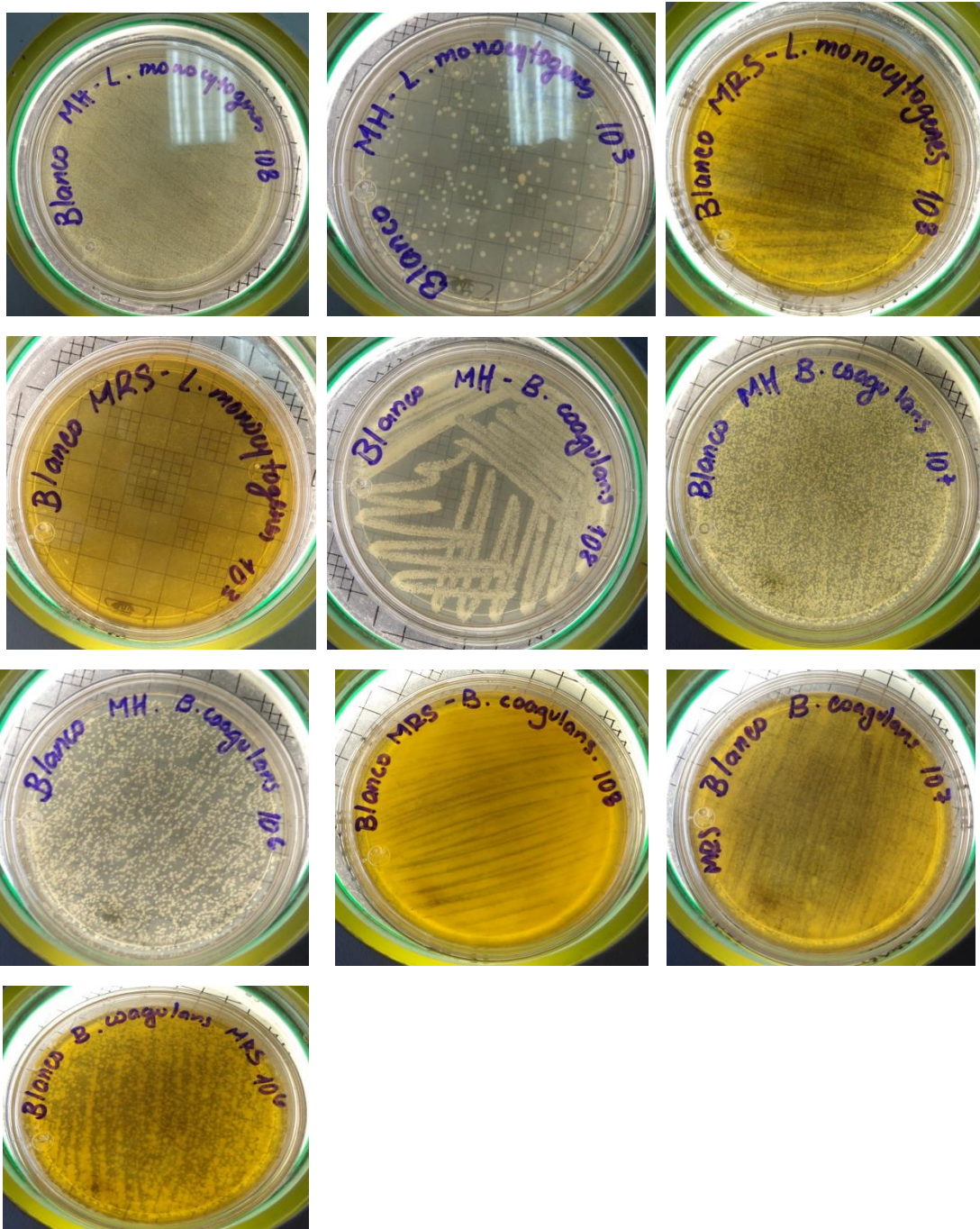


Figura N° 58: Blancos de microorganismos utilizados en los ensayos de antagonismo microbiano

ANEXO N° 17

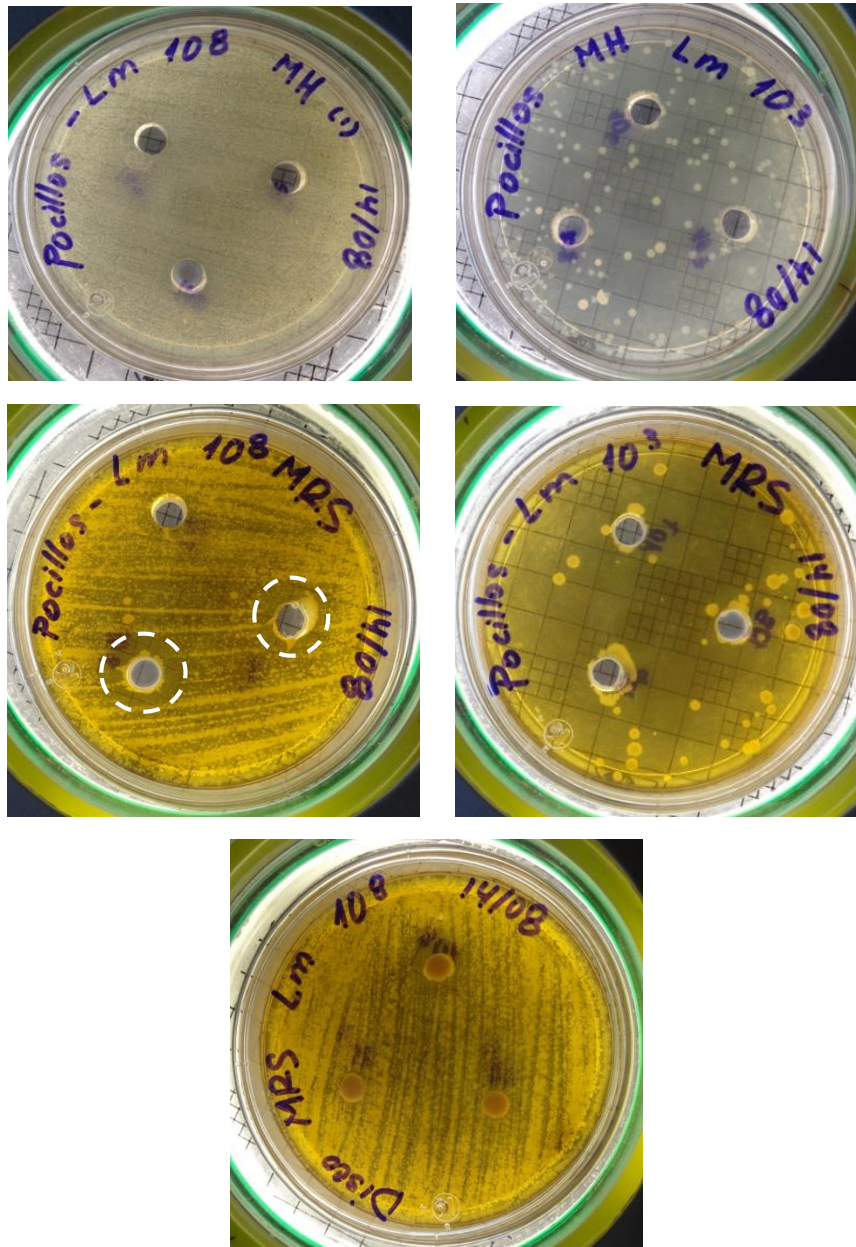


Figura N° 59: Resultados del ensayo de antagonismo microbiano por la técnica de difusión en pozos.

ANEXO N° 18

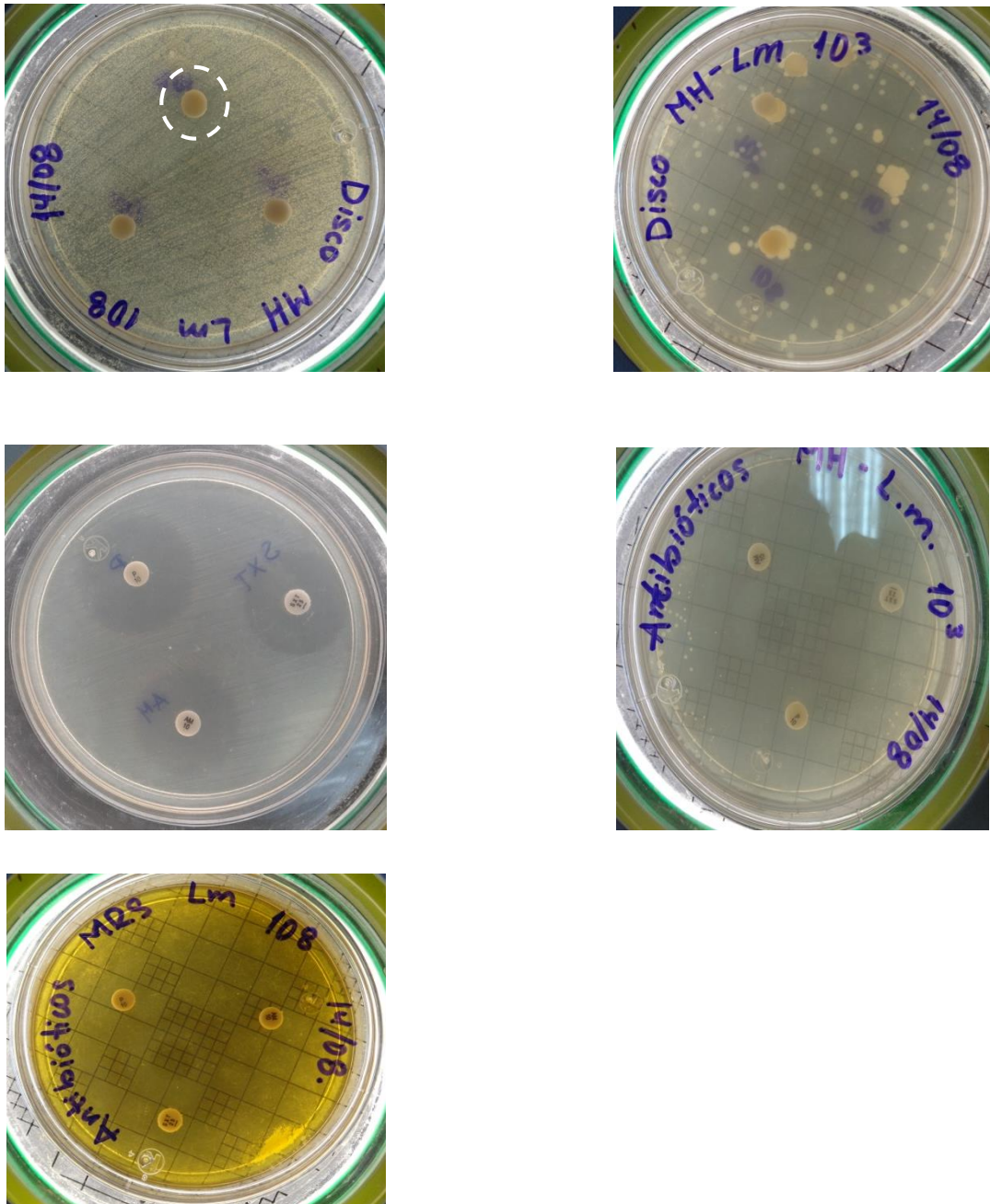


Figura N° 60: Resultados del ensayo de antagonismo microbiano por la técnica de difusión por discos y patrones de antibióticos.

ANEXO N° 19
CALCULOS PARA LA COMPROBACIÓN PORCENTUAL DE LAS ZONAS DE
INHIBICIÓN OBTENIDAS EN EL ENSAYO DE ANTAGONISMO
MICROBIANO

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{DBC}}{\text{DA}} \times 100$$

- **Difusión por disco en agar Mueller Hinton**

Concentración de *L. monocytogenes*: 5.0×10^8

Antibiótico de comparación: Penicilina G

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{11 \text{ mm}}{28 \text{ mm}} \times 100 = 39.29\%$$

Antibiótico de comparación: Ampicilina

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{11 \text{ mm}}{25 \text{ mm}} \times 100 = 44.0\%$$

Antibiótico de comparación: Trimetroprim-Sulfametoxazol

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{11 \text{ mm}}{25 \text{ mm}} \times 100 = 44.0\%$$

- **Difusión por disco en agar MRS**

Concentración de *L. monocytogenes*: 5.0×10^8

Antibiótico de comparación: Penicilina G

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{14 \text{ mm}}{28 \text{ mm}} \times 100 = 50.0\%$$

Antibiótico de comparación: Ampicilina

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{14 \text{ mm}}{25 \text{ mm}} \times 100 = 56.0\%$$

Antibiótico de comparación: Trimetoprim-Sulfametoxazol

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{14 \text{ mm}}{25 \text{ mm}} \times 100 = 56.0\%$$

- **Difusión por pozos en agar MRS**

Concentración de *L. monocytogenes*: 5.0×10^8

Concentración de *B. coagulans*: 2.0×10^8

Antibiótico de comparación: Penicilina G

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{16 \text{ mm}}{28 \text{ mm}} \times 100 = 57.0\%$$

Antibiótico de comparación: Ampicilina

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{16 \text{ mm}}{25 \text{ mm}} \times 100 = 64.0\%$$

Antibiótico de comparación: Trimetroprim-Sulfametoxazol

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{16 \text{ mm}}{25 \text{ mm}} \times 100 = 64.0\%$$

Concentración de *B. coagulans*: 2.0×10^7

Antibiótico de comparación: Penicilina G

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{14 \text{ mm}}{28 \text{ mm}} \times 100 = 50.0\%$$

Antibiótico de comparación: Ampicilina

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{14 \text{ mm}}{25 \text{ mm}} \times 100 = 56.0\%$$

Antibiótico de comparación: Trimetroprim-Sulfametoxazol

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{14 \text{ mm}}{25 \text{ mm}} \times 100 = 56.0\%$$

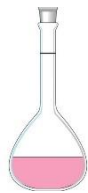
ANEXO N° 20
PROCESO DE ESTANDARIZACIÓN DE McFARLAND



Pesar 1.175 g de Cloruro de Bario (BaCl_2)



Agregar el BaCl_2 a un beaker con capacidad para 100 mL e incorporar 15 mL de agua desmineralizada, agitar hasta homogenizar y traspasar a un balón volumétrico de 100.0 mL



Aforar con agua Desmineralizada y rotular.



Realizar dos lavados más al beaker anterior con 5 mL de agua desmineralizada y trasegar al balón volumétrico.

Figura N° 61: Preparación de la solución de Cloruro de Bario 1.175%p/v.

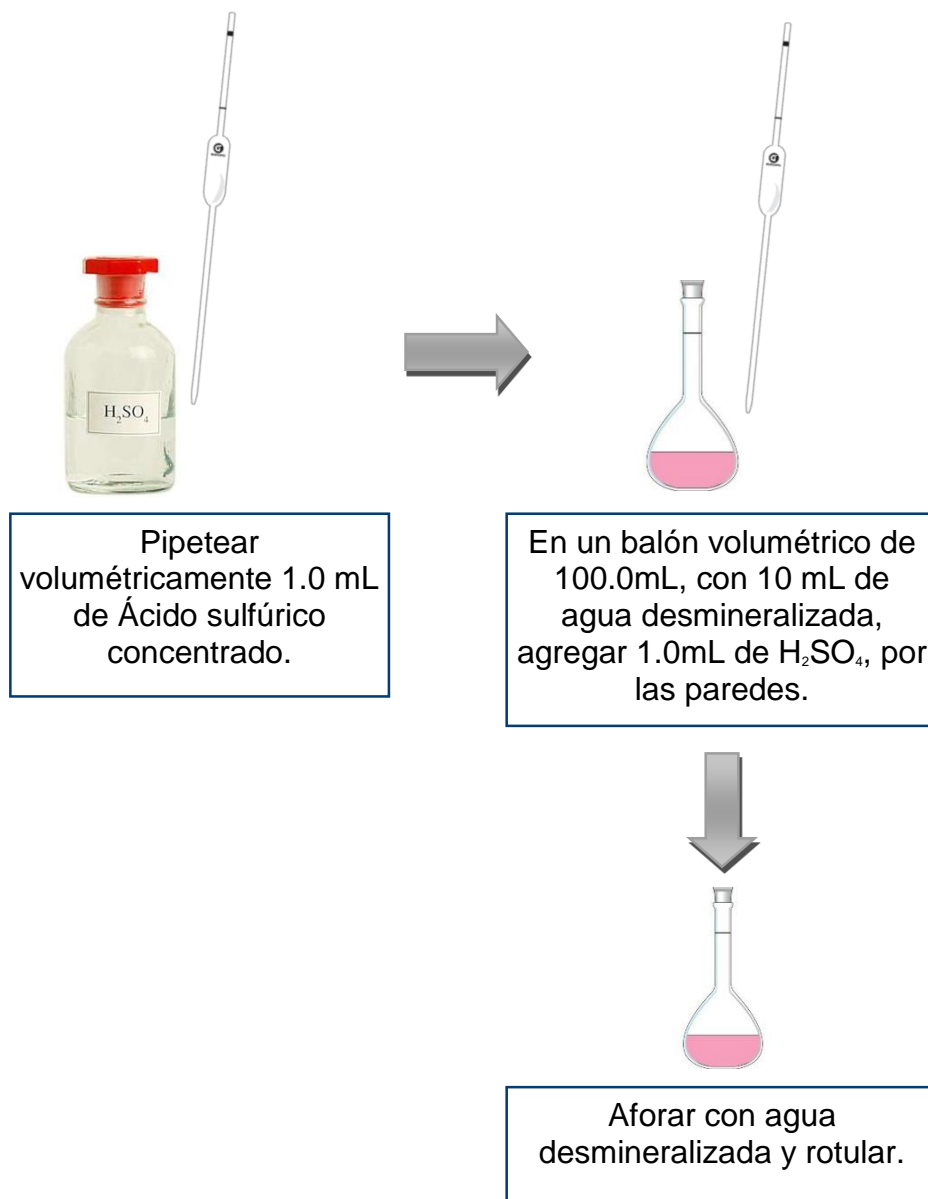


Figura N° 62: Preparación de la solución de Ácido Sulfúrico 1%v/v.

Tabla N° 10: Preparación de los estándares de McFarland

Estándar N°	Volumen (ml)		Equivalente en N° de bacterias/ml ($\times 10^8$)
	BaCl ₂ (1,175 %)	H ₂ SO ₄ (1 %)	
0.5	0.5	99.5	1.5
1	1.0	99.0	3
2	2.0	98.0	6
3	3.0	97.0	9
4	4.0	96.0	12
5	5.0	95.0	15
6	6.0	94.0	18
7	7.0	93.0	21
8	8.0	92.0	24
9	9.0	91.0	27
10	10.0	90.0	30

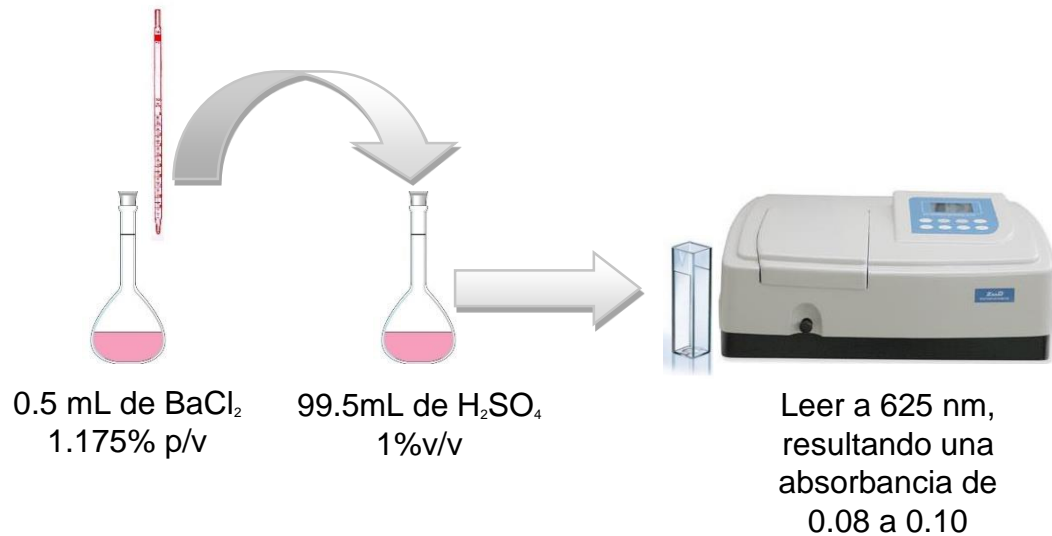


Figura N° 63: Esquema de preparación del estándar de 0.5 de McFarland.

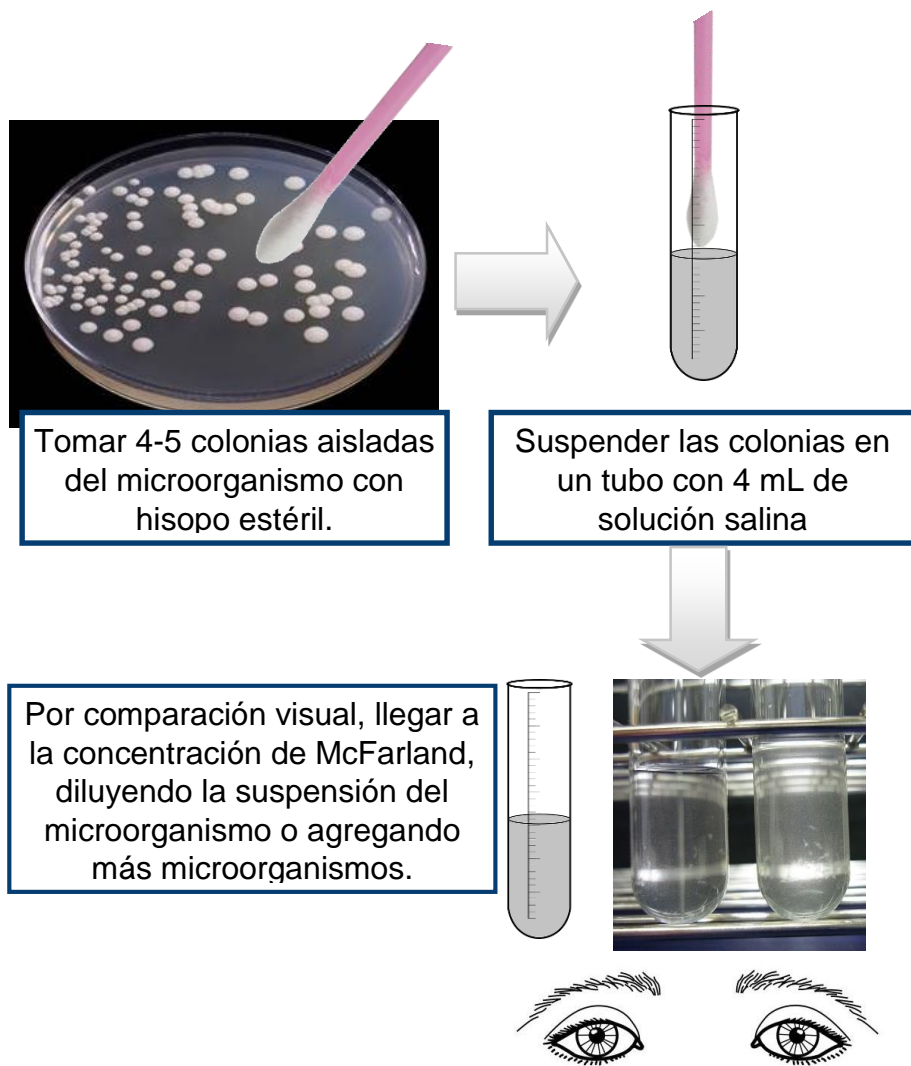


Figura N° 64: Esquema general para la preparación de la suspensión de microorganismo de prueba.

ANEXO N° 21

**EVALUACIÓN DEL *Bacillus coagulans* FRENTE A LA RESISTENCIA
ANTE EL PH ÁCIDO DEL ESTÓMAGO Y A SALES BILIARES.**

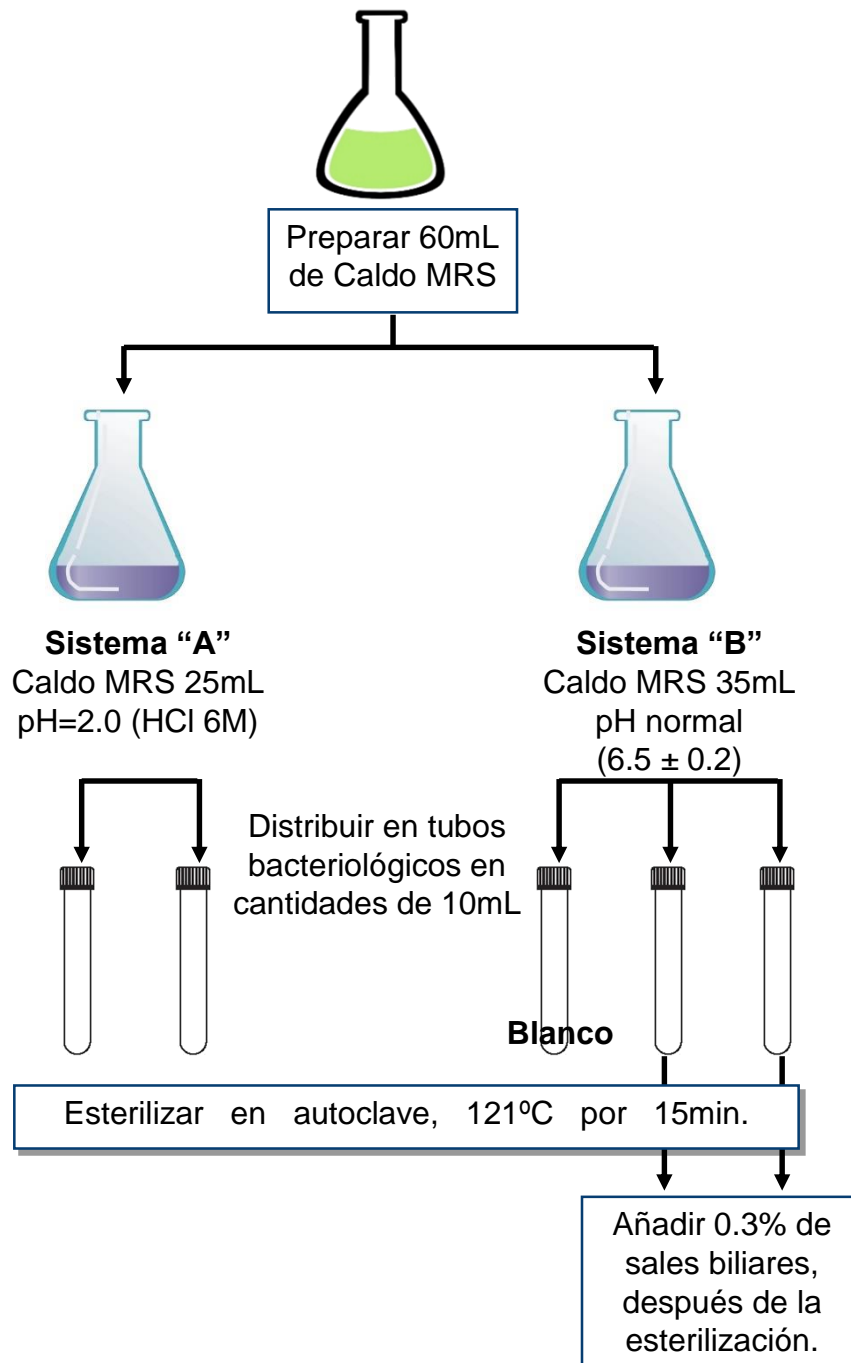


Figura N° 65: Preparación de sistemas "A" y "B", para la evaluación del *Bacillus coagulans* frente a la resistencia contra el pH ácido del estómago y a sales biliares.

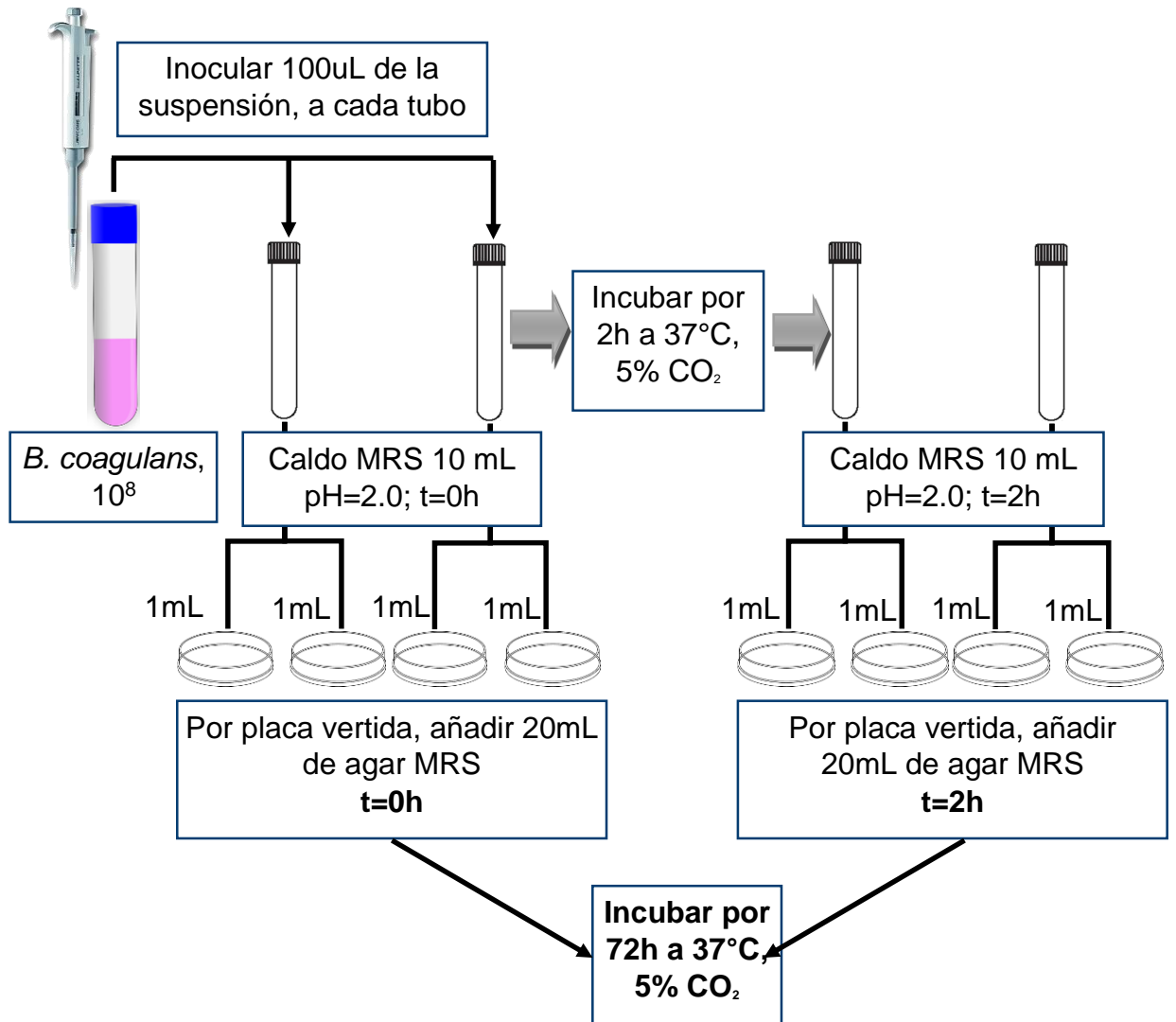


Figura N° 66: Evaluación del *Bacillus coagulans* frente a la resistencia contra el pH ácido del estómago.

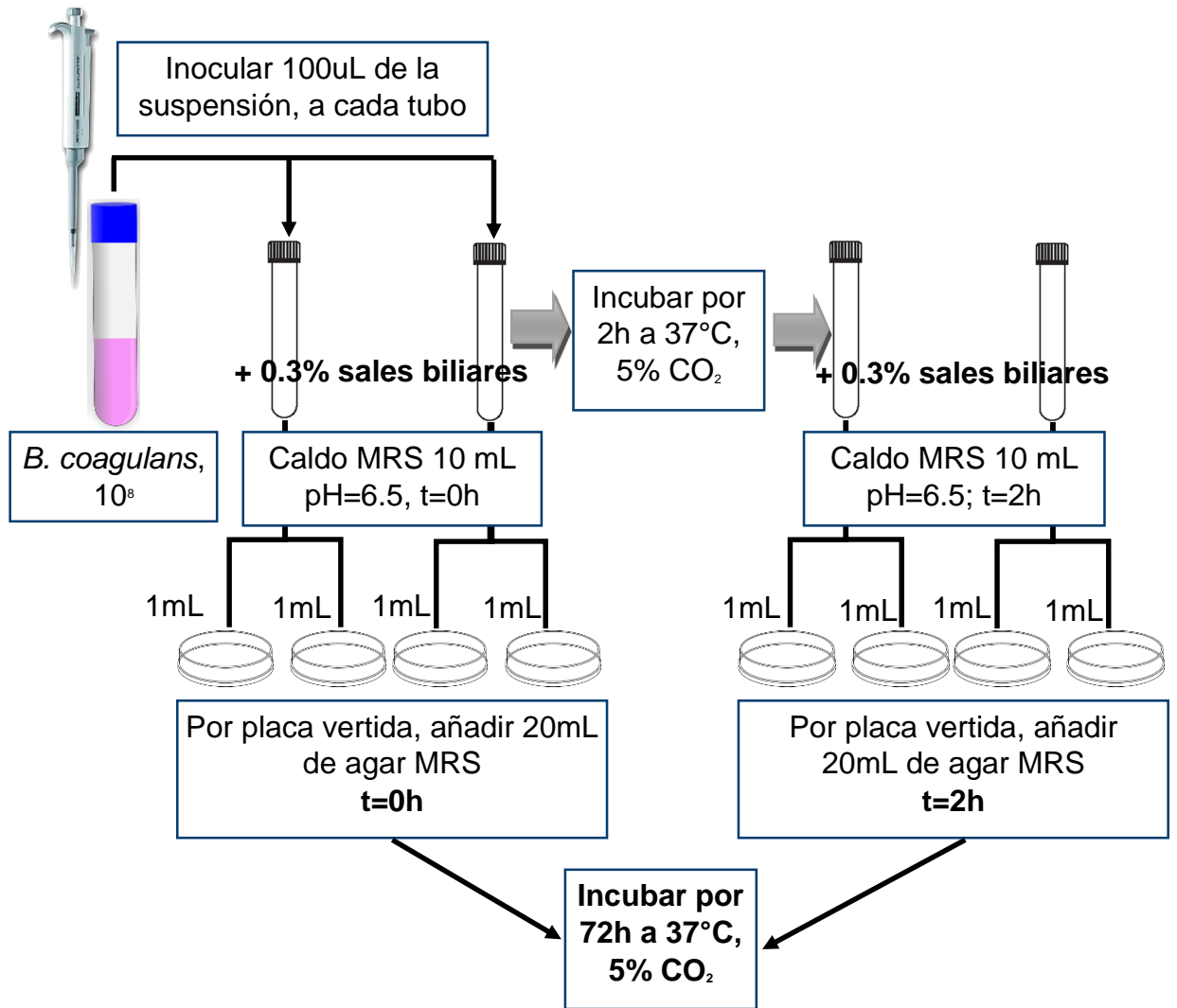


Figura N° 67: Evaluación del *Bacillus coagulans* frente a la resistencia contra a sales biliares.

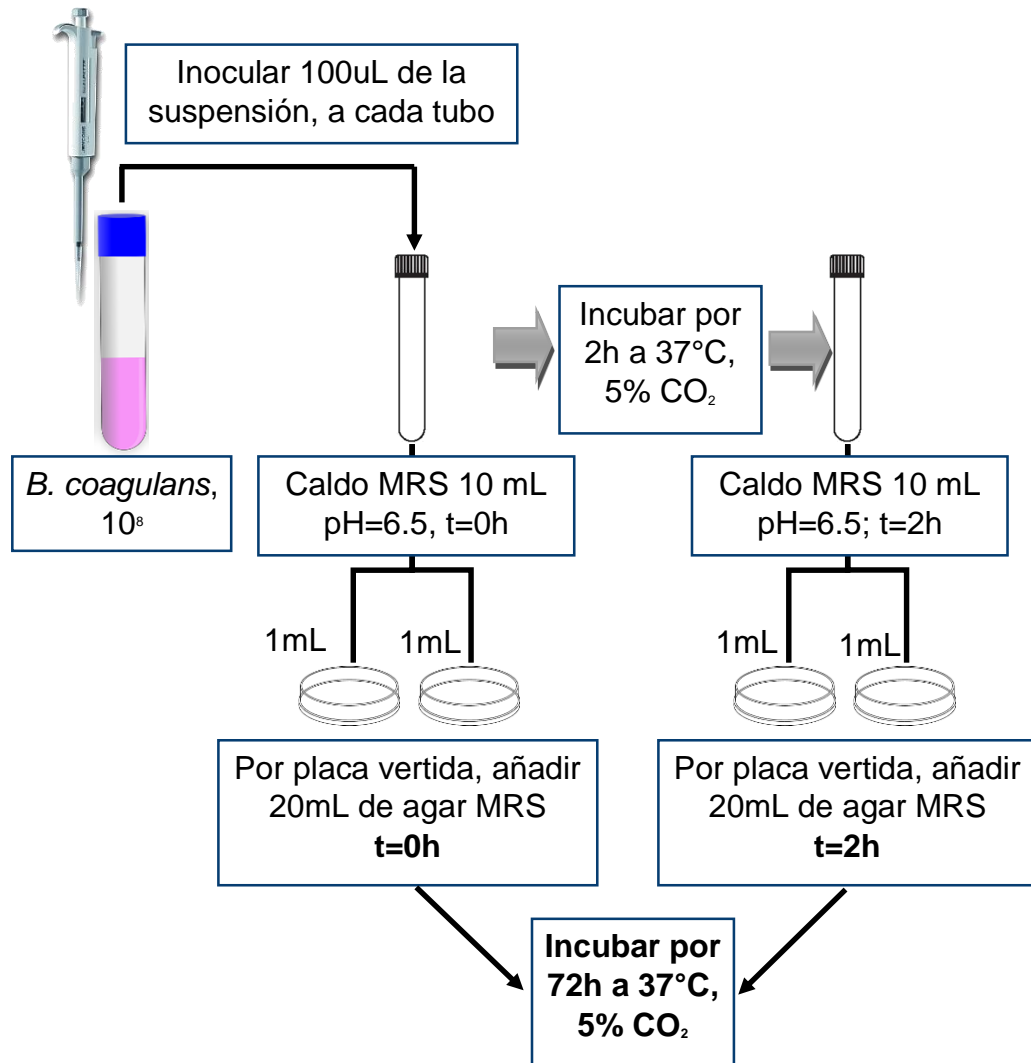


Figura N° 68: Procedimiento para preparar el blanco para la evaluación del *Bacillus coagulans* frente a la resistencia contra el pH ácido del estómago y a sales biliares.

ANEXO N° 22



Figura N° 69: Evaluación del *Bacillus coagulans* frente a la resistencia contra el pH ácido del estómago y a sales biliares.

ANEXO N° 23

CALCULOS DEL PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA DEL *Bacillus coagulans* FRENTE A LA RESISTENCIA ANTE EL PH ACIDO DEL ESTOMAGO Y A SALES BILIARES.

$$\% = \frac{\text{LogUFCN1}}{\text{LogUFCBo}} \times 100$$

- Sistema "A":

t=0h

$$\% = \frac{\text{Log} (2.40\text{E}+03)}{\text{Log} (7.65\text{E}+03)} \times 100 = 87.04\%$$

t=2h

$$\% = \frac{\text{Log} (2.33\text{E}+03)}{\text{Log} (1.05\text{E}+04)} \times 100 = 83.72\%$$

- Sistema "B":

t=0h

$$\% = \frac{\text{Log} (6.00\text{E}+02)}{\text{Log} (7.65\text{E}+03)} \times 100 = 87.04\%$$

t=2h

$$\% = \frac{\text{Log} (1.48\text{E}+03)}{\text{Log} (1.05\text{E}+04)} \times 100 = 83.72\%$$