

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSGRADO



DOCTORADO EN CIENCIAS

MENCIÓN: SALUD

TESIS

“EVALUACIÓN *in vitro* DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS DE USO ALIMENTARIO O TERAPÉUTICO HUMANO”

Para optar el Grado Académico de

DOCTOR EN CIENCIAS

Presentada por:

CARMEN EDDY MEDINA RODRÍGUEZ

ASESOR:

DR. CARLOS ROSALES LOREDO

CAJAMARCA, PERÚ

2017

COPYRIGHT © 2017 by
CARMEN EDDY MEDINA RODRÍGUEZ
Todos los derechos reservados

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSGRADO



DOCTORADO EN CIENCIAS

MECIÓN: SALUD

TESIS APROBADA

“EVALUACIÓN *in vitro* DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS DE USO ALIMENTARIO O TERAPÉUTICO HUMANO”

Para optar el Grado Académico de

DOCTOR EN CIENCIAS

Presentada por:

CARMEN EDDY MEDINA RODRÍGUEZ

Comité Científico

Dr. Carlos Rosales Loredo
Asesor

Dra. Marina Estrada Pérez
Miembro de Comité Científico

Dr. Corpus Cerna Cabrera
Miembro de Comité Científico

Dr. Homero Bazán Zurita
Miembro de Comité Científico

Cajamarca – Perú
2017



Universidad Nacional de Cajamarca

Escuela de Post Grado

CAJAMARCA - PERU

PROGRAMA DE DOCTORADO

ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

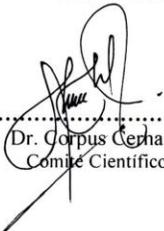
DOCTORADO EN CIENCIAS

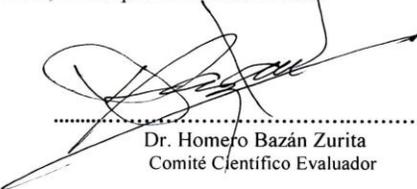
MENCION: SALUD

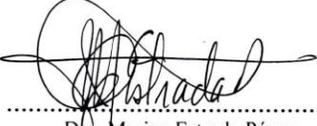
Siendo las cinco de la tarde del día jueves catorce de setiembre del año dos mil diecisiete, reunidos en el auditorio de la Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, el Comité Científico Evaluador, presidido por la Dra. Marina Estrada Pérez; Dr. Corpus Cerna Cabrera, Dr. Homero Bazán Zurita como integrantes del jurado titular; y en calidad de Asesor, el Dr. Carlos Rosales Loredó. Actuando de conformidad con el Reglamento Interno de la Escuela de Posgrado y el Reglamento del Programa de Doctorado de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, se dio inicio a la SUSTENTACIÓN de la tesis titulada "EVALUACIÓN *in vitro* DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS DE USO ALIMENTARIO O TERAPÉUTICO HUMANO", presentada por la M.Cs. CARMEN EDDY MEDINA RODRÍGUEZ con la finalidad de optar el Grado Académico de DOCTOR EN CIENCIAS, Mención SALUD.

Realizada la exposición de la Tesis y absueltas las preguntas formuladas por el Comité Científico Evaluador, y luego de la deliberación, se acordó *ADMITIR*..... con la calificación de *A.B. (EXCELENTE)*..... la mencionada Tesis; en tal virtud, la M.Cs. CARMEN EDDY MEDINA RODRÍGUEZ está apta para recibir en ceremonia especial el Diploma que lo acredita como DOCTOR EN CIENCIAS, Mención SALUD.

Siendo las *18:00* horas del mismo día, se dio por concluido el acto.


.....
Dr. Corpus Cerna Cabrera
Comité Científico Evaluador


.....
Dr. Homero Bazán Zurita
Comité Científico Evaluador


.....
Dra. Marina Estrada Pérez
Presidente Comité Científico Evaluador

A Dios y la Virgen Santísima, y a todas las personas que con su apoyo,
me permitieron llegar a la culminación de la presente tesis.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y la Virgen, por haberme guiado durante todo el desarrollo y la culminación de la presente tesis y ser mi fuerza espiritual cada día.

A mi Asesor el Dr. Carlos Rosales Loredó, por su apoyo y continua orientación en la mejora del trabajo de investigación realizado.

A los integrantes del Comité Científico, quienes con sus conocimientos, experiencia, y motivación constantes hicieron posible la culminación satisfactoria de esta investigación.

De manera especial al Dr. Tito Urquiaga Melquiades, gran amigo, quien con su continuo apoyo hizo posible la culminación de mi tesis.

A todos los miembros de la maravillosa familia que Dios me ha regalado, ya que son fuente de motivación y deseo de superación constante.

A las personas que de una u otra forma contribuyeron a la realización de la presente tesis, sin cuyo aporte no hubiese sido posible culminarla.

Desde lo más profundo, un agradecimiento especial a mis amigos, por haberme animado constantemente en la ejecución del presente trabajo.

ÍNDICE

Ítem	Páginas
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
LISTA DE ABREVIACIONES	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo General de la Investigación	6
1.2. Objetivos Específicos de la Investigación	6
CAPITULO II. MARCO TEÓRICO	7
2.1. Antimicrobianos	7
2.1.1. Antibióticos	8
2.1.2. Espectro antibacteriano	9
2.1.3. Clasificación de los antibióticos	9
2.1.4 Técnicas de Estudio de sensibilidad a los antimicrobianos	12
2.1.5. Métodos para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana <i>in vitro</i>	15
2.1.6. Espectro de acción de los antimicrobianos	19
2.2. Probióticos	20
2.2.1. Definición	20
2.2.2. Criterios para la clasificación de un microorganismo como probiótico	24
2.2.3. Características de los probióticos	27
2.2.4. Evaluación de los probióticos para uso alimentario	29
2.2.5. Mecanismo de acción de los probióticos	31
2.2.6. Productos alimenticios probióticos para uso humano	42
2.2.7. Microorganismos más comúnmente usados como probióticos	45

Ítem	Páginas
2.3. Probióticos y Salud	47
2.4. Probióticos y Ecosistema Microbiano	49
2.4.1. Ecosistema Microbiano	49
2.4.2. Microbiota Intestinal	51
2.4.3. Composición de la Microbiota Intestinal	52
2.4.4. Factores que influyen en la composición de la microbiota	54
2.4.5. Adquisición de la Microbiota intestinal	56
2.4.6. Funciones de la Microbiota intestinal	58
2.4.7. Manipulación de la Microbiota intestinal	61
CAPÍTULO III. DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS	62
3.1. Hipótesis	62
3.2. Diseño de investigación	62
3.3. Localización del estudio	62
3.4. Población, muestra y Unidad de análisis,	63
3.5. Descripción del Diseño Metodológico	64
3.6. Procesamiento y Análisis de Datos	70
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	102
5.1. Conclusiones	102
5.2. Recomendaciones	104
LISTA DE REFERENCIAS	105
APÉNDICES	145
ANEXOS	147

LISTA DE TABLAS

Tablas	Páginas
Tabla 1. Lista de los microorganismos probióticos más utilizados	47
Tabla 2. Patrones estándar del halo de inhibición para Enterobacteriaceae	74
Tabla 3. Patrones estándar del halo de inhibición para <i>Enterococcus</i>	77
Tabla 4. Patrones estándar del halo de inhibición para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	82
Tabla 5. Patrones estándar del halo de inhibición para <i>Staphylococcus aureus</i>	87
Tabla 6. Porcentajes globales del grado de sensibilidad de los patógenos comunes frente a los 23 probióticos comerciales	92
Tabla 7. Medias totales de los halos de inhibición en mm. de los probióticos evaluados.	97

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Páginas
Figura A. Contribución de los probióticos a la función barrera.	35
Figura 1. Efecto de probióticos sobre <i>Escherichia coli</i> de origen fecal.	73
Figura 2. Efecto de probióticos sobre <i>Enterococcus</i> sp.	76
Figura 3. Efecto de probióticos sobre <i>Edwardsiella</i> sp.	78
Figura 4. Efecto de probióticos sobre <i>Klebsiella</i> sp.	80
Figura 5. Efecto de probióticos sobre <i>Pseudomonas</i> sp.	81
Figura 6. Efecto de probióticos sobre <i>Proteus vulgaris</i>	83
Figura 7. Efecto de probióticos sobre <i>Shiguella</i> sp.	85
Figura 8. Efecto de probióticos sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	86
Figura 9. Efecto de probióticos sobre <i>Salmonella paratyphi</i> A	88
Figura 10. Efecto de probióticos sobre <i>Salmonella paratyphi</i> B	89
Figura 11. Efecto de probióticos sobre <i>Salmonella typhi</i>	90
Figura 12. Porcentajes globales del grado de sensibilidad de los patógenos comunes frente a los 23 probióticos comerciales evaluados en la presente investigación	92
Figura 13. Medias totales de los halos de inhibición en mm. de los probióticos evaluados	98

LISTA DE ABREVIACIONES

BAL	Bacterias Ácido Lácticas
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CMI	Concentración Mínima Inhibidora
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FFC	Functional Food Centre
GRAS	Generally Regarded as Safe (Generalmente considerado como seguro)
IBS	Síndrome del intestino irritable (irritable bowel síndrome)
ISAPP	Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos)
M.R.S.	Man, Rogosa and Sharpe
MH	Müller–Hinton
MI	Microbiota Intestinal
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
OMS	Organización Mundial de la Salud
SNC	Sistema Nervioso Central
TGI	Tracto Gastrointestinal

RESUMEN

El presente estudio determinó *in vitro* el efecto inhibitorio de los microorganismos probióticos de uso alimentario o terapéutico humano que se expenden en nuestro país, sobre las bacterias patógenas comunes, comparado con el espectro de sensibilidad a los antibióticos establecido para la terapia antibacteriana convencional. Se recuperó las cepas probióticas y se evaluó el efecto antibacteriano de los microorganismos probióticos con el método de Kirby Baüer midiéndose los halos de inhibición del crecimiento de las bacterias patógenas. Se utilizó 11 cepas patógenas y 23 productos probióticos que se expenden en el mercado nacional. Existió diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los efectos de los productos probióticos utilizados. Los probióticos evaluados, en mayoría 66,8% poseen potenciales efectos bactericidas o bacteriostáticos sobre las bacterias patógenas encontrándose dentro del rango de sensibilidad completa o de sensibilidad intermedia y en un 33,2%, sensibilidad intermedia baja o de completa resistencia. Se concluyó que los niveles de inhibición, *in vitro*, del crecimiento de patógenos bacterianos comunes, por los probióticos que se comercializan en nuestro país, son comparables con los efectos establecidos en los parámetros convencionales sobre la actividad antibacteriana de los antibióticos recomendados oficialmente para el tratamiento de infecciones causadas por dichos patógenos.

Palabras clave:

Probiótico, efecto inhibitorio, patógeno, espectro de sensibilidad, antibacteriano

ABSTRACT

The present study determined *in vitro* the inhibitory effect of the probiotic microorganisms for human food or therapeutic use which are sold in our country, on common pathogenic bacteria, compared with the spectrum of sensitivity to antibiotics established for conventional antibacterial therapy. The probiotic strains were recovered and the antibacterial effect of the probiotic microorganisms was evaluated with the Kirby Bäuier's method, measuring the halos of inhibition of the growth of the pathogenic bacteria. We used 11 pathogenic strains and 23 probiotic products that are sold in the national market. There were significant differences ($p < 0.05$) between the effects of the probiotic products used. The probiotics evaluated, had 66.8% of bactericidal or bacteriostatic effects on pathogenic bacteria being within the range of complete sensitivity or intermediate sensitivity and 33.2% had low intermediate sensitivity or complete resistance. It was concluded that the levels of inhibition, *in vitro*, of the growth of common bacterial pathogens, by the probiotics that are commercialized in our country, are comparable with the effects established in the conventional parameters on the antibacterial activity of the antibiotics officially recommended for the treatment of infections caused by these pathogens.

Key words: Probiotic, inhibitory effect, pathogen, spectrum of sensitivity, antibacterial

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La microbiota del intestino humano es reconocida como un órgano adicional de nuestro cuerpo(1;2), que promueve efectos beneficiosos para la salud del huésped (3) por sus funciones en: la nutrición(4), la estimulación del sistema inmune (5), la protección, el metabolismo, el mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal (6); presentando un ambiente desfavorable para los patógenos (7), por eso existe un creciente interés en desarrollar alimentos funcionales no sólo necesarios para vivir, sino también como fuente de bienestar mental y físico (8) que contribuyan a la prevención y reducción de factores de riesgo para algunas enfermedades o potencien ciertas funciones fisiológicas que predominen y promuevan el desarrollo de microorganismos beneficiosos al ser suministradas las cepas probióticas como suplementos en la dieta (9-12), propiciando así el mantenimiento del equilibrio microbiano (13).

Por otro lado, el equilibrio que existe a nivel de la microbiota intestinal es dinámico (14; 15) y puede ser alterado bajo la influencia de numerosos factores extrínsecos e intrínsecos (16; 17), siendo la administración de antibióticos la forma más común de provocar disbiosis en la microbiota (18-20). Ante esto, en los últimos años, estudios sobre la microbiota intestinal han resaltado que la adición de probióticos restablecería el equilibrio armonioso de la microbiota y además contribuiría al mantenimiento de microorganismos beneficiosos (21-24).

Debido a los beneficios, la manipulación de la microbiota intestinal representa un camino terapéutico y profiláctico (25) en términos de limitación o inhibición del crecimiento de enteropatógenos (26), modulación de la función de la microglía (27), tratamiento de trastornos gastrointestinales, alergias (28), reposición de la microbiota (29), modificación de la respuesta inmune (30), secreción de sustancias antimicrobianas (31), la reparación de la barrera epitelial (11;17), la neuromodulación que mejora la función cerebral actuando como “psicobióticos” (32-34).

Esto sucede, a través del eje microbiota-intestino-cerebro mediante el nervio vago, hay conexión del sistema nervioso central con la microbiota intestinal (35-38), dándose la restauración del desarrollo de microorganismos benéficos (39) y atribuyéndoles una serie de beneficios en la salud. Se ha generado un interés creciente en el desarrollo de productos que tengan la posibilidad de modificar la microbiota intestinal (34), mediante la ingesta dietética de probióticos (40) que permitirían promover las poblaciones de microorganismos beneficiosos para la salud (9; 41; 42).

Como se ha visto, los microorganismos probióticos tienen gran importancia médica y la industria alimentaria resalta los beneficios de los alimentos suplementados con microflora intestinal, a los cuales, se les atribuye la prevención y la mejora de muchas patologías y el tratamiento de otras (43). Sin embargo, cada cepa probiótica tiene propiedades únicas y diferentes y los efectos de una cepa específica no deben ser extrapolados a otras cepas (19; 44). La composición de la microbiota intestinal es diversa, hay grandes variaciones a nivel de especies bacterianas e incluso cada persona tiene su propia microbiota que es

única, como su firma, existiendo variaciones cualitativas y cuantitativas de un individuo a otro, relacionadas a la propia persona, a su raza y a su dieta (12; 42; 44-46).

Además, se ha examinado el efecto de la administración probiótica sobre la composición de la microbiota fecal, pero las muestras fecales son un reflejo incompleto y sesgado de lo que ocurre realmente en la microbiota (47), las comunidades bacterianas fecales son diferentes de las cercanas a la mucosa y no representan la totalidad de la microbiota adherida al epitelio intestinal, pueden no ser tan relevantes para la patogénesis, es difícil distinguir entre microorganismos nativos y colonizadores transitorios, ingeridos con la dieta o procedentes de tramos intestinales próximos (24;47, 48).

Por otro lado, existe información sobre la importancia de los beneficios que aportan los alimentos probióticos en la salud humana y la nutrición (49), por lo cual es aconsejable consumir estos alimentos, ya sea como suplemento dietético o como componentes activos de una medicación registrada (50) que contengan microorganismos que han permanecido viables con capacidad de multiplicarse en el tracto intestinal, alcanzar los lugares donde interactúan con el huésped y capaces de integrarse a la flora autóctona del organismo proporcionando efectos beneficiosos para la salud en general de los individuos que los consumen (17;51).

Estos productos con probióticos se están desarrollando como nuevos alimentos o suplementos dietéticos (52; 53) comercializándose para la profilaxis de los trastornos gastrointestinales o como alternativas en el uso de antibióticos (53; 54).

En el mercado se tiene numerosos productos con probióticos que afirman tener muchos efectos beneficiosos en la salud, sin embargo, todavía existen muchas brechas en el conocimiento, se necesita información científica y clínica para la recomendación de probióticos. El creciente interés científico y comercial en el uso de productos con probióticos ha intensificado el mercado global en los últimos años con una diversa gama de alimentos que contienen probióticos (55;56), el mercado de los probióticos está ganando gran impulso existiendo productos con cepas bacterianas y cantidad de microorganismos variables de un producto a otro. Sin embargo, entre las dificultades que se presentan es que no se podrían recomendar estos productos como terapéuticos por falta de una regulación científica establecida para controlar la calidad de los probióticos (56; 57). A pesar que se reporta la existencia en el mercado de numerosos productos probióticos con diferente composición y posiblemente con diferentes efectos (53), en nuestro país no se presenta la misma realidad ya que la cantidad y consumo de dichos productos es bajo a comparación de las cifras globales.

Por lo tanto el problema a resolver es ¿Cuál es el efecto antibacteriano de los microorganismos probióticos de uso alimentario o terapéutico humano que se expenden en nuestro país y el crecimiento de bacterias patógenas comunes en relación al espectro de sensibilidad a los antibióticos establecidos para la terapia antibacteriana convencional?

Con la evidencia de la existencia en el mercado peruano de productos probióticos es importante determinar si éstos mantienen un balance sano de microorganismos beneficiosos en las condiciones en que se los expende y consume. De allí la importancia de este estudio a través del cual se evaluó *in vitro* uno de los beneficios de los probióticos, el efecto antibacteriano, de los microorganismos probióticos de uso alimentario o terapéutico humano. De igual manera, se determinó comparativamente si dicho efecto se manifiesta a niveles comparables con los valores establecidos en el espectro de sensibilidad a los antibióticos convencionales usados para la terapia antibacteriana.

El presente estudio permitió un mejor conocimiento de las características de los probióticos de uso alimentario o terapéutico humano en nuestro país y sus potenciales efectos antibacterianos, teniendo en cuenta que dichos efectos pueden ser similares a los ejercidos por los antibióticos usados en la terapia antibacteriana convencional, lo que refuerza el conocimiento sobre el mejor aprovechamiento en beneficio de la salud humana. Se realizó el trabajo con el método de discos de sensibilidad, en el cual se evaluó los halos de inhibición del crecimiento bacteriano de bacterias patógenas.

El presente informe se presenta en capítulos. En el Capítulo I, se presenta la introducción y los objetivos de la investigación. En el Capítulo II, se trata el Marco teórico. En el Capítulo III, el diseño de contrastación de hipótesis. En el Capítulo IV, los

resultados y la discusión y en el Capítulo V, las conclusiones y sugerencias de la investigación.

OBJETIVOS

1.1. Objetivo general de la investigación

Determinar *in vitro* el efecto antibacteriano de los microorganismos probióticos de uso alimentario o terapéutico humano, que se expenden en nuestro país, sobre las bacterias patógenas comunes comparado con el espectro de sensibilidad a los antibióticos establecido para la terapia antibacteriana convencional.

1.2. Objetivos específicos de la investigación

1. Identificar los productos probióticos de uso alimentario o terapéutico humano que se expenden comercialmente, verificar su viabilidad a nivel de laboratorio y asegurar la producción de sus principios activos.
2. Determinar los niveles de inhibición de los probióticos de prueba sobre el crecimiento de bacterias patógenas comunes.
3. Comparar los niveles inhibitorios del crecimiento de bacterias patógenas comunes, por los probióticos probados, con el espectro de sensibilidad a los antibióticos establecido para la terapia antibacteriana convencional.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antimicrobianos

Los antimicrobianos son las sustancias que actúan contra los microorganismos (58), considerándose a los antibióticos como los antimicrobianos producidos por microorganismos vivos, y a los quimioterápicos como los compuestos producidos por síntesis química. Sin embargo, la quimioterapia con fines anticancerígenos se utilizó con éxito en 1946 (59). Así que la quimioterapia, en el sentido original de la palabra, no se usó en absoluto en relación con el cáncer, sino para describir las sustancias químicas que tenían efecto bactericida. Siendo los quimioterapéuticos considerados antimicrobianos, al igual que los antibióticos, los cuales son de origen natural, estando en contraste con los agentes quimioterapéuticos que son sintéticos (58).

En 1952, Selman A. Waksman, definió un antibiótico como "una sustancia química de origen natural que inhibe el crecimiento o las actividades metabólicas de bacterias y otros microorganismos" (58; 60). Después han aparecido antibióticos sintéticamente modificados (61), los cuales no son totalmente sintéticos, ya que todavía son producidos por microorganismos, y tampoco son 100% naturales, ya que han sido modificados químicamente en el laboratorio (58; 61).

Años después se consideró a los quimioterápicos como productos de síntesis química y con el avance de la producción se tiene antibióticos disponibles de origen

sintético o semisintético (62). Definiéndose a un antimicrobiano como cualquier sustancia de origen natural, semi-sintético o sintético que mata o inhibe el crecimiento de un microorganismo causando poco o ningún daño al huésped (63; 64).

2.1.1. Antibióticos

El descubrimiento de los antibióticos y agentes antibacterianos revolucionó el tratamiento de las enfermedades bacterianas infecciosas que mataron a millones de personas en todo el mundo durante la edad pre-antibiótica y después, con el transcurso del tiempo, se utilizan para mejorar la salud humana (65).

Se los ha definido de distintas maneras, así una de las definiciones se refiere a los antibióticos como “productos metabólicos naturales de los hongos, actinomicetos y las bacterias que matan o inhiben el crecimiento de los microorganismos” (66) o como un tipo de antimicrobiano, pero no todos los antimicrobianos son antibióticos (67), para otros autores son sustancias químicas producidas por un microorganismo que matan a las bacterias o inhiben el crecimiento bacteriano (68;69), también se los ha definido como un amplio grupo de sustancias químicas producidas por varias especies de microorganismos que suprimen el crecimiento de otros microorganismos, y originan su destrucción. Y así, el uso del término antibiótico se ha ampliado para incluir compuestos sintéticos que presentan también actividad antimicrobiana (70), siendo últimamente la definición de antibióticos, como los

compuestos sintetizados natural y artificialmente, sintética o semisintética capaz de inducir la muerte o la detención del crecimiento de otros microorganismos (71;72).

Se considera que los antibióticos alteran el equilibrio microbiano dentro del tracto gastrointestinal y tanto los antibióticos como los probióticos modifican la microbiota intestinal. Además los antibióticos, tienen un profundo impacto en la en la reducción de la diversidad ecológica del microbioma y los probióticos pueden restaurar el equilibrio natural de las bacterias en el tracto intestinal (73-77). Las pruebas *in vitro* son un reflejo del efecto de los antibióticos frente a microorganismos en condiciones de laboratorio y los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* se usan para seleccionar los agentes antibacterianos activos contra el germen causal (78).

2.1.2. Espectro antibacteriano

El espectro antibacteriano de un antibiótico es el conjunto de especies bacterianas cuyo desarrollo es inhibido por este antibiótico (79) o es el “rango de actividad de una sustancia contra los microorganismos” (80). También se interpreta como la “gama de actividad de un antimicrobiano frente a las bacterias” (81).

2.1.3. Clasificación de los Antibióticos

A. Según su espectro, basado en el número y tipos de bacterias que afectan, los antibióticos se subdividen en dos categorías (62):

- Antibióticos de limitado, reducido, estrecho o corto espectro:

Son los que actúan solamente sobre una variedad limitada de bacterias, eficaces contra un sector limitado de gérmenes, cocos grampositivos o gramnegativos, o bacilos grampositivos o espiroquetas (62; 81).

- Antibióticos de amplio espectro:

Son eficaces contra muchos tipos de bacterias, pueden inhibir una amplia gama de bacterias grampositivas y gramnegativas y también sobre otros microorganismos como rickettsias, micoplasmas, Chlamydia, Espiroquetas y Actinomycetos (62; 81).

B. Según su modo de acción o su efecto, los antibióticos pueden ser bacteriostáticos o Bactericidas.

- Efecto bacteriostático:

Se denomina efecto bacteriostático a la inhibición o detención del crecimiento bacteriano o del desarrollo de colonias (66; 79). Los microorganismos no crecen en presencia del antibiótico; pero tampoco mueren de forma inmediata. Si se elimina el antibiótico, los microorganismos pueden recuperarse y volver a crecer. Por acción del antibiótico bacteriostático los microorganismos cuyo crecimiento está detenido van muriendo con el paso del tiempo en presencia del antibiótico; sin embargo, este proceso de muerte es lento (82). Se tiene actividad bacteriostática, si la concentración de un antimicrobiano inhibe el crecimiento de

un microorganismo. Se determina *in vitro* probando una concentración estandarizada de microorganismos frente a una serie de diluciones del antimicrobiano en cuestión. La menor concentración que inhibe el crecimiento del microorganismo recibe la denominación de concentración mínima inhibidora (CMI) (81). Denominándose concentración mínima inhibidora de un antibiótico sobre un microorganismo, a la concentración mínima de dicho antibiótico que es capaz de impedir que dicho microorganismo siga multiplicándose o es capaz de inhibir completamente el inicio del crecimiento o el crecimiento de un microorganismo aislado bajo condiciones estandarizadas *in vitro*. También se lo define como la concentración más baja de un fármaco necesario para inhibir el crecimiento de un organismo usando una prueba estandarizada (71; 79; 81; 83).

○ Efecto bactericida:

Un antibiótico es bactericida cuando la presencia del antibiótico produce la muerte bacteriana siendo su acción terapéutica irreversible (66, 84). En la práctica se mide por la disminución de bacterias viables (capaces de reproducirse y dar origen a una colonia). Esta muerte puede ir acompañada de la lisis de las células y se habla entonces de antibiótico bacteriolítico) o no (79; 82). Asimismo hay actividad bactericida, si la concentración de un antimicrobiano destruye el microorganismo en prueba. Se determina *in vitro* exponiendo una concentración estandarizada de microorganismos frente a una serie de diluciones del antimicrobiano en cuestión. La menor concentración que

destruye el 99,9% de la población recibe la denominación de concentración mínima bactericida (CMB) (81).

2.1.4. Técnicas de estudio de sensibilidad a los antimicrobianos

El estudio de la sensibilidad *in vitro* de las bacterias a los antimicrobianos se realiza mediante métodos fenotípicos (técnicas de dilución y de difusión), bioquímicos y genéticos (85).

El Antibiograma

Los métodos fenotípicos (antibiograma) son los más utilizados. Consisten en enfrentar un inóculo bacteriano estandarizado a una única o a diferentes concentraciones de antibiótico (85). También conocido como pruebas de susceptibilidad *in vitro* a los antibióticos o antibioticogramas. Son métodos de laboratorio que estudian la sensibilidad de un microorganismo a la acción de los antibióticos y se usan para guiar la terapia (62). Consiste en probar *in vitro* la sensibilidad de una bacteria aislada de un paciente a los quimioterápicos (79).

Se distinguen tres tipos:

- **Antibiograma cuantitativo:** Aquel que permite obtener información gradual de esa susceptibilidad. Consiste en determinar una concentración inhibitoria mínima (CMI) de una o más drogas para la bacteria aislada del paciente, en ug/ ml o mg/ml. Se utiliza poco en la práctica asistencial (79).

- Antibiograma semicuantitativo: cuando evalúa si la bacteria es susceptible o no a una o dos concentraciones del fármaco. Estas concentraciones se fijan de acuerdo a las concentraciones de la droga *in vivo* (79).

- Antibiograma cualitativo: si el resultado expresa la característica de susceptibilidad o resistencia de un microorganismo frente a un antibiótico. Hay dos aspectos de este antibiograma que deben tomarse en cuenta:
 - No debe aceptarse que se prueben más de ocho discos por placa de Petri.
 - El medio de cultivo comúnmente utilizado es el Müller–Hinton (MH). Además una vez leídos y anotados los diámetros de los halos en milímetros, estos se comparan con los halos recomendados por las normas del NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), para establecer si se trata de una bacteria sensible, moderadamente sensible o resistente. Es el más empleado en la práctica asistencial y se lo conoce también como antibiograma de discos. Su resultado es resistente (R) o susceptible (S) sin especificar a qué concentraciones de droga es susceptible o resistente la bacteria (79). Para guiar la elección adecuada del tratamiento antibiótico, las bacterias se dividen en tres categorías: cepas susceptibles a los antibióticos, cepas resistentes y de susceptibilidad intermedia. Las categorías están designadas por las siglas S, R e I. considerando que se han producido cambios en los criterios interpretativos, particularmente en la categoría de susceptibilidad intermedia (86). Este antibiograma proporciona resultados cualitativos al clasificar las bacterias

como susceptibles, intermedias o resistentes (87). Siendo la definición para estos términos la siguiente:

- Susceptible (S): (antiguamente se le llamaba “sensible”)

Cuando un microorganismo es inhibido o destruido por las concentraciones que el antibiótico alcanza en suero a dosis habituales o por cualquier vía de administración, inclusive la vía oral (62; 79). De esta manera una cepa bacteriana es susceptible a un antibiótico dado cuando es inhibida *in vitro* por una concentración de este fármaco que está asociada con una alta probabilidad de éxito terapéutico. Estando la susceptibilidad determinada por la inhibición del crecimiento y no por muerte de la bacteria (88).

- Resistente (R):

Una cepa bacteriana es resistente a un antibiótico cuando está inhibida *in vitro* o destruida por una concentración de este fármaco que está asociada con una alta probabilidad de fracaso terapéutico (86; 88). Una cepa bacteriana es resistente cuando es inhibida por concentraciones del antibiótico que nunca son alcanzadas *in vivo* (79).

- Intermedio (I):

La sensibilidad de una cepa bacteriana a un antibiótico dado es intermedia cuando está inhibida *in vitro* por una concentración de este fármaco que está

asociada con un efecto terapéutico incierto y no se puede predecir el éxito terapéutico (88; 86). Una cepa bacteriana moderadamente sensible implica que puede ser inhibida o destruida *in vivo* cuando se administra el antibiótico a dosis más altas que las habituales (79).

2.1.5. Métodos para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana *in vitro*

Es importante utilizar un método estandarizado que regule todos los factores que repercuten en la actividad antimicrobiana; en Estados Unidos, estas pruebas se realizan según los métodos del Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI] (antiguamente National Committee for Clinical Laboratory Standards [NCCLS]) (89). En las pruebas de sensibilidad, el medio recomendado en los protocolos del CLSI para la ejecución de estas pruebas es el Agar Müller-Hinton (90). Siendo los métodos utilizados para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* los siguientes (71):

- Difusión: Método Stokes, método de Kirby- Baüer
- Dilución: dilución de caldo, dilución de Agar.
- Difusión y dilución: método E-test.

- Método de difusión:

El método de Kirby- Baüer y el método de Stokes se usan generalmente para pruebas de susceptibilidad a los antibióticos, recomendándose el método Kirby- Baüer según las directrices del CLSI (71).

- Método de difusión en disco de Kirby- Baüer:

El propósito de esta prueba es determinar la sensibilidad o resistencia de una bacteria anaeróbica, aeróbica o facultativa patogénica a diversos compuestos antimicrobianos. El organismo patógeno se cultiva en placas con agar Müller-Hinton en presencia de los discos antimicrobianos.

En este procedimiento, las placas de agar se inoculan con el microorganismo investigado, inóculo de la bacteria en concentración conocida. A continuación, se colocan los discos de papel de filtro (de aproximadamente 6 mm. de diámetro), impregnados con el microorganismo de ensayo a una concentración conocida, sobre la superficie de agar. Las placas de Petri se incuban en condiciones adecuadas. El antimicrobiano en el disco se difunde en el agar circundante e inhibe la germinación y el crecimiento del microorganismo de ensayo (71; 91). Después de la incubación durante el tiempo requerido, se realiza la lectura de la susceptibilidad antimicrobiana por observación y determinación del halo de inhibición alrededor de cada disco, midiendo el diámetro de la zona de inhibición, zona transparente, que rodea al disco como medida del poder de inhibición que tiene el antibiótico contra el microorganismo investigado (71; 89; 92). Dependiendo del diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco y medido en milímetros, se puede decir que el microorganismo es sensible o resistente a los antibióticos (71).

- Método de dilución:

En este método se incorporan cantidades escalonadas de antimicrobianos a un medio bacteriológico líquido o sólido. El criterio de valoración corresponde a la cantidad de sustancia antimicrobiana necesaria para inhibir la proliferación de la bacteria de prueba o para matarla (89).

Se usan métodos de prueba de susceptibilidad a la dilución para determinar la concentración mínima del agente antimicrobiano requerido para inhibir o matar las bacterias. Esto puede lograrse por dilución del antimicrobiano en agar o medio de caldo. Mide la concentración mínima de antimicrobiano que es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano (CMI). También, es posible determinar la concentración bactericida mínima que corresponde a la mínima cantidad de antibiótico capaz de matar una bacteria (CMB). Este concepto tiene validez sólo frente a antimicrobianos con efecto bactericida. Hay dos tipos de métodos de dilución que se pueden hacer: dilución en caldo y dilución en agar (71; 93 - 96).

- Método de difusión y dilución:

La prueba E también conocida como prueba de epsilómetro (E-Test), es un método cuantitativo en el cual se combinan los principios básicos tanto de los métodos de dilución de antibióticos en agar como la susceptibilidad por difusión de antibióticos en el medio. En una placa de agar el inóculo

estandarizado es diseminado formando una película homogénea. Sobre este inóculo se deposita una tira impregnada en un gradiente de concentración del antimicrobiano a estudiar. Cuando esta tira se coloca sobre la placa de agar inoculada, se produce la difusión inmediata del antimicrobiano sobre el agar. Después de la incubación, se produce la inhibición. El punto de intersección entre la inhibición del crecimiento bacteriano y la concentración del antimicrobiano indican el valor de la mínima concentración de antimicrobiano en un amplio rango de concentraciones (> 10 de dilución).

En general, para asegurar la eficacia de una terapia antimicrobiana la concentración del antimicrobiano en el suero, sitio de la infección o tejidos debe ser al menos 2 a 4 veces la CMI del microorganismo causante de la infección (71; 93 - 96).

- Método de difusión de pozos de agar (pocillos)

Consiste en enfrentar la bacteria patógena diseminada sobre la superficie de la placa de agar a la cual se le practica orificios de igual diámetro en los que se deposita cantidades conocidas de sobrenadantes del cultivo microbiano productor de sustancias antibacterianas. De forma similar al procedimiento de difusión en disco, la superficie de la placa de agar se inocula extendiendo un volumen del inóculo microbiano sobre toda la superficie del agar, se perfora asepticamente un orificio con un diámetro de 6 a 8 mm con un taladro de

corcho estéril o una punta, y se introduce en el pocillo un volumen (20-100 ml) del agente antimicrobiano. A continuación, las placas de agar se incuban bajo condiciones adecuadas dependiendo del microorganismo de ensayo. El agente antimicrobiano se difunde en el medio de agar e inhibe el crecimiento de la cepa microbiana ensayada (91; 97).

- Método de siembra en acúmulos

En este método, sobre el homogenizado en placa de agar del patógeno en prueba, se siembran pequeños acúmulos del microorganismo productor de sustancias antibacterianas a fin de determinar la formación de halos de inhibición del organismo en prueba (98). Los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro*, tienen valor para seleccionar los agentes antibacterianos activos contra el germen causal. Las pruebas *in vitro* son simplemente un reflejo del efecto de los antibióticos frente a microorganismos en condiciones de laboratorio (78).

2.1.6. Espectro de acción de los antimicrobianos (94; 96)

Los antimicrobianos más frecuentemente utilizados en clínica tienen un espectro de acción conocido, que debe ser reevaluado periódicamente. El espectro antibacteriano más frecuentemente observado es el siguiente:

Penicilinas: cocos Gram (+), cocos Gram (-), bacilos Gram (+).

Ampicilina: cocos Gram (+), cocos Gram (-), algunos bacilos Gram (-).

Cloxacilina: *Staphylococcus*. Macrólidos: cocos Gram (+).

Cefalosporinas: cocos Gram (+) y bacilos Gram (-).

Cloramfenicol: bacilos Gram (-), anaerobios.

Gentamicina: bacilos Gram (-). Clindamicina: cocos Gram (+), anaerobios

2.2. Probióticos

2.2.1. Definición

El término “probiótico”, etimológicamente deriva del latín (pro= en favor de, para, por) y del griego (bios= vida) (99), que literalmente significan “a favor de la vida”, que es opuesto a "antibiótico" que significa "contra la vida”, se originó hace más de cien años, cuando Döderlein en 1892 y, posteriormente, Metchnikoff en 1907 propusieron que las bacterias que producen ácido láctico a partir de azúcares deberían tener algunos efectos beneficiosos. “Originalmente, fueron definidos como microorganismos que promueven el crecimiento de otros microorganismos, esta definición ha sido revisada y cambiada varias veces” (31; 100; 101).

“Posiblemente el término probiótico, 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” (100). La mayoría de las publicaciones mencionan que el término probiótico se atribuye a Lilly y Stillwell, en 1965 (102), quienes los describieron por primera vez en la literatura, como microorganismos que

promovían o estimulaban el crecimiento de otros microorganismos. Ellos entendieron un probiótico como opuesto a un antibiótico (44; 103). Parker en 1974, da una visión totalmente diferente, utilizó el término "probiótico" para "sustancias y organismos que contribuyen al balance intestinal o al equilibrio de la microbiota intestinal" (31). En 1989, la palabra "probiótico fue popularizada por Roy Fuller, quién además resaltó que para considerarse probiótico, el microorganismo debía estar presente en estado viable, e introdujo la idea de su efecto beneficioso sobre el huésped, describiendo a los "probióticos como: "aquellos microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que benefician al huésped mejorando el equilibrio microbiano de su flora intestinal" (44; 100;104-107).

Se propuso también, que los probióticos son microorganismos vivos que pueden ser formulados en muchos tipos diferentes de productos, incluyendo alimentos, medicamentos y suplementos dietéticos (108), siendo considerados un ingrediente funcional en el alimento (109), que se administran en cantidades controladas y suponen no solo beneficios metabólicos sino también para la salud en general de los individuos que los consumen (17). Otra de las definiciones menciona que, los probióticos se refieren a preparaciones microbianas vivas, no patógenas que ejercen efectos benéficos sobre el huésped cuando se administran en cantidades adecuadas (5; 110).

La OMS junto con la FAO, propusieron una definición que es mundialmente aceptada, los probióticos se definieron como "microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren beneficios para la salud en el huésped" (111).

Por lo tanto, los probióticos se han definido en diferentes formas, dependiendo de su mecanismo de acción o de sus efectos en la salud. La definición más usada es: "Probióticos son microorganismos vivos que confieren beneficios en la salud del huésped cuando se los administra en cantidades adecuadas" (106; 111-115). Sin embargo, en sentido estricto, el término "probiótico" debería reservarse para los microbios vivos que en estudios controlados en humanos han demostrado conferir beneficios para la salud. Por lo tanto, los probióticos son microorganismos con propiedades beneficiosas (116). Además, otra de las definiciones, los considera, como microbios vivos que pueden agregarse a la fórmula de muchos diferentes tipos de productos, incluyendo alimentos, medicamentos y suplementos dietéticos (106; 108). También se menciona a los probióticos orales como microorganismos vivos que al ingerirse en números específicos, ejercen beneficios para la salud. O como, una preparación que contiene microorganismos definidos, viables y en cantidades suficientes, que alteran la microflora en uno de los compartimentos del huésped y ejercen efectos beneficiosos para la salud más allá de su papel nutricional (117;118).

Se tienen también otras definiciones como las siguientes: Probiótico, es un suplemento alimentario microbiano vivo que afecta de manera beneficiosa al huésped mejorando su equilibrio microbiano intestinal". O, los probióticos son preparaciones o componentes de células microbianas que tienen un efecto beneficioso sobre la salud y el bienestar del huésped que al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren un efecto fisiológico beneficioso al "huésped" e inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos y favorecen la salud intestinal, por lo tanto, son considerados como seguros (26; 27; 11).

El Functional Food Centre (FFC), define a los probióticos como alimentos funcionales, que como alimentos naturales o procesados contienen compuestos biológicamente activos conocidos o desconocidos que en cantidades definidas, eficaces y no tóxicas, proporcionan un beneficio sanitario clínicamente probado y documentado para la prevención, manejo o tratamiento de enfermedades crónicas (119). Asimismo se ha demostrado que estos alimentos funcionales alteran, modifican y restablecen la flora intestinal preexistente, ayudando a mejorar el estado de bienestar y contribuyendo a la disminución del riesgo de enfermedades, además de sus propios efectos nutricionales (120; 121). La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) también, definen a los alimentos funcionales como aquellos que contienen componentes biológicos adicionales, con potencial de reducir el riesgo de enfermedad y favorecer la salud (122).

En el 2013, la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP) organizó una reunión de expertos clínicos y científicos sobre probióticos para volver a examinar el concepto de probióticos. Las recomendaciones del panel fue mantener la definición FAO/OMS de probióticos, con una corrección gramatical menor como "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud al huésped". Además incluir en la definición de probióticos que las especies microbianas probióticas tienen que haber pasado por estudios debidamente controlados donde se ha demostrado que confieren beneficios a la salud, y que se mantengan los cultivos vivos, tradicionalmente asociados a los alimentos fermentados y para los cuales no hay evidencia de beneficios para la salud y además que los microorganismos muertos u otros productos no viables microbianos no caen bajo la construcción probiótica (123).

2.2.2. Criterios para la clasificación de un microorganismo como probiótico

Entre los criterios o requisitos que un microorganismo debe poseer para ser considerado como probiótico, se tienen (56; 39; 124):

- Debe ser de origen humano y adherirse al tejido epitelial objetivo.
- Ser microorganismos verdaderamente activos, vitales, con estabilidad en ácido y bilis y producir sustancias antimicrobianas.
- Tener propiedades no patógenas, no tóxicas y libres de efectos secundarios adversos significativos.

- Resistencia a los procesos tecnológicos (viabilidad en el vehículo de entrega).
- Capacidad para persistir dentro del tracto gastrointestinal, de modular el sistema inmunológico y de influir en las actividades metabólicas.
- Debe demostrar que ejercen un efecto beneficioso sobre el consumidor, conservar la estabilidad durante la vida útil prevista del producto y contener un número adecuado de células viables para conferir el beneficio para la salud.
- Debe ser compatible con el formato del producto para mantener las propiedades sensoriales deseadas.

Otros autores mencionan que los criterios para considerar a los microorganismos como probióticos son: (114; 125-128)

- Tolerancia a sustancias antimicrobianas, al oxígeno, al calor y habilidad de tolerar a otras bacterias.
- Inmunoestimulación sin efectos inflamatorios.
- Resistencia a la acidez gástrica, a fagos y a la bilis.
- Propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas.
- Habilidad de crecer en leche y buenas propiedades sensoriales.
- Retener viabilidad y estabilidad durante el procesamiento, almacenamiento y consumo de alimentos.
- Actividad metabólica deseada.
- Contar con su caracterización *in vitro*, lo que implica conocer la estabilidad fenotípica y genotípica y los patrones de utilización de carbohidratos y proteínas.

- Viabilidad durante el almacenamiento y procesamiento de productos que los contengan.
- Capacidad de producción a gran escala y de adhesión al epitelio intestinal.
- La resistencia a lisozima y la capacidad de utilizar prebióticos (opcional)
- La existencia de ensayos *in vivo* e *in vitro* que demuestren los efectos probióticos adjudicados.

También, se considera que, las especies y las bacterias a utilizar en medicina clínica como probióticos se seleccionan sobre la base de una serie de requisitos que estas deben poseer, como ser microorganismos cada vez más seguros y eficaces (39; 124), y deben ser ingeridos en cantidades adecuadas (129).

A raíz de ciertas irregularidades surgidas en el ámbito científico y comercial, la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (Scientific Association for Probiotics and Prebiotics) (ISAPP), ha establecido cuatro condiciones que debe cumplir todo microorganismo para ser considerado probiótico, estas son las siguientes (41): 1) conservar su viabilidad durante la administración (3); 2) que los beneficios en el hospedador que los consume estén debidamente corroborados; 3) que el/los microorganismo/presenten categoría taxonómica definida (género, especie y cepa; y 4) que su uso sea seguro; (123). Esta última condición es de gran relevancia, ya que se deben evitar efectos adversos

indeseables como la translocación bacteriana hacia la circulación sistémica, cuyas consecuencias pueden ser graves (130).

2.2.3. Características de los probióticos

La selección de bacterias probióticas incluye varias características, como (5; 10; 17; 39; 56; 102; 131-134).

- Seguridad biológica: no deben causar infecciones de órganos o de sistemas.
- Ser saludable. no patógeno ni toxigénico.
- Capacidad de ser toleradas por el sistema inmunitario del huésped, y, por lo tanto, deben preferiblemente ser de proveniencia intestinal.
- Ser habitante normal del intestino humano, un microorganismo de origen humano, aunque los principales probióticos disponibles no son de origen humano, se cree que si el probiótico es aislado del tracto gastrointestinal, es seguro para el consumo humano y quizás sea más efectivo en la colonización del intestino delgado.
- Capacidad de resistir los efectos de la degradación digestiva, la acción de los ácidos gástricos y la toxicidad de los ácidos biliares, para que puedan llegar vivas (viabilidad) en grandes cantidades al intestino. El bajo pH gástrico, es uno de los mecanismos de defensa del hospedero contra los microorganismos ingeridos, incluidos los probióticos y además al alcanzar el intestino favorezcan el equilibrio de la microbiota.

- Capacidad de adherirse a la superficie de la mucosa intestinal, a los enterocitos, a la mucina y colonizar el tracto gastrointestinal, lo que mejora en el colon la persistencia, y multiplicación de los probióticos así como promueve la exclusión competitiva de patógenos potenciales de las superficies mucosas.
- Sinergia con la microbiota endógena normal.
- Efecto barrera: este término define la capacidad de producir sustancias que tengan una acción trófica sobre el epitelio de la mucosa intestinal.
- Capacidad de potenciar las defensas inmunitarias del huésped y modular las respuestas inmunes del huésped e influir en las actividades metabólicas humanas, como la producción de vitaminas, la asimilación del colesterol y la reducción de la lactosa.
- Capaz de persistir lo suficiente en el tracto digestivo y de producir sustancias antimicrobianas contra patógenos intestinales para la restauración de la composición de la microbiota intestinal.
- Adaptarse a la microbiota intestinal sin desplazar la microbiota nativa ya existente.
- Eficacia y seguridad demostrada en estudio aleatorizados, doble ciego y en estudios en humanos controlados con placebo.
- Ser capaces de ser preparados en gran escala de manera viable. Es importante que sean viables y activos en un vehículo específico determinado.
- Ser Generalmente Reconocido como Seguro para la salud (tener carácter Generally Regarded as Safe), Estatus GRAS es concedido por la FDA a alimentos

o componentes de alimentos que son seguros para el consumo humano, y que han sido probados a través de procedimientos científicos, de la experiencia basada en el uso común de los alimentos y en la historia sustancial de consumo por un número significativo de consumidores.

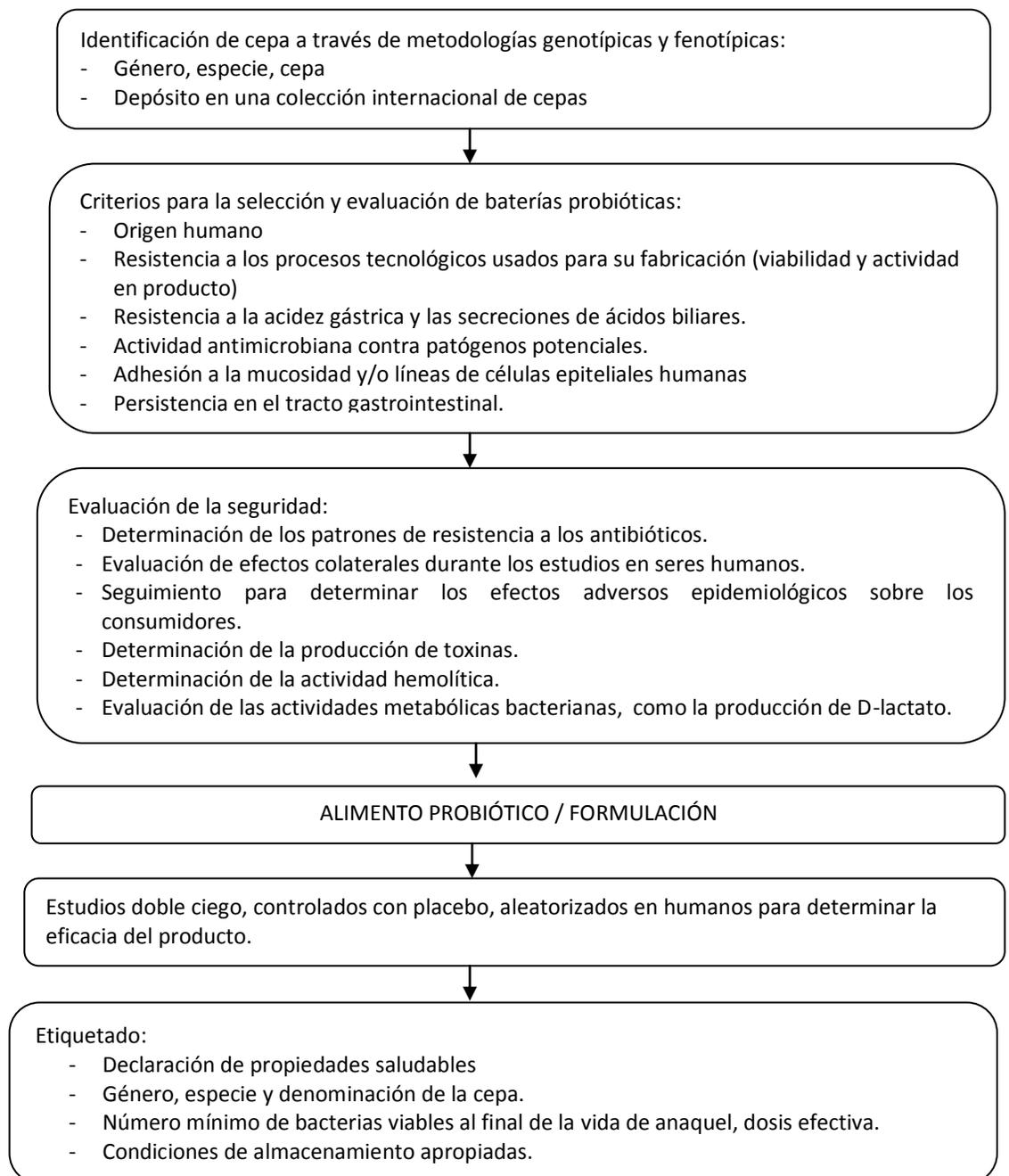
- Sin factores de virulencia, no presentar resistencia a los antibióticos comúnmente utilizados, ni determinantes de patogenicidad (128,135).
- Presentar resistencia a las condiciones de procesamiento industrial y tener buenas propiedades tecnológicas (21; 136-138).
- Ser capaces de sobrevivir a lo largo del tracto gastrointestinal, la supervivencia de los probióticos ingeridos en diferentes partes del tracto gastrointestinal son específicos de cada cepa. Algunas cepas mueren rápidamente en el estómago mientras que otras, tales como cepas de *Bifidibacteria* o *L. acidophilus*, pueden pasar a través de todo el intestino a una concentración muy alta (32; 54; 139-142).

2.2.4. Evaluación de los probióticos para uso alimentario

En el 2001, una comisión de expertos de la FAO y la OMS reconoció la necesidad de establecer directrices para la evaluación de la eficacia y seguridad de los probióticos siendo así que en el 2002, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación / Organización Mundial de la Salud (FAO / OMS) (FAO / OMS citado por Rodríguez) (24) ha elaborado directrices para la evaluación y selección de probióticos (43), con los requerimientos mínimos

necesarios para que a un producto se le pudiera considerar como probiótico que se detallan en el Esquema 1.

Esquema 1. Directrices para la evaluación de los probióticos para uso alimentario (FAO/WHO, Rodríguez J. M.) (24; 111).



2.2.5. Mecanismo de acción de los probióticos

Los probióticos ejercen su acción a través de múltiples mecanismos, entre los cuales se destacan: a) promoción de la fagocitosis; b) inhibición del crecimiento bacteriano por producción de agentes antimicrobianos y descenso del pH luminal; c) modulación local de la respuesta inmune; y d) inhibición competitiva de los sitios de unión de la mucosa entre patógenos y bacterias probióticas que limita el crecimiento y la colonización de los patógenos en el cuerpo (143-145).

Los probióticos interactúan con el huésped humano a distintos niveles: (a) en el lumen intestinal, mediante su interacción con la microbiota intestinal o ejerciendo un efecto metabólico directo (transformando la mucina, en azúcares simples), (b) en la mucosa y el epitelio intestinal, incluyendo los efectos de barrera, los procesos digestivos y el sistema inmunológico asociado a la mucosa y (c) en otros órganos extraintestinales (2; 44; 146).

Sin embargo, es en gran parte desconocido el conocimiento de los posibles mecanismos de los efectos de los probióticos sobre los enteropatógenos, probablemente estos mecanismos son multifactoriales, incluyéndose a los siguientes (147-150):

- Competición por nutrientes y sitios de adhesión
- Reducción del pH luminal y la inactivación de toxinas
- Producción de metabolitos antimicrobianos y su secreción

- Cambios en condiciones ambientales
- Estimulación del sistema inmune innato.

Otros estudios realizados, propusieron como mecanismos de los probióticos para mejorar la resistencia del huésped contra organismos patógenos, a los siguientes. (25; 100; 151-153):

- Resistencia a la colonización
- Mejora de la función de barrera intestinal.
- Aumento de la regeneración de enterocitos
- El aumento de la adhesión a la mucosa intestinal. La inhibición concomitante del patógeno mediante la adhesión
- La exclusión competitiva de los microorganismos patógenos.
- La producción de nutrientes y de sustancias antimicrobianas
- Inmunomodulación, modulación del sistema inmunitario.
- Competición con bacterias nocivas por desplazamiento de su sitio de unión al epitelio e inhibición de su crecimiento y/o muerte mediante la producción de compuestos antibacterianos o reducción del pH.

Mejora de la barrera epitelial

Existen varios mecanismos por los que ciertas cepas probióticas pueden mejorar la estructura y función de las barreras epiteliales intestinales (44), incluyendo reforzar la barrera física, aumentar la producción de mucina, promover la

producción de péptidos antimicrobianos y proteínas de choque térmico, atenuar el efecto negativo de microorganismos patógenos y modular las vías de señalización que afectan la proliferación celular y la supervivencia (154; 155).

La mucosa intestinal con su epitelio y mucus superpuesto constituye la primera barrera física que separa la microbiota comensal del huésped o los tejidos del contenido luminal (156). El mucus que cubre los enterocitos, el flujo sanguíneo que la irriga y las secreciones constituyen de forma conjunta no solo una barrera física sino también química que contribuye a la defensa del huésped (157; 158), a estas defensas de la barrera intestinal se suman, los péptidos antimicrobianos, IgA secretoras y su capacidad de adherencia al epitelio de los probióticos y así pueden influir en varios aspectos de la función de barrera intestinal (11; 159; 160).

Otros autores complementan que algunas cepas probióticas tienen la capacidad de estabilizar la barrera de la mucosa digestiva debido a que los enterocitos están firmemente conectados a través de uniones estrechas y recubiertos con el mucus que contiene IgA (161). Los patógenos normalmente alteran la permeabilidad intestinal, siendo las bacterias probióticas las que contribuyen a su restablecimiento así como de las uniones estrechas, favoreciendo la estabilidad de estas uniones disminuyendo la permeabilidad epitelial a patógenos o sus productos y fomentando la proliferación celular. Así, inician la reparación de la función de barrera después de un daño (152; 162-165).

También pueden inducir la liberación de defensinas de los enterocitos (166), controlando el ingreso de endotoxinas, de moléculas hepatotóxicas y mediadores proinflamatorios derivados de la microbiota intestinal nociva (17). Además, pueden promover la supervivencia celular mediante la prevención de la apoptosis en los enterocitos (167), Por otra parte, generan ácidos grasos de cadena corta, los que actúan sobre receptores del epitelio intestinal (168), promoviendo el peristaltismo intestinal y contribuyendo a la reducción del pH en el colon, inhibiendo su colonización por bacterias patógenas (169; 158).

Tengamos presente, que la contribución de los probióticos a la barrera del epitelio intestinal se basa en 3 tipos de efectos: sobre el epitelio, sobre el sistema inmune y sobre la microbiota (Figura A) (25; 159).

El aumento de la adhesión a la mucosa intestinal

La adhesión a la mucosa intestinal es un requisito previo para la colonización y es importante para la interacción entre las cepas probióticas y el huésped. La adherencia de probióticos a la mucosa intestinal es importante para la modulación del sistema inmune y el antagonismo contra los patógenos (152; 170). La adherencia de lactobacilos al epitelio intestinal es esencial para la acción de los probióticos en el intestino grueso influyendo en la unión de adherencia y modulando la función de la barrera epitelial (4; 171; 172).

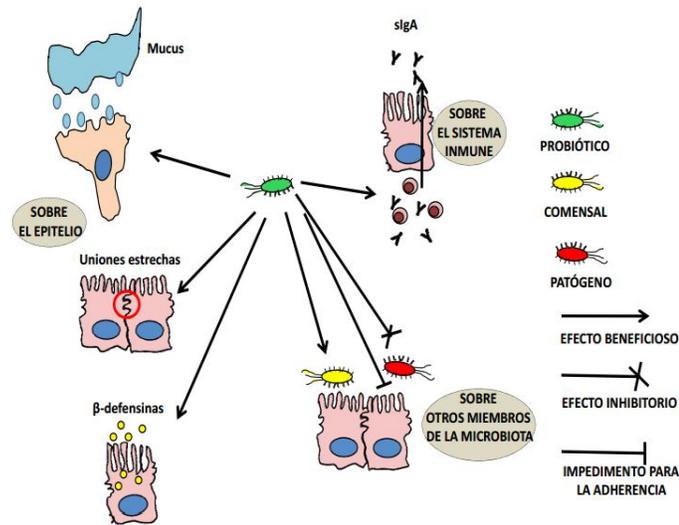


Figura A. Contribución de los probióticos a la función barrera.

Fuente: Joshi et al. (25); Ohland y Macnaughton (159).

La exclusión competitiva de los microorganismos patógenos

Algunos probióticos se adhieren a la mucosa intestinal (11) y así, previenen la posterior fijación de patógenos, un fenómeno conocido como exclusión competitiva (173; 174). La exclusión es el resultado de diferentes mecanismos y propiedades de los probióticos para inhibir la adhesión de los patógenos mediante la producción de sustancias y la estimulación de los enterocitos (152; 175) y como el proceso de adhesión está mediado por proteínas, la interacción entre las proteínas de superficie de las bacterias probióticas con los enterocitos puede ser la principal causa en la exclusión competitiva de los probióticos frente a los patógenos (152; 173). También se da mediante la modificación de su entorno, produciendo sustancias antimicrobianas, para que este sea menos adecuado para

sus competidores (152; 175), excluyendo competitivamente a los agentes patógenos intestinales formando una barrera física que previene la entrada de sustancias antimicrobianas (176). Constituyéndose el epitelio intestinal en una importante barrera que restringe la penetración de los antígenos lumbales y los microorganismos. (177; 178), limita la disponibilidad de nutrientes a otras bacterias, el acceso de los patógenos al epitelio, aumenta la persistencia intestinal de las bacterias probióticas (167), compitiendo con las bacterias patógenas por los sitios de unión a las células epiteliales y de adherencia a la capa de moco (11; 179).

La producción de sustancias antimicrobianas

Los probióticos forman compuestos como proteasas, peróxidos, bacteriocinas, defensinas, óxido nítrico y sustancias como los ácidos grasos de cadena corta (ácidos láctico y acético), que acidifican el lumen intestinal y reducen el número de células viables, inhibiendo tanto a las bacterias Gram-positivas y negativas, afectando el metabolismo bacteriano o la producción de toxinas, ejerciendo efectos antibacterianos y antimicóticos (31; 39; 149; 152; 179; 180). La producción de estas sustancias crea un microambiente luminal desfavorable para el crecimiento de patógenos (174), de esta manera estas sustancias se constituyen en una de las principales barreras que un probiótico oral encuentra a su paso por el tracto gastrointestinal (14).

Las bacterias probióticas, especialmente las cepas de Lactobacilos, como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, y *Streptococcus thermophilus* (181; 182), producen ácidos orgánicos, péptidos antibacterianos (bacteriocinas), H₂O₂ y biosurfactantes, que disminuyen el pH local, lo que conduce a inhibir el crecimiento de una amplia gama de bacterias patógenas y podrían prevenir la unión de patógenos, estimulando su eliminación (11; 174; 183) o disminuyendo la actividad tóxica microbiana (31).

La producción de bacteriocinas puede permitir el establecimiento de las cepas productoras, así como la inhibición directa del crecimiento de patógenos y llevar al aumento de la liberación de defensinas, las que participan en la modulación de la composición de la microbiota y en la conformación de la respuesta inmunitaria adaptativa (2; 56; 184-186); Además las bacterias probióticas son capaces de producir derivados de las sales biliares que tienen actividad antimicrobiana más fuerte comparada con la de las sales biliares sintetizadas por el organismo del huésped. Aún queda por dilucidar cómo los probióticos se protegen de sus propios metabolitos bactericidas que producen (187).

Competición con bacterias nocivas

Los probióticos inhiben a los organismos patógenos al competir por los limitados sustratos necesarios para la fermentación o por los receptores, y así previenen la adherencia de las bacterias patógenas a las células (100; 180).

Bloqueo de sitios de adhesión

Los probióticos inhiben a los patógenos adhiriéndose a las superficies epiteliales intestinales y bloqueando los sitios de adhesión. Así la microbiota normal y los probióticos interactúan con el organismo huésped a través de actividades metabólicas y funciones inmunes previniendo la colonización de microorganismos oportunistas y patógenos (31; 106).

Competencia por nutrientes

Los probióticos, modulan las actividades metabólicas de la microflora del tracto por varios posibles mecanismos: por el antagonismo que ejercen sobre el desarrollo de microorganismos patógenos al competir con ellos por nutrientes disponibles y factores de crecimiento; por sitios de unión en el epitelio produciendo bacteriocinas, y citoquinas para controlar el crecimiento de otros microorganismos, e incrementando la síntesis de ácido láctico y ácidos grasos disminuyendo el pH luminal y modulando así la actividad enzimática (4;19;102). Asimismo, pueden afectar la composición y función de las comunidades microbianas mediante la producción de sustratos de crecimiento o inhibidores y la modulación de la inmunidad intestinal. A pesar de la falta de estudios *in vivo*, los probióticos inhiben a los patógenos consumiendo los nutrientes que los patógenos necesitan (31; 188; 189). Así, algunas bacterias ácido lácticas (BAL), son capaces de inhibir la adhesión de patógenos a los enterocitos simplemente a través de la competencia por los nutrientes (188).

Estimulación y modulación de la inmunidad

La microbiota intestinal desempeña un papel central en la conformación de los sistemas inmunitario periférico e intestinal tanto en salud como en enfermedad (190). El intestino es el órgano con la función inmunitaria más importante del organismo: aproximadamente 60% de todas las células inmunitarias se encuentran en la mucosa del intestino delgado constituyendo un gran número de estructuras linfoides para la inducción de respuestas inmunitarias adaptativas (106); desempeñando la microbiota intestinal un papel fundamental en el desarrollo del sistema inmune e interactuando con las células inmunitarias intestinales para mantener la inmunidad en la mucosa o modular sus funciones que sirven como importante barrera defensiva contra patógenos invasores (191;192). Por este efecto modulador de los probióticos, se tiene el desarrollo adicional del epitelio intestinal, el desencadenamiento de la producción de moco y defensinas, y la modulación de las uniones estrechas (193). Las bacterias comensales intestinales pueden causar indirectamente efectos inmunomoduladores en los pulmones (194).

Una vez que el probiótico se adhiere a la célula, se llevan a cabo diversas actividades biológicas, que incluyen principalmente la liberación de citoquinas y quimiocinas, las que ejercen su actividad secundaria como la estimulación de la inmunidad local y sistémica del huésped (180). Las proteínas extracelulares bacterianas permiten la interacción probiótico-hospedero, interrelacionado las células epiteliales y las del sistema inmune (195) y así, algunas cepas probióticas

tienen capacidad de estimular respuestas inmunes protectoras frente a patógenos microbianos (196; 197).

Los principales efectores celulares de la inmunidad innata incluyen células epiteliales, células fagocíticas y células natural-killer y son los probióticos los que modulan las funciones de todas estas células, hay probióticos específicos que mejoran las respuestas de los anticuerpos a las infecciones naturales y a las inmunizaciones. La iniciación, el mantenimiento y la resolución de las respuestas inmunes innatas y adquiridas están regulados por citocinas. La capacidad de los probióticos para inducir la producción de citocinas por una serie de células inmunitarias puede explicar cómo son capaces de influir tanto en la respuesta inmune innata como adquirida (56). La inmunidad innata y adaptativa, puede ser responsable de la inducción de la tolerancia a los compuestos microbianos por el hospedero (198; 199). Además, los probióticos afectan al ecosistema intestinal estimulando los mecanismos inmunitarios y no inmunitarios de la mucosa a través de antagonismo y competencia con patógenos potenciales. Entre los mecanismos de interacción probióticos/huésped sugeridos son los siguientes (106; 200; 201):

Inmunológicos:

- Activa los macrófagos locales para aumentar la presentación de los antígenos a los linfocitos B.
- Aumenta la producción de inmunoglobulina A y modula los perfiles de citoquinas.

- Induce disminución de la respuesta a los antígenos de los alimentos.

No inmunológicos:

- Digiere los alimentos y compete con los patógenos por los nutrientes y por la adherencia.
- Altera el pH local para crear un ambiente local desfavorable para los patógenos.
- Produce bacteriocinas para inhibir a los patógenos y modifica las toxinas de origen patógeno.
- Fagocita los radicales superóxidos.
- Estimula la producción epitelial de mucina e incrementa la función de barra intestinal.

Mientras que otros autores consideran que los probióticos actúan por otros mecanismos que se pueden clasificar en (202):

a. Mecanismos intraluminales:

- Incrementa la secreción mucosa e inhibe la adherencia de las bacterias patógenas.
- Acidifica el colon por fermentación de nutrientes.

b. Mecanismos epiteliales:

- Incremento de la función de barrera del epitelio y disminución de la permeabilidad intestinal favoreciendo el cierre de las uniones intercelulares.

c. Mecanismo inmunomoduladores:

- Acciones inmunomoduladoras y secreción de bacteriocinas.

- Estimula la respuesta mucosa al estrés e inhibe la hipersensibilidad visceral.

2.2.6. Productos alimenticios probióticos para uso humano

Se venden muchos productos probióticos para uso humano, pero sólo se recomiendan aquellos probados en seres humanos (203).

La Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos [Scientific International Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP)] a través del trabajo de un panel de expertos, definió diferentes categorías de microorganismos vivos para uso humano considerando a los «probióticos», divididos a su vez en tres categorías (41; 123):

“a) Probióticos presentes en alimentos o suplementos que no se utilizan con una finalidad específica. Estos pueden ser cepas que pertenezcan a una especie segura al ser administrada y con evidencias suficientes de un efecto beneficioso en la salud del consumidor; b) Probióticos en alimentos o suplementos con un efecto específico sobre la salud del consumidor, debidamente comprobado y evidenciable a partir de estudios conducidos en humanos; c) Probióticos como drogas o agentes bioterapéuticos, los cuales presentan un efecto específico por el cual son indicados para el tratamiento o la prevención de enfermedades y que son regulados como medicamentos”.

Para otros autores, los microorganismos probióticos están disponibles de tres maneras para el consumo humano ya sea directo o indirecto: 1) como concentrado de cultivo que se añade a un alimento para usos industriales o caseros, 2) como productos alimenticios ya sea fermentados o no, y 3) como suplementos dietéticos (productos farmacéuticos en forma de polvo, cápsulas o tabletas). Siendo la forma más popular y generalizada de consumo de los microorganismos probióticos a través de los productos alimenticios (204).

Los productos que contienen bacterias probióticas generalmente incluyen alimentos y suplementos dietéticos (49; 53). La forma más frecuente de consumir probióticos es a través de alimentos lácteos como yogur, koumis y kéfir, que contienen especies intestinales de lactobacilos y bifidobacterias y proporcionan efectos benéficos adicionales a los nutritivos, estos alimentos se consideran en el grupo de los alimentos funcionales (205; 206).

En las mezclas probióticas algunas especies podrían ser capaces de inhibir los efectos estimulatorios de otras, por lo que la combinación de múltiples probióticos no siempre optimiza los resultados (207).

También en otros estudios se menciona, que, los probióticos pueden ser suministrados o consumidos en una de las siguientes cuatro formas básicas (208):

- 1) Como un cultivo concentrado agregado a alguna bebida (jugo de frutas)
- 2) Inoculado dentro de fibras prebióticas

- 3) Inoculado dentro de los alimentos lácteos (leche, yogurt, queso)
- 4) Como suplementos dietéticos de células secas (polvo, cápsulas, tabletas gelatinosas).

Siendo la selección de las cepas probióticas, el primer requisito previo para diseñar un producto probiótico alimenticio específico, haciendo uso de herramientas adecuadas para proporcionar la identificación de la cepa y para rastrear los probióticos durante la producción de alimentos, así como durante su tránsito intestinal (204). El uso de alimentos fermentados conteniendo bacterias beneficiosas y suplementos dietéticos de bacterias, se suministran con bacterias vivas que pasan el conducto gástrico para replicarse en el intestino grueso (209).

Los probióticos para uso humano, están sujetos a restricciones mínimas (por lo menos como nuevos alimentos o como suplementos dietéticos) y vienen en muchas formas diferentes. A menudo se venden como productos lácteos que contienen "bacterias vivas" o como cápsulas o tabletas compuestas de preparaciones liofilizadas de bacterias que promueven "un intestino sano", considerando que los alimentos no sólo son necesarios para vivir, sino también como fuente de bienestar mental y físico, contribuyendo a la prevención y reducción de factores de riesgo para varias enfermedades o potenciando ciertas funciones fisiológicas (8; 53; 210). Los probióticos utilizados en los alimentos, suministrados como suplemento dietético o como componentes activos de una medicación registrada, no sólo deben

ser capaces de sobrevivir al paso a través del tracto digestivo, exhibiendo la supervivencia de ácido y bilis, sino que también deben tener la capacidad de proliferar en el intestino (50). El aumento en el uso de productos alimenticios industriales en lugar de los alimentos fermentados tradicionales, conduce a la reducción de las bacterias probióticas (211).

2.2.7. Microorganismos más comúnmente usados como probióticos

Se ha utilizado una amplia gama de microorganismos como probióticos. Los organismos más comúnmente utilizados en las preparaciones probióticas son las bacterias ácido lácticas, tales como *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus spp.*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y hongos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Sacharomyces boulardii* y *Aspergillus oryzae*. Sin embargo, las bacterias ácido lácticas han alcanzado mayor atención en la actividad probiótica y generalmente han sido consideradas como buenos organismos probióticos (41; 15; 212). Las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* se han aplicado cada vez más en la industria láctea, son ampliamente conocidas y las más reconocidas como probióticos por sus beneficios nutricionales y en la salud (213-215) y son utilizadas como probióticos para promover la homeostasis intestinal a través del nervio vago que existe entre el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso entérico (35;36;216), siendo algunas bacterias lácticas habitantes comunes del tracto gastrointestinal y mucosas (217;218).

Las cepas de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus*, son los tipos bacterianos que se han utilizado durante siglos en la producción de productos lácteos fermentados. Décadas de uso de los probióticos en forma de lácteos parecen asegurar su inocuidad (219) (*L. casei* podría utilizarse como cultivo complementario para producir yogur bifuncional enriquecido en péptidos bioactivos y en células viables (220).

La Tabla 1 indica los microorganismos probióticos más utilizados, los cuales pertenecen principalmente a las especies *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (bacterias Gram +), aunque algunas otras especies u otros microorganismos (levadura) también han sido de interés (221). El interés por los probióticos ha surgido en los últimos años, especialmente en relación con la adición de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus reuteri* a los productos lácteos fermentados como el yogur (222).

Los microorganismos más comúnmente utilizados en las preparaciones probióticas son *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Bacillus* and *Streptococcus*. Algunas cepas de hongos pertenecientes a *Saccharomyces* también se han utilizado. *Lactobacillus* es el grupo común en productos lácteos fermentados, y *Bifidobacteria* y *Streptococcus* son comunes en queso y otras bebidas (5; 56; 140).

Tabla 1. Lista de los microorganismos probióticos más utilizados

<i>Especies de Lactobacillus</i>	<i>Especies de Bifidobacterium</i>	Otras
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. breve</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Clostridium butyricum</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. johnsonii</i>		VSL#3(cuatro cepas de lactobacilli, tres cepas de bifidobacteria, una cepa de <i>Streptococcus salivarius sp. thermophilus</i>)
<i>L. paracasei, L. casei</i>		Hongos
<i>L. salivarius</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. lactis</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Fuente: Heyman y Ménard, (221)

2.3. Probióticos y Salud

Ha habido un gran interés en la incorporación en la dieta de probióticos los que después de su consumo pueden ser capaces de prevenir varias enfermedades (223). Al existir varios tipos diferentes de probióticos, sus beneficios para la salud deben ser identificados por su género, especie y nivel de deformación (56), dependiendo el efecto de los probióticos de la especie y de la cepa utilizada (45). Además se reporta su uso como sustancias terapéuticas, para el tratamiento de diferentes trastornos como la prevención de infecciones gastrointestinales, disminución de la severidad de las alergias (224-226), prevención y manejo de la colitis ulcerativa y la pouchitis (227-231), en la enfermedad de Crohn, en la prevención del crecimiento de las células cancerosas (7;28), y así siguen los beneficios atribuidos, como el que algunos tienen la capacidad de reducir la incidencia de tumores colónicos (232), mejorar los procesos en los que existe inflamación de la pared intestinal (102;233;51) ejerciendo acción

antiinflamatoria (234;153), participar en la mejora de ciertos trastornos infecciosos, como en el síndrome del intestino irritable (235-239), mejorar la función de barrera en la mucosa intestinal teniendo eficacia para disminuir los síntomas de la diarrea asociada a antibióticos, la diarrea infecciosa o secretora, estreñimiento y enterocolitis necrotizante (240;19;11). Así como para evitar la diarrea provocada por antibióticos (131) resaltando la eficacia de las cepas de *Lactobacillus* en el tratamiento y/o prevención de la diarrea (135). Asimismo, se les atribuye que son potencialmente protectores contra el desarrollo de ciertas enfermedades infantiles como alteraciones microbiológicas, cólico infantil, asma (241), así como en el tratamiento de infecciones respiratorias (242). También se les atribuye el ayudar a reducir el colesterol sérico en los seres humanos (232), regulando el metabolismo glucídico y lipídico (2), que son eficaces para la prevención y el tratamiento de diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2 (225), que mejoran la tolerancia a la lactosa en sujetos hipolactásicos, como antihipertensivos, en el alivio de trastornos posmenopáusicos (243) en la inflamación intestinal inducida por el estrés psicológico (244).

Además, diferentes estudios clínicos han mostrado el beneficio de los probióticos en el manejo integral de la enfermedad hepática crónica (245). Los *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 son una promesa significativa en el apoyo a la función inmune de las personas que viven con el VIH (12) al estimular la inmunidad en sujetos con inmunodeficiencia moderada (224). También se resalta el papel prometedor de los probióticos en la mejora de *H. pylori* (246), y en ejercer efectos sobre la

hipersensibilidad visceral, la función inmune, la disfunción del eje intestinal-cerebral este último podría causar angustia psicológica (32).

Existe evidencia del uso de probióticos para reducir la ansiedad en individuos con alteración de la función gastrointestinal y disminuir las citocinas (176), atenuar el desarrollo de trastornos inducidos por el estrés en el tracto gastrointestinal que pueden influir en la actividad cerebral que se ha sugerido como una solución terapéutica para la depresión confiriendo beneficio a la salud psiquiátrica del huésped (9;20;247-249) mostrando eficacia en la mejora de trastornos psiquiátricos (250) y en la modulación del desarrollo cerebral (251).

2.4. Probióticos y Ecosistema Microbiano

2.4.1. Ecosistema Microbiano

El tubo digestivo alberga un ecosistema microbiano complejo (252) conformado por microorganismos nativos que colonizan permanentemente el tracto gastrointestinal y una serie variable de microorganismos que transitan temporalmente por el tubo digestivo. Constituyéndose el intestino humano en el hábitat natural de una población numerosa, diversa y dinámica de microorganismos, principalmente bacterias intestinales, que se han adaptado a la vida en el lumen del intestino o en las superficies mucosas (12; 253; 254). Esta gran biodiversidad de especies dentro del ecosistema intestinal facilita la vida y el desarrollo del conjunto, que incluye no sólo a las comunidades bacterianas sino también al huésped humano (255), siendo así

que la microbiota gastrointestinal humana forma un ecosistema complejo que está en estrecho contacto con su huésped que consiste en bacterias, hongos filamentosos, virus y tiene un impacto importante en la salud (256; 257).

La microflora humana, conocida también como “microbiota” hace referencia al ecosistema microbiano (comunidad de microorganismos vivos), que coloniza el tracto gastrointestinal (201) y constituye un complejo ecosistema compuesto por varios cientos de especies de microorganismos, la mayoría de ellos del género bacteria. Este ecosistema incluye algunos microorganismos considerados patógenos por su capacidad de invadir al huésped, pero también contiene numerosas especies capaces de promover efectos beneficiosos para la salud (258).

En el tracto gastrointestinal del ser humano, hay sitios donde los microorganismos potencialmente beneficiosos son más numerosos que las bacterias potencialmente dañinas, este tipo de composición del ecosistema se llama normobiosis. El ambiente donde las bacterias potencialmente dañinas dominan sobre las bacterias beneficiosas para la salud se llama disbiosis, que son los desequilibrios de la comunidad microbiana del intestino (22;259-264) que está asociada con muchas enfermedades, incluyendo el síndrome del intestino irritable (IBS), las enfermedades inflamatorias intestinales (IBD), la diabetes y las enfermedades asociadas a la obesidad, dada su influencia en las funciones metabólicas e inmunológicas del hospedador (265;266).

2.4.2. Microbiota intestinal

En cuanto a la microbiota del tracto gastrointestinal (TGI), la “flora normal” (18) ha sido el término más comúnmente usado en la literatura médica durante décadas para referirse a las comunidades microbianas que habitan en un cuerpo sano. Otros términos utilizados han sido el de “microflora autóctona” y más recientemente “microbiota normal”, este último es el término más correcto ya que los términos “flora” y “microflora” tienen una desafortunada connotación botánica.

El término microbiota intestinal (MI) se refiere a la comunidad de microorganismos vivos residentes en la superficie de la luz intestinal y que contiene aproximadamente 100 trillones de microorganismos vivos (260; 267) que equivale aproximadamente a 10 veces más que el número de células que componen el cuerpo humano (19; 46:151). Se estima que en el tracto gastrointestinal humano coexisten, en un delicado equilibrio, entre 500 y 1000 especies de microorganismos (19; 268) tanto patógenos como no patógenos que están presentes en una simbiosis compleja y variable durante la vida humana llevando a la homeostasis fisiológica. Estos microorganismos pueden conformar la microbiota local o ser microorganismos de tránsito, como aquellos que ingresan con los alimentos (1; 15; 269-275). En el cuerpo humano se estima que hay más células microbianas (10^{14}) que células eucariotas (10^{13}) (44; 151; 276). La microbiota intestinal "normal" está dominada por bacterias anaerobias (54), que superan en número a las bacterias aerobias y anaerobias facultativas (277-279).

Las relaciones entre la microbiota y el huésped son mutuamente benéficas simbióticas, que aseguran un hábitat equilibrado que es vital para una función gastrointestinal normal (45), jugando un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis intestinal la composición de esta microbiota y siendo específica para cada individuo (256;280;281).

La microbiota del tracto gastrointestinal (TGI) en el hombre, contiene 150 veces más genes (microbioma) que nuestro genoma superando así el potencial genético del huésped. Este gran arsenal de productos genéticos proporciona una amplia gama de actividades bioquímicas y metabólicas para complementar la fisiología del huésped (256; 260; 277; 282; 283), siendo la microbiota intestinal considerada como el órgano olvidado que se adquiere después del nacimiento (268). Este microbioma, promueve el desarrollo de señales reguladas y antiinflamatorias dentro del tracto gastrointestinal (284). La microbiota gastrointestinal residente proporciona una barrera microbiana contra patógenos microbianos, sin afectar su viabilidad (285).

2.4.3. Composición de la microbiota intestinal

La microbiota del tubo digestivo difiere en el número, el tipo y la función de los microorganismos dominantes en cada uno de sus segmentos, donde cada porción tiene su microbiota característica, existiendo variaciones temporales y espaciales en la distribución microbiana a lo largo de todo el TGI, durante toda la vida del individuo (6; 29; 276).

La microbiota aumenta en cantidad y complejidad a medida que avanza por el TGI. Así, en el estómago, debido a la secreción de ácido gástrico, únicamente se desarrollan especies resistentes a pH ácido como *estreptococos* y *lactobacilos*, la acidez estomacal es una barrera casi infranqueable para los microorganismos que ingerimos con la comida y la bebida. La concentración de lactobacilos es tan baja que no se sabe si ejercen algún efecto mutualista significativo (29; 106; 253). En general, la colonización microbiana tiene que mostrar buena tolerancia y capacidad para sobrevivir a pH bajo, durante periodos de tiempo largos para asegurar su persistencia en el estómago humano (46).

En el intestino delgado las bacterias que colonizan inicialmente son especies anaerobias facultativas tales como *Escherichia coli* y *Streptococcus spp.* (286) desde el duodeno, los *lactobacilos* y los *estreptococos*, aumentan progresivamente, hasta la región distal del íleon. (253). siendo la composición de la microbiota del intestino delgado influenciada en gran medida por una combinación de ácido gástrico, bilis y secreciones pancreáticas y que juntas crean un ambiente hostil para la mayoría de los microorganismos (287). A nivel yeyuno-ileón y colon hay especies de bacterias comensales anaerobias facultativas y obligatorias. En yeyuno se va incrementando la concentración bacteriana, que está formada principalmente por lactobacilos. En íleon la concentración y diversidad de los microorganismos residentes aumenta rápidamente (29; 106; 207). Miles de microorganismos diferentes pueden habitar

colectivamente el intestino de las poblaciones humanas y confirmar un alto grado de variación en la composición de estas poblaciones entre individuos (9).

El intestino grueso, está densamente poblado por una gran diversidad de microorganismos, que en su conjunto, dan lugar a un ecosistema resistente a la inducción de cambios desde el exterior; es lo que se denomina la homeostasis intestinal (29; 106), en esta porción del intestino se ha encontrado la mayor concentración de microorganismos y actividad metabólica (2).

A lo largo del tracto gastrointestinal, la densidad bacteriana como la diversidad y composición aumentan progresivamente, siendo más altas en el colon, en comparación con el intestino delgado, ahí proliferan fermentando los sustratos disponibles de la dieta o de secreciones endógenas y degradan glúcidos complejos que no podemos digerir (29;47;106;272). Se estima que a nivel del colon conviven más de 1.000 especies diferentes de bacterias, contando entre ellas con un gran número de anaerobios (216,288). Además de la variación en la composición microbiana a lo largo del tracto GI, la microbiota presente en la luz intestinal también difiere significativamente de la que está adherida a la capa de moco intestinal (287).

2.4.4. Factores que influyen en la composición de la microbiota

La microbiota del intestino humano está influenciada en su composición y en sus funciones por varios factores (280), donde cada persona tiene una microbiota única determinada por la genética, la edad gestacional, los factores ambientales, el

parentesco, el estado de salud, la dieta del huésped, nutrición, proceso de envejecimiento, el uso de antibióticos, la higiene, país de origen, las patologías y edad (42; 117; 272; 277; 282; 289; 290). También está influenciada por el estilo de vida, las enfermedades, estrés y los malos hábitos alimenticios (1; 12; 30), a esto se suma los cambios que experimenta por la dieta a largo plazo, el tratamiento antimicrobiano, la desnutrición, la cirugía y las deficiencias inmunológicas, los cuales, son factores que pueden alterar la composición de la microflora intestinal (226; 291-294), y puede causar enfermedades (256). Aun cuando la microbiota intestinal cambia con el paso de los años, la localización geográfica, el uso de antibióticos, la dieta (19), el medio ambiente y la microbiota materna durante el parto constituyen factores de gran efecto en el desarrollo de la microbiota en el futuro. La culminación del establecimiento de la comunidad microbiana individual es después de la lactancia (295-297), una vez establecida la microbiota en un individuo, su composición puede permanecer estable en el tiempo, ya que el intestino es una comunidad microbiana constante (37; 52; 272).

Cada vez que hay cambios drásticos de dieta o tratamientos con antibióticos, se detectan variaciones importantes en la abundancia de las diferentes especies presentes en el intestino (298), la medicación, el estrés severo, la enfermedad y/o la nutrición malsana, produce alteraciones en la microbiota intestinal (22; 299). El establecimiento y mantenimiento de la microflora es altamente dependiente de la ingesta de alimentos y el estilo de la dieta. La microflora intestinal puede ser

modificada por sustancias dietéticas que favorezcan el crecimiento de ciertas especies bacterianas (212; 222). La dieta, ejerce una influencia importante en la composición de la microbiota intestinal humana (11; 300), siendo así que una dieta alta en grasa se ha asociado con un aumento en *firmicutes* y *proteobacteria* y una disminución concomitante en *bacteroidetes* (25; 301). Los hábitos alimentarios constituyen un factor importante que influye en la diversidad de la microbiota del intestino humano (1; 302). El uso de antibióticos afecta la composición de la microbiota nativa, causando que la microbiota intestinal presente una menor capacidad de producción de proteínas y moléculas esenciales, asimilación de hierro y la digestión de determinados sustratos (25; 290).

2.4.5. Adquisición de la microbiota intestinal

Si bien no se conoce aún el origen de la microbiota humana sin embargo, las diferencias posnatales dependen del tipo de parto, de la microbiota materna, la dieta antes y durante el embarazo y la lactancia. A lo largo de la colonización va en aumento la diversidad microbiana y la tendencia gradual hacia la composición de la microbiota adulta (289; 298; 303; 304).

Hay evidencias, que la colonización microbiana se inicia intraútero (305-307), el tracto gastrointestinal del feto en realidad está habitado por microorganismos, en las primeras deposiciones del recién nacido, en el meconio se puede detectar bacterias aunque en muy baja concentración, sería porque el torrente sanguíneo de la madre

puede transportar los primeros microorganismos al intestino del feto (33; 37; 308). Sin embargo, la composición inicial de la microbiota del TGI, tipo y diversidad, se determina desde el nacimiento y depende fundamentalmente de dos factores: la forma de nacimiento (vaginal o cesárea) y el tipo de alimentación (con leche materna o fórmulas lácteas) (6; 309).

Si el parto se produce de forma natural, durante el nacimiento, el recién nacido, también adquiere microorganismos a lo largo del canal del parto (310), siendo colonizado por la microbiota vaginal y/o intestinal de la madre y por los microorganismos del ambiente (42; 277). Cuando el parto se produce por cesárea, el establecimiento de la microbiota normal se retrasa, ya que la colonización microbiana depende exclusivamente del medio externo, siendo las poblaciones microbianas diferentes a las que se desarrollan cuando el parto es natural, con un menor desarrollo de microorganismos anaerobios estrictos (289).

La alimentación es determinante en la evolución de la microbiota, como se ha demostrado en estudios comparativos entre niños con alimentación materna y los alimentados con leche de fórmula. En el momento del nacimiento, la cavidad oral y el tracto digestivo son rápidamente colonizados por una microbiota muy diversa, existiendo variaciones cualitativas entre los niños que reciben lactancia materna o artificial (29; 277; 283). La microbiota en lactantes sanos que reciben lactancia materna está dominada (hasta en un 91%) por el género *Bifidobacterium* (311),

mientras que la presencia de clostridios y coliformes es más baja. Por el contrario, los niños alimentados con fórmulas infantiles están colonizados por una microbiota más heterogénea y compleja (*Enterobacterias, Bacteroides, bifidobacterias, Clostridium spp., Streptococcus*, etc.) (162; 289; 312-314). A partir de los dos años, la microbiota del niño va evolucionando hacia la que será la microbiota del adulto (54; 74), y se estabiliza a los 2 o 3 años de edad y aun entonces puede presentar modificaciones posteriores (289), existiendo diversidad microbiana, cada individuo alberga su propio patrón distintivo de composición bacteriana determinado en parte por el genotipo del huésped y por la colonización inicial al nacimiento (106).

Aunque la mayoría de los autores sostienen que la colonización del recién nacido se produce fundamentalmente por la microbiota del canal del parto, estudios recientes parecen señalar que la leche materna podría ser también una fuente de microorganismos (218) debido a que la microflora infantil refleja la composición bacteriana de la leche materna (315;316). Los Lactobacilos son los primeros residentes en el tracto gastrointestinal después del nacimiento (317), en las personas sanas, están presentes en la cavidad oral, íleon, colon (318).

2.4.6. Funciones de la microbiota intestinal

El tracto gastrointestinal constituye una de las principales zonas de contacto con agentes ambientales potencialmente nocivos (bacterias, virus, toxinas y alérgenos) (162). La microbiota intestinal tiene importantes funciones metabólicas y protectoras

del huésped (319). Se han identificado tres funciones primarias de la microflora intestinal:

(a) en la nutrición y metabolismo, como resultado de la actividad bioquímica de la microbiota, recuperación de energía en forma de ácidos grasos, producción de vitaminas como el folato y la biotina, relacionadas con la regulación de la proliferación epitelial del colon y efectos favorables sobre la absorción de calcio y hierro en el colon; (113;255; 320), facilitando el metabolismo, extrayendo energía de polisacáridos indigestos que conducen a la producción de ácidos grasos de cadena corta, síntesis de aminoácidos esenciales y vitaminas que los seres humanos son incapaces de producir por sí mismos (146;256;277;287) desempeñando un papel importante en los procesos nutricionales (4;11).

(b) Provee protección, manteniendo la integridad de la barrera epitelial (11), el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos (35), previniendo la invasión de agentes infecciosos, protección contra la invasión por patógenos oportunistas o el crecimiento de especies residentes con potencial patógeno y la competencia con patógenos mediante una resistencia no específica (113; 255; 277; 288). Las bacterias comensales estimulan a los enterocitos a promover la secreción de mucina, los fenómenos de proliferación y diferenciación celular (207). El epitelio intestinal, permite la realización de varias funciones como: absorción de los nutrientes, secreción de citocinas/quimiocinas que afectan a la colonización

microbiana, detección del microambiente intestinal y detección tanto de la microbiota benéfica como de la perjudicial (321; 322).

(c) Funciones tróficas sobre la proliferación y diferenciación del epitelio intestinal del huésped, y sobre el desarrollo, inducción y modulación de la respuesta inmune (255; 277; 321; 322). A medida que se establecen los agentes que constituyen la microbiota, el sistema inmunitario intestinal madura (15). El establecimiento de la microbiota proporciona al hospedero un fuerte efecto estimulador para la maduración del tejido linfoide asociado al intestino y la maduración del sistema inmune (290; 252).

Además, se le atribuye a la microbiota, regular el comportamiento neurofisiológico a través de las vías inmunológica, endocrina y neural. La comunicación intestino-cerebro es bidireccional. El eje microbiota-intestino-cerebro desempeña un papel crítico en la salud y la enfermedad, incluidos los trastornos neuropsiquiátricos. De tal manera que los cambios en la comunidad microbiana afectan el comportamiento y así estos cambios en el comportamiento alteran la composición de la microbiota intestinal (36). Además, algunos estudios han demostrado que la dieta induce cambios en la diversidad de bacterias que, a su vez, pueden influir en la ansiedad, la memoria y el aprendizaje (38; 276), afirmando que la manipulación de los microorganismos intestinales puede mejorar la salud mental (34).

2.4.7. Manipulación de la microbiota intestinal

La manipulación de la microbiota intestinal puede darse mediante cambios en la dieta, (320), usando antibióticos, probióticos prebióticos, antimicrobianos o mediante el trasplante de microbiota fecal (54). Los antimicrobianos (13) y los probióticos, modifican la microbiota intestinal (73;323).pero el efecto de una especie probiótica en la flora digestiva depende de la cepa y está determinado en gran medida por la producción de bacteriocina (73).

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

3.1. Hipótesis

Los microorganismos probióticos de uso alimentario o terapéutico humano que se expenden en nuestro país, inhiben el crecimiento de bacterias patógenas comunes en niveles comparables con los valores establecidos en el espectro de sensibilidad a los antibióticos convencionales usados para la terapia antibacteriana.

3.2. Diseño de Investigación

Investigación de tipo aplicada y de nivel explicativo.

3.3. Localización del estudio

La presente investigación se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Control de Enfermedades Transmisibles (CICET) - Biotecnología, y en los laboratorios del Área de Fisiología, Histología, Embriología y Genética de la Universidad Nacional de Cajamarca, (Av. Atahualpa N° 1050 – Cajamarca).

3.4. Población, muestra y unidad de análisis,

Población

La población estuvo constituida por la mayoría de los productos comerciales alimentarios y farmacéuticos que se expendan en el país y que contienen microorganismos probióticos.

Muestra

El tamaño de muestra se determinó en base a la proporción de productos probióticos que son frecuentemente comercializados en el país. Para estimar la proporción de productos con efecto bactericida, con una confiabilidad de 95%, una precisión de 9.5% y admitiendo un error máximo tolerable en la estimación del 5%, se calculó teniendo en cuenta una población con un tamaño indeterminado.

Para lo cual se aplicó la fórmula siguiente:

$$n \geq \frac{Z^2PQ}{E^2}$$

P = Proporción de efecto bactericida del probiótico 0,95

Q = Proporción del no efecto bactericida del probiótico 0,05

E = Precisión en las estimaciones

Z = Nivel de confianza (coeficiente que corresponde a la confianza del 95%)

$$0,05 \leq E \leq 0,1$$

$$n \geq \frac{(1,96)^2 (0,95) (0,05)}{(0,095)^2}$$

$$n \geq 20$$

Con este criterio se trabajó con una muestra constituida por 23 productos probióticos.

Unidad de análisis

Cada uno de los productos probióticos comerciales alimentarios o farmacéuticos.

Criterios de Inclusión

Fueron incluidos en el estudio los productos alimentarios o farmacéuticos que contienen microorganismos probióticos y que tuvieron la autorización oficial correspondiente para ser comercializados como tales.

3.5. Descripción del Diseño Metodológico

Protocolo general de evaluación del efecto antibacteriano de los probióticos:

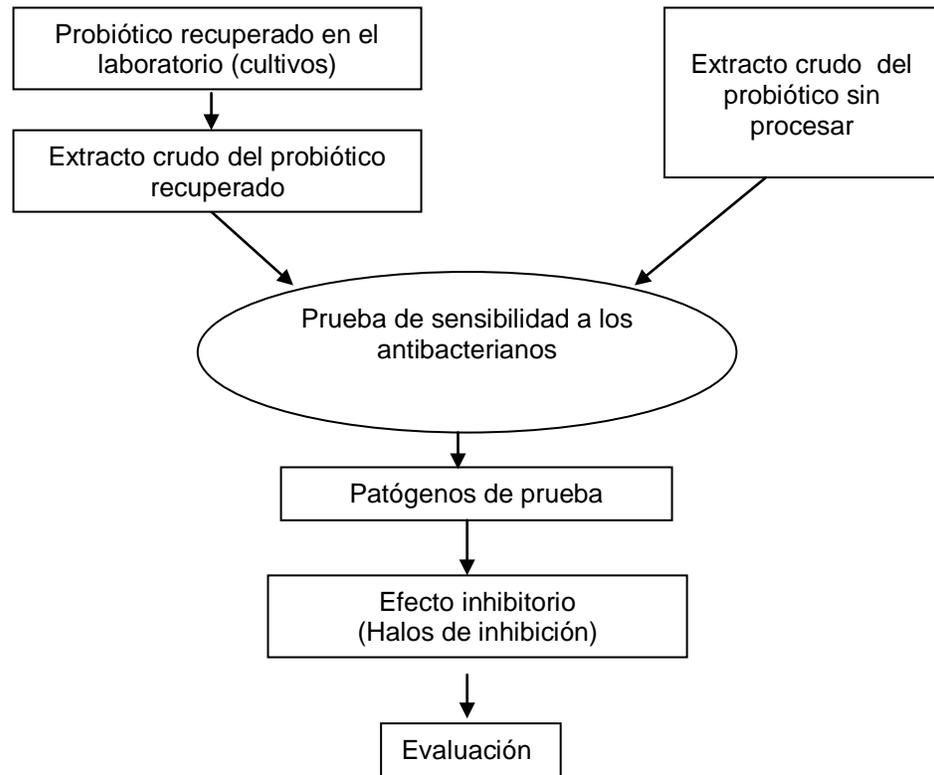
(Esquema 2)

- a. Recuperación en el laboratorio de las cepas probióticas.
- b. Obtención de extractos crudos a partir de los probióticos recuperados en el laboratorio o directamente de los productos probióticos seleccionados en el mercado.
- c. Realización de pruebas de sensibilidad a los antibacterianos a través del método de discos de sensibilidad.
- d. Evaluación de la sensibilidad a los antibacterianos probióticos

- **Evaluación del efecto antibacteriano de microorganismos probióticos**

Se realizó con el método de sensibilidad a los antibióticos de Kirby Bauer o de discos de sensibilidad a través del cual se determinó los halos de inhibición del crecimiento de bacterias patógenas (71; 96; 98; 324).

Esquema 2. Diagrama de evaluación del efecto antibacteriano de probióticos



Fuente: Elaboración propia

Cabe mencionar que fueron probados los métodos de pocillos en agar y el de siembra por acúmulos (96; 98;324), que también se recomiendan para este tipo de ensayos, pero fueron descartados debido a que en el primero hubo poca difusión del

extracto líquido crudo en el medio de cultivo de prueba y en el segundo se evidenció poco o nulo desarrollo del acúmulo de los probióticos en el medio de cultivo de prueba debido posiblemente a interferencias por la presencia del patógeno en crecimiento sembrado en mayor cantidad.

Prueba de sensibilidad a los antibióticos

Método de los discos de sensibilidad (324; 325)

- Se colocó en una placa Petri esterilizada entre 15 a 20 ml., de agar Müller-Hinton (MH) indicado para la prueba de sensibilidad a los antibióticos.
- Se dejó solidificar el agar
- Se procedió a realizar la correspondiente prueba de esterilidad.
- Se utilizó las placas que no mostraron contaminación en el medio de cultivo.

A. Recuperación de microorganismos probióticos (326)

Productos en placa con medio Agar M.R.S. (de Man, Rogosa and Sharpe)

Procedimiento

- Los productos probióticos líquidos obtenidos en el mercado fueron usados directamente. Haciendo uso de un asa bacteriológica se tomó 3 asadas del producto probiótico y se sembró directamente en el medio agar M.R.S.
- Los productos sólidos fueron reconstituidos en vehículos líquidos adecuados con solución salina tamponada.
- Se incubó en la estufa entre 24 a 48 horas a 35°C

- Se observó a las 24 horas para determinar si hubo crecimiento
- Se observó nuevamente a las 48 horas y se realizó la lectura para determinar si hubo crecimiento rápido o lento.

B. Estandarización de la obtención de extractos crudos de productos probióticos en tubo con caldo M.R.S. (326)

Procedimiento

- Se preparó alícuotas en tubos de ensayo con caldo M.R.S. con los productos probióticos líquidos obtenidos en el mercado y con los productos probióticos sólidos (reconstituidos en vehículos líquidos adecuados con solución salina tamponada).
- Haciendo uso de una pipeta se tomó 2 ml. de yogurt y se colocó en tubos conteniendo 8ml de caldo M.R.S.
- Se tapó el tubo con papel aluminio.
- Se colocó en una gradilla y se dejó incubando en la estufa a 35 °C
- Se dejó por una semana agitando cada tubo dos veces por día por la mañana y la tarde.
- Transcurrido este tiempo se centrifugó a 5000 RPM por 30 minutos.
- Se usó una jeringa para obtener el sobrenadante sin someterlo a procesamiento adicional. Esto constituyó el extracto crudo.
- Se esterilizó el sobrenadante por medio de filtración a través de bujías descartables que contenían membranas de filtración.

- Se colocó los sobrenadantes esterilizados en tubos con tapa rosca para la realización de las pruebas de sensibilidad antibiótica.

Activación de patógenos

- Se activó las cepas patógenas en placas con agar Müller-Hinton (MH) 18 horas antes de la centrifugación de los productos probióticos cultivados en caldo M.R.S.
- Se obtuvo una placa de cultivo con agar MH que se incubó por 18 a 24 horas.

Preparación del inóculo de la cepa patógena

Se realizó el mismo día que se obtuvo los extractos crudos de los productos probióticos que fueron cultivados en caldo M.R.S. (de Man, Rogosa and Sharpe)

Método directo de inoculación a partir de colonias aisladas (325; 326)

- Se preparó la suspensión del patógeno preferentemente de una placa de cultivo con agar Müller-Hinton (MH) e incubada por 18 horas, se seleccionó las colonias que fueron aisladas de los patógenos de prueba.
- Con un asa de siembra se transfirió parte de una colonia o colonias completas a un frasco conteniendo solución salina y se preparó una suspensión directa.
- Se ajustó la suspensión (concentración del cultivo de la cepa patógena) a la dilución 0,5 de la escala de Mc. Farland.
- Se diluyó a $\frac{1}{4}$ de la concentración de cada preparado del patógeno.

Inoculación del patógeno de prueba (preparación de las placas con el patógeno

(326).

- Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, se sumergió un hisopo estéril en la suspensión, se hizo rotar el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo.
- Se inoculó la superficie seca de la placa Petri conteniendo agar Müller-Hinton (MH), estriando con el hisopo en dos direcciones de estriado perpendicular y oblicua, ambas para asegurar una distribución uniforme del inóculo.
- Antes de colocar los discos se dejó secar las placas a temperatura de incubación durante 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.

Aplicación de los discos (325; 326)

- Se colocó sobre el medio de cultivo inoculado con el patógeno de prueba los discos de prueba hechos a partir de pads que se utilizan para la electrotransferencia de proteínas sobre los cuales se colocó previamente el sobrenadante filtrado de cada uno de los productos probióticos.
- Se colocó los discos individuales sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril y la punta de una aguja presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar.

- Se distribuyó los 5 discos uniformemente, de modo que estén a una distancia mínima de 25 mm. uno del otro.
- Se colocó en el centro de la placa un disco comercial conteniendo Gentamicina como control positivo de inhibición del crecimiento del patógeno en prueba.

▪ **Incubación** (325; 326)

- Se incubó las placas por 24 horas en posición invertida a 35°C dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos.
- Transcurrido el tiempo recomendado se examinó cada placa midiendo los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco, haciendo uso de una regla milimetrada.
- Se registró los datos haciendo uso de tablas.
- La lectura de los halos de inhibición se interpretó como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías establecidas por el NCCLS Disk diffusion supplemental tables (72; 327).

Procesamiento y Análisis de Datos

Se realizó un diseño de dos factores con tratamiento de 11 patógenos y bloque de 23 productos probióticos con tres repeticiones por cruce. Para la contrastación de la hipótesis se usó el análisis de varianza (ANOVA) al 5% de significación. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el diseño de bloque completamente randomizado.

CAPÍTULO IV

RESULTADO Y DISCUSIÓN

A través de los resultados obtenidos se pudo verificar la variabilidad del efecto de los probióticos evaluados sobre los patógenos comunes probados en la presente investigación. Dicha variabilidad comprende efectos que en la mayoría de los casos, se ubicaron dentro del rango del espectro de sensibilidad bacteriana (sensibilidad completa o sensibilidad intermedia), frente a los antibióticos convencionales oficializados para su uso en la terapia antibacteriana infecciosa humana, mostrando efectos bactericidas y bacteriostáticos, aunque también se evidenció resistencia de algunas bacterias frente a un grupo menor de los probióticos evaluados en el presente estudio.

Cabe mencionar que para la determinación de los límites de los recuadros que representaron resistencia, sensibilidad intermedia y completa sensibilidad, mostrados en las Figuras 1 a 11 se ha tomado en cuenta los valores mínimos y máximos establecidos para las categorías mencionadas anteriormente en los patrones estándar por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (328), del halo de inhibición para cada uno de los patógenos evaluados en el presente estudio (Tablas 2 a 5). Asimismo, las líneas en guión implican que los valores de sensibilidad pueden ser proyectados en el caso del recuadro de sensibilidad completa (S) a valores mayores y en el caso del recuadro de resistencia (R) a valores menores.

De acuerdo a lo anteriormente indicado, en la Figura 1 se observó los niveles de inhibición de los probióticos evaluados sobre el crecimiento de *Escherichia coli* de

origen fecal (bacteria gram negativa, del grupo de las Enterobacteriaceae) (89), donde el mayor efecto lo mostró el Yogurt Bio frutado La Molina -Cultivos Probióticos (probiótico N°16, Figura 1), produciendo un halo de inhibición de 17 mm. de diámetro, seguido por Lactéol®fort y Lactibiane® (probióticos N° 21 y 22, Figura 1) que produjeron, ambos, halos de inhibición de 16 mm. de diámetro. Adicionalmente, la leche en tarro Gain Plus Advance y los productos Bacilor, Yogurt De Alonso, Yogurt Metro Bebible, Yogurt Bebible Vigor Probiótico, Yogurt Santa Natura, Biolactol y Enterogermina® (probióticos N° 1, 4, 13, 14, 17, 19, 20 y 23, Figura 1), produjeron halos de 15 mm. de diámetro. Cabe resaltar que los halos de inhibición mostrados anteriormente, fueron los más cercanos al del antibiótico usado como control (Gentamicina).

De otra parte, teniendo en cuenta lo establecido como espectro convencional de sensibilidad de las Enterobacteriaceae (327), (Tabla 2), donde está incluida *Escherichia coli*, los halos de inhibición que se ubiquen en la categoría “sensible”, deben ser mayores o iguales a 15 mm. de diámetro. De acuerdo a esto, el control (Gentamicina) produjo halos de inhibición con diámetros de 21 mm., evidenciando alta sensibilidad por parte de *Escherichia coli* a dicho antibiótico.

De manera complementaria, si se hace una comparación en conjunto del efecto de los probióticos probados frente a *Escherichia coli* de origen fecal, respecto al efecto de los antibióticos sugeridos para la terapia convencional de las infecciones causadas por dicha bacteria (Figura 1 y Tabla 2), se puede notar que el efecto de un grupo considerable de los probióticos evaluados (11= 47.8%) comparten el espectro sensible (recuadro S) e intermedio (recuadro I), dado que los diámetros de los halos de inhibición fueron iguales o superiores a 15 mm. de diámetro (a pesar de presentar un

efecto menor que el control Gentamicina), significando esto que sus efectos podrían ser bactericidas o bacteriostáticos. Esta interpretación está basada en lo establecido supplemental tables, según Win et al. (327) y Quintana, (72), quienes sostuvieron que los efectos de los antibióticos ubicados en el rango de la categoría “Sensible” (Tabla 2), se interpretan como bactericidas y aquellos efectos ubicados dentro del rango de la categoría “Intermedio” deben ser entendidos como bacteriostáticos. Así mismo, la actividad de los antibióticos que se traduzca en halos de inhibición que se enmarquen en el rango de la categoría “Resistente”, debe ser interpretada como “de escaso efecto” o “sin efecto”.

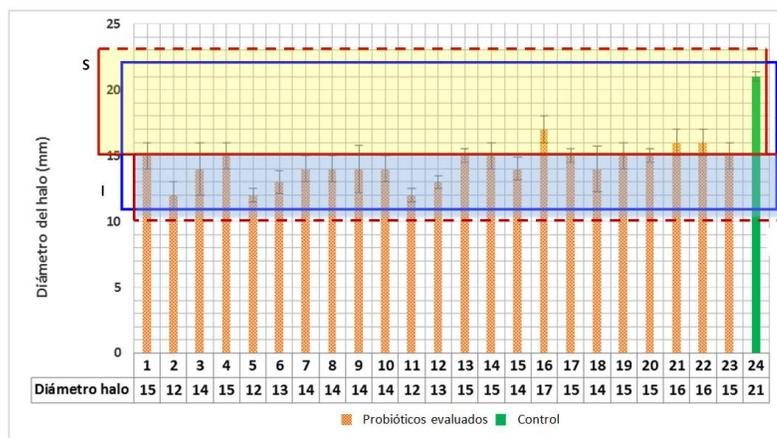


Figura 1. Efecto de probióticos sobre *Escherichia coli* de origen fecal.

LEYENDA: 1. Leche en Tarro Gain Plus Advance 2. Leche en Tarro Nan 3 Junior 3. GLUTAPAK® reuteri 4. Bacilor 5. Leche en Tarro Nan Pro 2 6. Vacuna Gel Nb Probiótica 7. Yogurt Gloria Acti-Bio 8. Yogurt Yoleit 9. Yogurt Pura Vida Nutribio 10. Yogurt Laive Sbelt 11. Yogurt Hoja Verde 12. Yogurt Gloria Prodefensis 13. El Yogurt De Alonso 14. Yogurt Metro Bebible 15. Yogurt Wong Bebible 16. Yogurt Bio Frutado La Molina – Cultivos Probióticos 17. Yogurt Bebible Vigor Probiótico 18. Yogurt Natural Semi-Descremado Light Bircher-Benner 19. Yogurt Santa Natura 20. Biolactol 21. Lactéol® Fort 22. Lactibiane® 23. Enterogermina® 24. Control.

S: espectro convencional de sensibilidad a los antibióticos I: espectro convencional de sensibilidad intermedia a los antibióticos R: espectro de resistencia a los antibióticos convencionales.

El otro grupo de probióticos (12 = 52,2%), produjo halos de inhibición menores a 15 mm., compartiendo parte del rango de sensibilidad intermedia baja (recuadro I de la Figura 1) y también del rango de resistencia (recuadro R), aunque los diámetros de

los halos de este grupo tienden a ubicarse más en el espectro de escaso o nulo efecto (categoría “Resistente”), dado que dichos halos fueron en la mayoría de los casos menores a 15 mm. de diámetro y de acuerdo a lo establecido en la Tabla 2, los valores de los halos de inhibición con diámetros menores a 15 mm. ya son considerados como valores que evidencian una resistencia manifiesta por parte de las bacterias probadas, en este caso de las Enterobacteriaceae.

En los resultados anteriormente expuestos se encontró relación en lo señalado por Navarro et al.(329), quienes sostuvieron que el patrón de resistencia observado en el antibiograma de un microorganismo es la suma del patrón de resistencia natural característico de la especie más el de las resistencias adquiridas y en el caso de las enterobacterias los patrones de sensibilidad a diferentes compuestos antimicrobianos pueden deberse a diferentes mecanismos de naturaleza enzimática como de orden molecular genético.

Tabla 2. Patrones estándar del halo de inhibición para Enterobacteriaceae

Agente antimicrobiano	Contenido del disco	Diámetro de la zona de inhibición en <u>mm.</u>		
		Resistente < 6 =	Intermedio	Sensible > 6 =
Ampicilina (Enterobacteriaceae)	10 µg	13	14-16	17
Amoxicilina / Acido clavulámico (Enterobacteriaceae)	20/10 µg	13	14-17	18
Cefalotina/cefazolina	30 µg	14	15-17	18
Cefotaxima	30 µg	14	15-22	23
Ceftriaxona	30 µg	13	14-20	21
Ceftazidima	30 µg	14	15-17	18
Gentamicina	10 µg	12	13-14	15
Amicacina	30 µg	14	15-16	17
Acido Nalidixico	30 µg	13	14-18	19
Ciprofloxacina	5 µg	15	16-20	21
Ofloxacina	5 µg	12	13-15	16
Norfloxacina	10 µg	12	13-16	17
Trimetoprima - Sulfametoxazol	1.25/23.75 µg	10	11-15	16
Nitrofurantoína	300 µg	14	15-16	17

Fuente: Adaptado de NCCLS (328); García (330).

En este sentido y más específicamente en relación al efecto de los microorganismos probióticos que contienen los productos que han sido enfrentados a las Enterobacteriaceae, puede afirmarse que la mayoría fueron comúnmente bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* e independientemente de la especie que esté en preponderancia. Producen en términos generales, fundamentalmente ácido láctico, disminuyendo el pH del medio. Así mismo, incremento de la actividad de la lactasa, efecto competitivo con bacterias enteropatógenas, al inhibir su crecimiento, debido a la producción de proteínas de actividad antibiótica conocidas como bacteriocinas (lactocinas, nicinas) (331), lo que se refuerza con los estudios realizado por Beserra et. al. (332) en postres con *L. acidophilus*, quienes encontraron que los productos probióticos redujeron los patógenos y por Abdulla et. al. (333) quienes demostraron que *Lactobacillus acidophilus* produjo una sustancia inhibidora de tipo bacteriocina con un amplio espectro de actividad antimicrobiana lo que sugiere su valor protector frente a patógenos entéricos.

De acuerdo a lo anteriormente mencionado, cabe señalar que una determinación más concluyente de efectos bactericidas, bacteriostáticos o de generación de resistencia de cada uno de los probióticos evaluados en la presente investigación o de otro lado para conocer la naturaleza intrínseca de su sensibilidad o resistencia, implicaría la realización de investigaciones adicionales direccionadas a esclarecer dichos efectos con mayor detalle y precisión, incluso a nivel de sus mecanismos moleculares propios.

Seguidamente, en relación con el efecto probiótico sobre *Enterococcus* sp. (microorganismo gram positivo, del grupo de los estreptococos), en la Figura 2 se observó los niveles de inhibición sobre el crecimiento de dicha bacteria, en este caso

se obtuvo un mayor efecto por parte de Biolactol, Lactéol®fort y Yogurt Laive Sbelt (probióticos N° 20, 21 y 10 de la Figura 2, respectivamente), con halos de 22 mm. de diámetro, seguido por Glutapak® reuteri, Vacuna Gel NB Probiótica, Yogurt Yoleit, Yogurt Metro Bebible, Yogurt Wong Bebible, Yogurt Bio Frutado La Molina Cultivos Probióticos y Yogurt Santa Natura (probióticos N° 3, 6, 8, 14, 15, 16 y 19 de la Figura 2, respectivamente), que produjeron halos de 21mm.; seguido por Lactibiane® (probiótico N° 22 de la Figura 2), con un halo de 20 mm; Yogurt Gloria prodefensis, el Yogurt de Alonso y Enterogermina® (probióticos N° 12, 13 y 23 de la Figura 2), con halos de 16 mm.; y el Yogurt bebible Vigor Probiótico (probiótico N° 17 de la Figura 2), mostró un halo de 15 mm. Los halos señalados anteriormente fueron los más cercanos al valor de 22 mm. de diámetro de los halos del antibiótico control. Cabe resaltar que los productos con probióticos Yogurt Laive Sbelt, Biolactol y Lactéol®fort (probióticos N° 10, 20 y 21 de la Figura 2), presentaron una respuesta similar al control (Gentamicina).

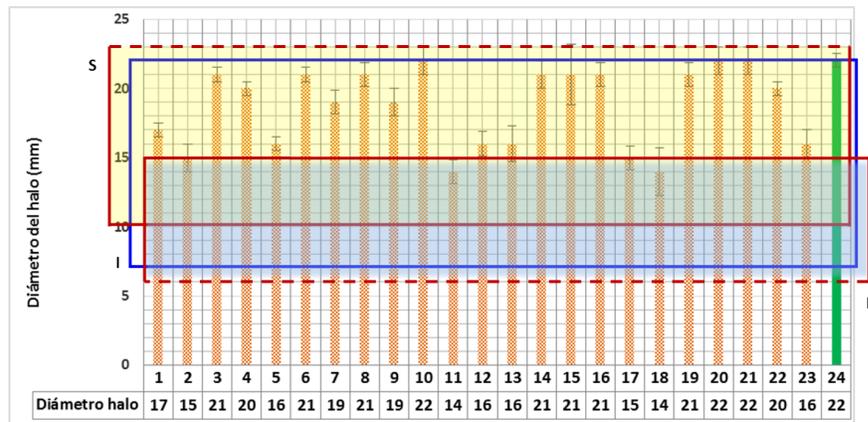


Figura 2. Efecto de probióticos sobre *Enterococcus* sp.

LEYENDA: 1. Leche en Tarro Gain Plus Advance 2. Leche en Tarro Nan 3 Junior 3. GLUTAPAK® reuteri 4. Bacilor 5. Leche en Tarro Nan Pro 2 6. Vacuna Gel Nb Probiótica 7. Yogurt Gloria Acti-Bio 8. Yogurt Yoleit 9. Yogurt Pura Vida Nutribio 10. Yogurt Laive Sbelt 11. Yogurt Hoja Verde 12. Yogurt Gloria Prodefensis 13. El Yogurt De Alonso 14. Yogurt Metro Bebible 15. Yogurt Wong Bebible 16. Yogurt Bio Frutado La Molina – Cultivos Probióticos 17. Yogurt Bebible Vigor Probiótico 18. Yogurt Natural Semi-Descremado Light Bircher-Benner 19. Yogurt Santa Natura 20. Biolactol 21. Lactéol® Fort 22. Lactibiane® 23. Enterogermina® 24. Control.

S: espectro convencional de sensibilidad a los antibióticos I: espectro convencional de sensibilidad intermedia a los antibióticos R: espectro de resistencia a los antibióticos convencionales.

Haciendo una comparación en conjunto con los espectros de sensibilidad convencional, establecidos como estándares frente a *Enterococcus* sp. (Tabla 3), se verificó que una mayoría bastante significativa de 19 probióticos (82,6%) produjeron un efecto entre bactericida (recuadro S) y bacteriostático (recuadro I), claramente definido.

Adicionalmente, 4 probióticos (4=17,4%), a pesar que compartieron el rango de la categoría “Resistente” (Figura 2) con diámetros de halo entre 14 y 15 mm., puede asumirse que sus efectos fueron más bacteriostáticos que poco efectivos o nulos sobre la cepa evaluada de *Enterococcus* sp. Este resultado estaría evidenciando que la cepa del *Enterococcus* sp. probado es considerablemente sensible frente a los probióticos ensayados, incluso más que las enterobacterias sometidas al estudio.

Tabla 3. Patrones estándar del halo de inhibición para *Enterococcus* sp.

Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición		
		Resistente	Intermedia	Sensible
Penicilina ^b	10 U	≤14	--	≥15
Ampicilina ^b	10	≤16	--	≥17
Vancomicina ^c	30	≤14	15-16	≥17
Teicoplanina	30	≤10	11-13	≥14
Eritromicina	15	≤13	14-22	≥23
Gentamicina ^d	120	6	7-9 ^e	≥10
Estreptomina ^d	300	6	7-9 ^e	≥10
Ciprofloxacino	5	≤15	16-20	≥21
Norfloxacino	10	≤12	13-16	≥17
Nitrofurantoina	300	≤14	15-16	≥17
Tetraciclina	30	≤14	15-18	≥19
Fosfomicina	200	≤12	13-15	≥16

Fuente: Adaptado de NCCLS (328); García (330).

En el caso de otro microorganismo de la familia Enterobacteriaceae, gram negativo, como es *Edwardsiella* sp., los niveles de inhibición sobre el crecimiento de esta bacteria intestinal, mostrados en la Figura 3, indicaron que el control mostró efectos altamente bactericidas (diámetros de inhibición de 24 mm. de diámetro). Aun así de

los probióticos probados, 4 de ellos, la Vacuna Gel NB Probiótica, Yogurt Gloria Acti-Bio, Lactéol®fort y Lactibiane® (probióticos N° 6, 7, 21 y 22 de la Figura 3, respectivamente), produjeron efectos más bactericidas que bacteriostáticos.

Es necesario destacar que 11 de los probióticos evaluados (47,8%), mostraron efectos que fueron potencialmente bactericidas o bacteriostáticos claramente definidos; los otros 12 probióticos (52,2%), produjeron halos de inhibición que pueden ser ubicados entre los que causan efectos de más resistencia que de sensibilidad.

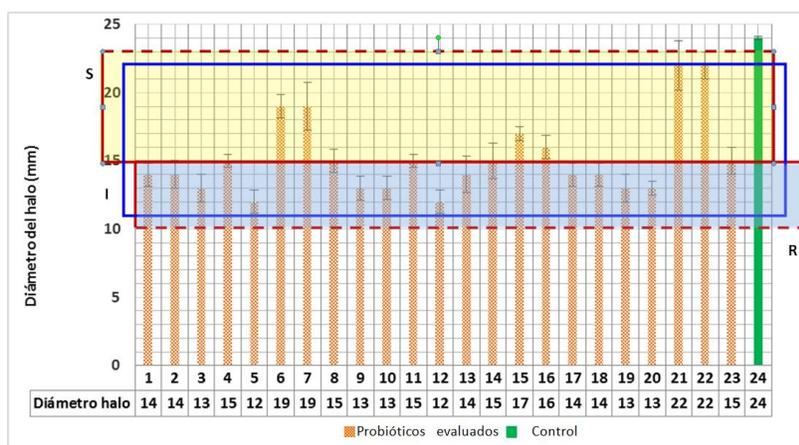


Figura 3. Efecto de probióticos sobre *Edwardsiella* sp.

LEYENDA: 1. Leche en Tarro Gain Plus Advance 2. Leche en Tarro Nan 3 Junior 3. GLUTAPAK® reuteri 4. Bacilor 5. Leche en Tarro Nan Pro 2 6. Vacuna Gel Nb Probiótica 7. Yogurt Gloria Acti-Bio 8. Yogurt Yoleit 9. Yogurt Pura Vida Nutribio 10. Yogurt Laive Sbelt 11. Yogurt Hoja Verde 12. Yogurt Gloria Prodefensis 13. El Yogurt De Alonso 14. Yogurt Metro Bebible 15. Yogurt Wong Bebible 16. Yogurt Bio Frutado La Molina – Cultivos Probióticos 17. Yogurt Bebible Vigor Probiótico 18. Yogurt Natural Semi-Descremado Light Bircher-Benner 19. Yogurt Santa Natura 20. Biolactol 21. Lactéol® Fort 22. Lactibiane® 23. Enterogermina® 24. Control.
 S: espectro convencional de sensibilidad a los antibióticos I: espectro convencional de sensibilidad intermedia a los antibióticos R: espectro de resistencia a los antibióticos convencionales

Cabe resaltar que *Edwardsiella* sp. produjo una respuesta bastante similar a *Escherichia coli* fecal (de sensibilidad intermedia), por lo que también este comportamiento podría ser explicado de acuerdo a los términos definidos por Tormo (331), sobre todo en relación a la disminución del pH y la producción de bacteriocinas y reforzado con el estudio realizado por El-Kholy et. al.(334) que encontraron la capacidad de las bacterias probióticas para inhibir *in vitro* el crecimiento de *E. coli*.

Aun así, se reitera la necesidad de estudios más específicos para esclarecer los efectos probióticos sobre los patógenos evaluados.

El siguiente análisis mostró los niveles de inhibición sobre el crecimiento de *Klebsiella* sp. por los probióticos evaluados (Figura 4), donde se observó que el grupo de probióticos Vacuna Gel NB Probiótica, Yogurt Gloria Acti-Bio, Yogurt Yoleit, Yogurt Pura Vida Nutribio, Yogurt Laive Sbelt, Yogurt Metro Bebible, Yogurt Wong Bebible, Yogurt Bebible Vigor Probiótico, Yogurt Natural Semi-Descremado Light Bircher -Benner, Yogurt Santa Natura y Lactéol®fort, (probióticos N° 6, 7, 8, 9, 10, 14, 15, 18, 19 y 21 de la Figura 4, respectivamente), presentaron una respuesta mayor al control (Gentamicina), con diámetros de sus halos de inhibición comprendidos entre 17 y 20 mm., el control produjo halos de 16 mm. de diámetro. En este caso el control produjo un efecto bactericida no muy considerable dado que sus halos de inhibición se acercan más al límite inferior del efecto bactericida (categoría Sensible), establecido para los antibióticos convencionales aprobados para el tratamiento de infecciones causadas por las Enterobacteriaceae y dentro de ellas el caso de *Klebsiella* sp.

Es necesario mencionar que 4 de los probióticos probados (17,4%), mostraron efectos que comparten los espectros bacteriostático y resistente, con una notoria tendencia a la resistencia y un quinto producto, la Enterogermina® (probiótico N° 23 de la Figura 4) no produjo efecto inhibitor sobre *Klebsiella* sp, mostrándose esta bacteria como resistente al efecto de dicho producto.

El resultado anterior permite afirmar que *Klebsiella* sp. mostró una sensibilidad considerable frente a los probióticos probados. En el mismo sentido, puede señalarse que los fundamentos teóricos de la variabilidad de sensibilidad de las Enterobacteriaceae que se mostraron igualmente en los casos anteriores, a la fecha aún no han sido dilucidados con mayor precisión, requiriéndose estudios más detallados que aclaren la naturaleza de estos hallazgos.

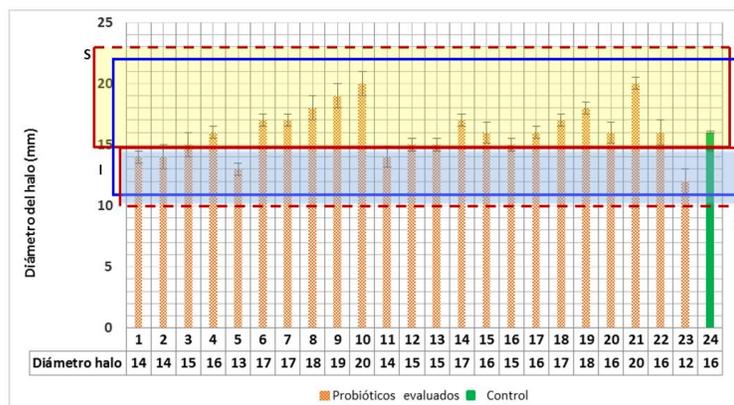


Figura 4. Efecto de probióticos sobre *Klebsiella* sp.

LEYENDA: 1. Leche en Tarro Gain Plus Advance 2. Leche en Tarro Nan 3 Junior 3. GLUTAPAK® reuteri 4. Bacilor 5. Leche en Tarro Nan Pro 2 6. Vacuna Gel Nb Probiótica 7. Yogurt Gloria Acti-Bio 8. Yogurt Yoleit 9. Yogurt Pura Vida Nutribio 10. Yogurt Laive Sbelt 11. Yogurt Hoja Verde 12. Yogurt Gloria Prodefensis 13. El Yogurt De Alonso 14. Yogurt Metro Bebible 15. Yogurt Wong Bebible 16. Yogurt Bio Frutado La Molina – Cultivos Probióticos 17. Yogurt Bebible Vigor Probiótico 18. Yogurt Natural Semi-Descremado Light Bircher-Benner 19. Yogurt Santa Natura 20. Biolactol 21. Lactéol® Fort 22. Lactibiane® 23. Enterogermina® 24. Control.
 S: espectro convencional de sensibilidad a los antibióticos I: espectro convencional de sensibilidad intermedia a los antibióticos R: espectro de resistencia a los antibióticos convencionales.

A continuación, en la Figura 5, se analizaron los niveles de inhibición del crecimiento de *Pseudomonas* sp. (bacteria gram negativa, pero no pertenece a la familia de las Enterobacteriaceae), donde se observó que casi la mitad de los productos probióticos evaluados (10=43,47%), indujeron respuestas compartidas entre sensibilidad completa y sensibilidad intermedia con potenciales efectos bactericidas y bacteriostáticos, de los cuales 5 probióticos (21,7%), produjeron efectos bactericidas notorios. Coincidiendo con la investigación realizada por El-Kholy et al. (334), donde encontró que las bacterias probióticas tienen la capacidad de prevenir el crecimiento de *S.aureus in vitro* y en

yogurt. Los demás probióticos (13=56,53%), indujeron respuestas de sensibilidad intermedia débil y de resistencia.

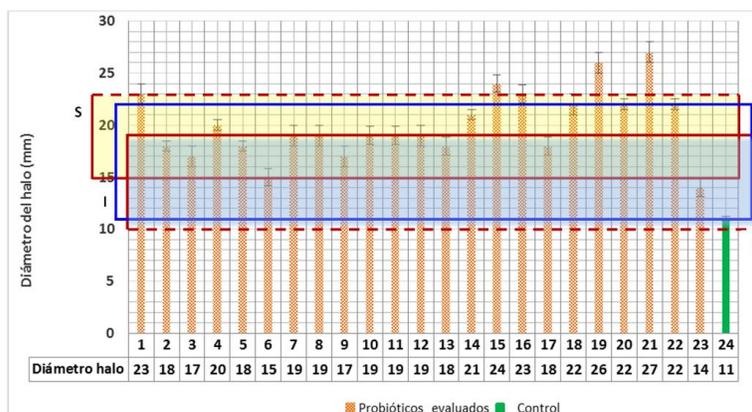


Figura 5. Efecto de probióticos sobre *Pseudomonas* sp.

LEYENDA: 1. Leche en Tarro Gain Plus Advance 2. Leche en Tarro Nan 3 Junior 3. GLUTAPAK® reuteri 4. Bacilor 5. Leche en Tarro Nan Pro 2 6. Vacuna Gel Nb Probiótica 7. Yogurt Gloria Acti-Bio 8. Yogurt Yoleit 9. Yogurt Pura Vida Nutribio 10. Yogurt Laive Sbelt 11. Yogurt Hoja Verde 12. Yogurt Gloria Prodefensis 13. El Yogurt De Alonso 14. Yogurt Metro Bebible 15. Yogurt Wong Bebible 16. Yogurt Bio Frutado La Molina – Cultivos Probióticos 17. Yogurt Bebible Vigor Probiótico 18. Yogurt Natural Semi-Descremado Light Bircher-Benner 19. Yogurt Santa Natura 20. Biolactol 21. Lactéol® Fort 22. Lactibiane® 23. Enterogermina® 24. Control.

S: espectro convencional de sensibilidad a los antibióticos I: espectro convencional de sensibilidad intermedia a los antibióticos R: espectro de resistencia a los antibióticos convencionales

Adicionalmente, es necesario mencionar que el probiótico Enterogermina® (probiótico N° 23 de la Figura 5), mostró un efecto tendiente a la resistencia comparando estos resultados con la referencia convencional mostrada en la Tabla 4.

También cabe resaltar que el control Gentamicina, no produjo el efecto deseado, dado que de acuerdo a lo establecido en la Tabla 4, debería mostrar un efecto bactericida produciendo halos de inhibición iguales o mayores a 15 mm. de diámetro y en esta prueba los halos producidos por el control (11 mm. de diámetro), se ubicaron más bien en el espectro de resistencia por parte de la *Pseudomonas* sp. evaluada.

De acuerdo a los resultados obtenidos, si bien es cierto que la *Pseudomonas* sp, evaluada mostró un comportamiento de resistencia frente a la Gentamicina usada como

control, contrariamente resultó ser sensible al efecto de la mitad de los probióticos probados, sobre todo altamente sensible a Yogurt Wong Bebible, Yogurt Santa Natura y Lactéol® fort (Probióticos N° 15, 19 y 21 de la Figura 5, respectivamente).

Tabla 4. Patrones estándar del halo de inhibición para *Pseudomonas aeruginosa*.

Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)		
		Resistente	Intermedia	Sensible
Ampicilina ^{a,c}	10	≤13	14-16	≥17
Cefalotina ^{c,d}	30	≤14	15-17	≥18
Cefazolina ^{c,d}	30	≤14	15-17	≥18
Gentamicina ^c	10	≤12	13-14	≥15
Amoxicilina/ácido clavulánico	20/10	≤13	14-17	≥18
Ampicilina/sulbactam	10/10	≤11	12-14	≥15
Piperacilina/tazobactam	100/10	≤17	18-20	≥21
Ticarcilina/ácido clavulánico	75/10	≤14	15-19	≥20
Mezlocilina	75	≤17	18-20	≥21
Ticarcilina	75	≤14	15-19	≥20
Piperacilina	100	≤17	18-20	≥21
Cefamandol	30	≤14	15-17	≥18
Cefonicid	30	≤14	15-17	≥18
Cefuroxima (oral)	30	≤14	15-22	≥23
Cefpodoxima	10	≤17	18-20	≥21
Cefixima	5	≤15	16-18	≥19
Cefoxitina	30	≤14	15-17	≥18
Cefotetan	30	≤12	13-15	≥16
Cefmetazol	30	≤12	13-15	≥16
Cefoperazona ^a	75	≤15	16-20	≥21
Cefotaxima ^{a,d}	30	≤14	15-22	≥23
Ceftizoxima ^a	30	≤14	15-19	≥20
Ceftriaxona ^{a,d}	30	≤13	14-20	≥21
Cefepima	30	≤14	15-17	≥18
Imipenem	10	≤13	14-15	≥16
Meropenem	10	≤13	14-15	≥16
Amikacina	30	≤14	15-16	≥17
Ciprofloxacino ^{a,c}	5	≤15	16-20	≥21
Levofloxacino	5	≤13	14-16	≥17
Trimetoprim/sulfametoxazol ^{a,c}	1,25/23,75	<10	11-15	>16
Ceftazidima ^e	30	≤14	15-17	≥18
Aztreonam ^e	30	≤15	16-21	≥22
Kanamicina	30	≤13	14-17	≥18
Netilmicina	30	≤12	13-14	≥15
Tobramicina	10	≤12	13-14	≥15
Tetraciclina ^c	30	≤14	15-18	≥19
Cloranfenicol ^a	30	≤12	13-17	≥18
Carbenicilina	100	≤19	20-22	≥23
Cinoxacino	100	≤14	15-18	≥19
Lomefloxacino	10	≤18	19-21	≥22
Norfloxacino	10	≤12	13-16	≥17
Ofloxacino	5	≤12	13-15	≥16
Loracarbef ^f	30	≤14	15-17	≥18
Nitrofurantoina	300	≤14	15-16	≥17
Sulfisoxazol	250 o 300	≤12	13-16	≥17
Trimetoprim	5	≤10	11-15	≥16
Fosfomicina	200	≤12	13-15	≥16

Fuente: Adaptado de NCCLS (328); García (330).

Esta evidencia encontrada sobre la resistencia de *Pseudomonas* sp. resultó coincidente con el hecho de la alta multiresistencia típica que mostró la mayoría de

estas bacterias causantes de diversidad de infecciones humanas difíciles de tratar de acuerdo a lo sostenido por Restrepo et al. (335), frente a lo cual un grupo considerable de antibióticos, incluida la Gentamicina, usada como control en esta prueba, resulto poco eficaz.

Continuando con el análisis de los efectos probióticos, en la Figura 6, se analizó los niveles de inhibición sobre el crecimiento de *Proteus vulgaris* (otra de las Enterobacteriaceae infecciosas más comunes), donde el efecto inhibitor del control Gentamicina fue claramente bactericida, produciendo halos de inhibición de 24 mm., de diámetro.

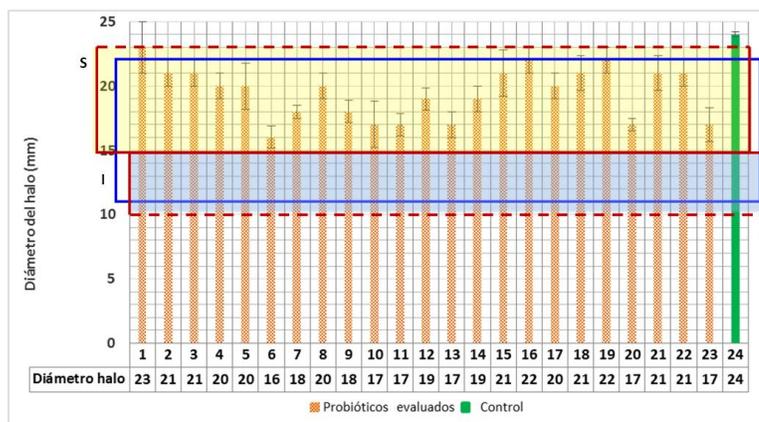


Figura 6. Efecto de probióticos sobre *Proteus vulgaris*

LEYENDA: 1. Leche en Tarro Gain Plus Advance 2. Leche en Tarro Nan 3 Junior 3. GLUTAPAK® reuteri 4. Bacilor 5. Leche en Tarro Nan Pro 2 6. Vacuna Gel Nb Probiótica 7. Yogurt Gloria Acti-Bio 8. Yogurt Yoleit 9. Yogurt Pura Vida Nutribio 10. Yogurt Laive Sbelt 11. Yogurt Hoja Verde 12. Yogurt Gloria Prodefensis 13. El Yogurt De Alonso 14. Yogurt Metro Bebible 15. Yogurt Wong Bebible 16. Yogurt Bio Frutado La Molina – Cultivos Probióticos 17. Yogurt Bebible Vigor Probiótico 18. Yogurt Natural Semi-Descremado Light Bircher-Benner 19. Yogurt Santa Natura 20. Biolactol 21. Lactéol® Fort 22. Lactibiane® 23. Enterogermina® 24. Control.

S: espectro convencional de sensibilidad a los antibióticos I: espectro convencional de sensibilidad intermedia a los antibióticos R: espectro de resistencia a los antibióticos convencionales

Cabe resaltar que a pesar que los halos de inhibición mostrados por todos los probióticos probados (entre 16 y 23 mm. de diámetro), resultaron ser menores a los producidos por el control (Gentamicina) al hacer una comparación más global

respecto al efecto de los otros antibióticos convencionales, sugeridos como antibacterianos efectivos frente a las Enterobacteriaceae (Tabla 2), pudo observarse que todos los probióticos (100%), produjeron un efecto más bactericida que bacteriostático sobre la cepa de *Proteus vulgaris* evaluada en esta investigación, dado que sus halos inhibitorios se ubicaron mayormente en el espectro de la categoría sensible convencional.

A continuación, en la Figura 7 se encontró que en los niveles de inhibición sobre el crecimiento de *Shigella* sp., se pudo evidenciar que ningún producto probiótico presentó un efecto (diámetro del halo de inhibición), mayor al del control (Gentamicina) utilizado en la presente investigación.

Se resalta que dicho control produjo un efecto fuertemente bactericida sobre la *Shigella* sp. evaluada, implicando que dicha bacteria es muy sensible frente al control utilizado. A pesar de ello, al comparar la actividad inhibitoria de los probióticos probados sobre *Shigella* sp. con el espectro de sensibilidad convencional mostrado en la Tabla 2 y Figura 7, se pudo notar que el efecto que produjeron los probióticos evaluados se encontró más en el espectro de sensibilidad intermedia. En este sentido, 10 de los probióticos evaluados (43,5%), indujeron en los patógenos respuestas de sensibilidad intermedia y 13 probióticos (56,5%), indujeron respuestas de sensibilidad intermedia baja o de resistencia con halos de inhibición cuyos diámetros oscilaron entre 15 mm. o menos, de los cuales 5 probióticos (21,7%), ejercieron un efecto bacteriostático débil, al mostrar halos de inhibición entre 13 y 14 mm. de diámetro y 2 probióticos (9,7%), produjeron un efecto poco significativo, equivalente a una respuesta de resistencia por parte de los patógenos.

Con los resultados obtenidos respecto a la respuesta de *Shigella* sp., dicho patógeno resultó ser medianamente sensible a los probióticos probados sobre todo a Yogurt Gloria Acti-Bio, así como a Yogurt natural semi-descremado Light Bircher, Yogurt Santa Natura y Lactéol® fort (probióticos N° 7, 18, 19 y 21, de la Figura 7, respectivamente), mostrándose resistente frente a Leche en tarro Nan Pro 2 y a Enterogermina® (probióticos N° 5 y 23 de la Figura 7, respectivamente).

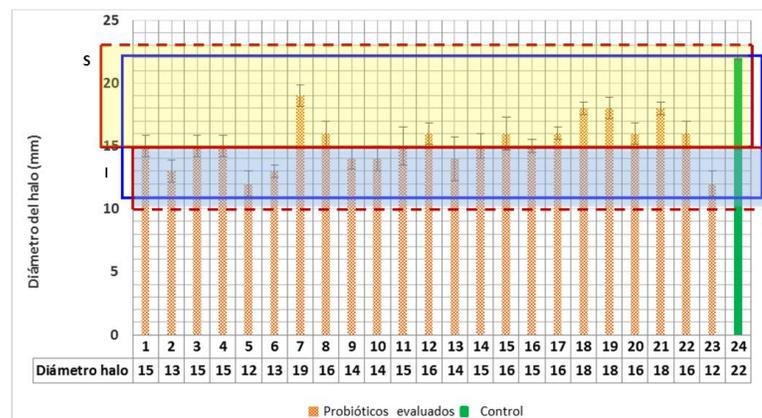


Figura 7. Efecto de probióticos sobre *Shigella* sp.

LEYENDA: 1. Leche en Tarro Gain Plus Advance 2. Leche en Tarro Nan 3 Junior 3. GLUTAPAK® reuteri 4. Bacilor 5. Leche en Tarro Nan Pro 2 6. Vacuna Gel Nb Probiótica 7. Yogurt Gloria Acti-Bio 8. Yogurt Yoleit 9. Yogurt Pura Vida Nutribio 10. Yogurt Laive Sbelt 11. Yogurt Hoja Verde 12. Yogurt Gloria Prodefensis 13. El Yogurt De Alonso 14. Yogurt Metro Bebible 15. Yogurt Wong Bebible 16. Yogurt Bio Frutado La Molina – Cultivos Probióticos 17. Yogurt Bebible Vigor Probiótico 18. Yogurt Natural Semi-Descremado Light Bircher-Benner 19. Yogurt Santa Natura 20. Biolactol 21. Lactéol® Fort 22. Lactibiane® 23. Enterogermina® 24. Control.

S: espectro convencional de sensibilidad a los antibióticos I: espectro convencional de sensibilidad intermedia a los antibióticos R: espectro de resistencia a los antibióticos convencionales

A continuación, en la Figura 8, se mostró los niveles de inhibición sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* donde puede resaltarse que un grupo de productos probióticos presentó un efecto mayor que el del control (produjo halos de 16 mm. de diámetro), como la Vacuna Gel NB Probiótica, Yogurt Pura Vida Nutribio, Lactéol® fort (probióticos N° 6, 9 y 21 de la Figura 8, respectivamente), que produjeron halos de 17 mm. Así mismo, Yogurt Laive Sbelt, Yogurt Metro Bebible, y Lactibiane® (probióticos N° 10, 14 y 22 de la Figura 8, respectivamente) produjeron halos de 18 mm., Yogurt Yoleit (probiótico N° 8 de la Figura 8) produjo un halo de

19 mm., y Yogurt Gloria Acti-Bio (probiótico N° 7 de la Figura 8) produjo un halo de 20 mm.

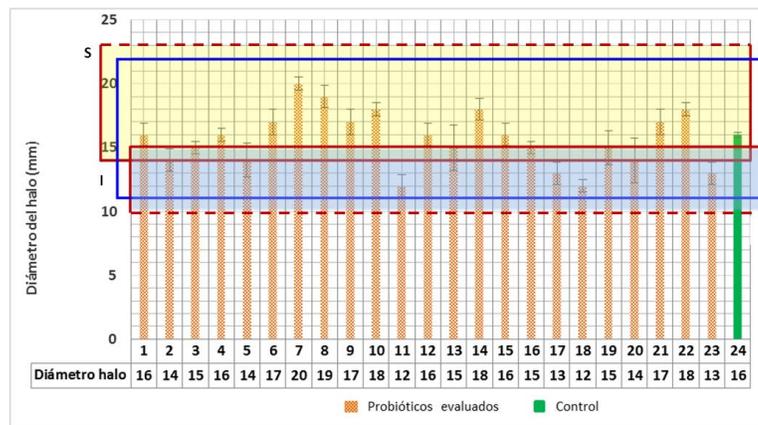


Figura 8. Efecto de probióticos sobre *Staphylococcus aureus*

LEYENDA: 1. Leche en Tarro Gain Plus Advance 2. Leche en Tarro Nan 3 Junior 3. GLUTAPAK® reuteri 4. Bacilor 5. Leche en Tarro Nan Pro 2 6. Vacuna Gel Nb Probiótica 7. Yogurt Gloria Acti-Bio 8. Yogurt Yoleit 9. Yogurt Pura Vida Nutribio 10. Yogurt Laive Sbelt 11. Yogurt Hoja Verde 12. Yogurt Gloria Prodefensis 13. El Yogurt De Alonso 14. Yogurt Metro Bebible 15. Yogurt Wong Bebible 16. Yogurt Bio Frutado La Molina – Cultivos Probióticos 17. Yogurt Bebible Vigor Probiótico 18. Yogurt Natural Semi-Descremado Light Bircher-Benner 19. Yogurt Santa Natura 20. Biolactol 21. Lactéol® Fort 22. Lactibiane® 23. Enterogermina® 24. Control.
 S: espectro convencional de sensibilidad a los antibióticos I: espectro convencional de sensibilidad intermedia a los antibióticos R: espectro de resistencia a los antibióticos convencionales.

De los efectos mostrados anteriormente, cabe resaltar que 12 de ellos (52,2%), produjeron halos de inhibición (entre 16 y 20 mm. de diámetro), que se ubicaron en los espectros de la categoría de sensibilidad completa y de sensibilidad intermedia, con efectos potencialmente bactericidas o bacteriostáticos, de ellos puede evidenciarse que 8 (34,7%), mostraron un efecto incluso mayor que el control, claramente bactericida. De otro lado, 11 probióticos mostraron efectos intermedios débiles e incluso de mayor resistencia. Este resultado demostró una sensibilidad considerable por parte de la cepa de *Staphylococcus aureus* sometida al efecto de los probióticos comerciales evaluados a través del presente estudio. En *Staphylococcus aureus*, tuvo mayor efecto el Yogurt Gloria Acti-Bio seguido del Yogurt Yoleit, lo que podría deberse a lo reportado por Hor y Liong (336) que los metabolitos antimicrobianos producidos por las bacterias ácido

lácticas, como el ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrógeno y diacetilo y las bifidobacterias inhiben el crecimiento de *S. aureus*.

Tabla 5. Patrones estándar del halo de inhibición para *Staphylococcus aureus*.

Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)		
		Resistente	Intermedia	Sensible
Oxacilina ^b (<i>S. aureus</i>)	1	≤10	11-12	≥13
Vancomicina ^d	30	--	--	≥15
Teicoplanina	30	≤11	11-13	≥14
Eritromicina ^e	15	≤13	14-22	≥23
Claritromicina ^e	15	≤13	14-17	≥18
Azitromicina ^e	15	≤13	14-17	≥18
Clindamicina ^e	2	≤14	15-20	≥21
Trimetoprim / sulfametoxazol	1,25/23,75	≤10	11-15	≥16
Gentamicina	10	<12	13-14	>15
Ciprofloxacino	5	≤15	16-20	≥21
Ofloxacino	5	≤12	13-15	≥16
Levofloxacino	5	≤13	14-16	≥17
Cloranfenicol ^e	30	≤12	13-17	≥18
Tetraciclina ^{f,g}	30	≤14	15-18	≥19
Norfloxacino	10	<12	13-16	>17
Nitrofurantoina	300	<14	15-16	>17
Sulfisoxazol	250 o 300	≤12	13-16	≥17
Trimetoprim	5	≤10	11-15	≥16

Fuente: Adaptado de NCCLS (328); García (330).

De otra parte, los niveles de inhibición sobre el crecimiento de *Salmonella paratyphi* A por los probióticos evaluados se presentaron en la Figura 9, donde se observó que el producto probiótico Lactéol® fort (probiótico N° 21 de la Figura 9), tuvo un mayor efecto que el control Gentamicina al producir un halo de inhibición de 25 mm. de diámetro, mientras que el control mostró un halo de 24 mm. Otros productos tuvieron una respuesta cercana al control como el Yogurt Yoleit (probiótico N° 8 de la Figura 9) con un halo de 22 mm., Yogurt Laive Sbelt y Yogurt Bio frutado La Molina-Cultivos Probióticos (probióticos N° 10 y 16 de la figura 9, respectivamente), con halos de 21 mm., Yogurt Santa Natura y Lactibiane® (probióticos N° 19 y 22 de la figura 9, respectivamente), con halos de 20 mm;

mientras que los otros productos como Leche en Tarro Gain Plus Advance, Yogurt Gloria Prodefensis y el Yogurt de Alonso (probióticos N° 1, 12 y 13 de la figura 9, respectivamente), produjeron halos de 19 mm., y de manera similar Yogurt Pura Vida Nutribio, Yogurt Metro Bebible y Yogurt Wong Bebible (probióticos N° 9, 14 y 15 de la figura 9, respectivamente), mostraron halos de 18 mm. De otra parte, Leche en Tarro Nan 3 Junior, Bacilor, Yogurt Gloria Acti-Bio, Yogurt natural semi-descremado Light Bircher – Benner y Biolactol (probióticos N° 2, 4, 7, 18 y 20 de la figura 9, respectivamente), produjeron halos de 17 mm. y Enterogermina® (probiótico N° 23 de la figura 9), mostró un halo de 16 mm.

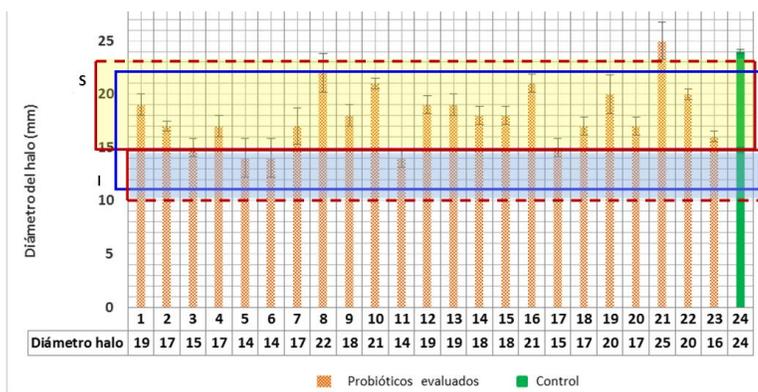


Figura 9. Efecto de probióticos sobre *Salmonella paratyphi A*

LEYENDA: 1. Leche en Tarro Gain Plus Advance 2. Leche en Tarro Nan 3 Junior 3. GLUTAPAK® reuteri 4. Bacilor 5. Leche en Tarro Nan Pro 2 6. Vacuna Gel Nb Probiótica 7. Yogurt Gloria Acti-Bio 8. Yogurt Yoleit 9. Yogurt Pura Vida Nutribio 10. Yogurt Laive Sbelt 11. Yogurt Hoja Verde 12. Yogurt Gloria Prodefensis 13. El Yogurt De Alonso 14. Yogurt Metro Bebible 15. Yogurt Wong Bebible 16. Yogurt Bio Frutado La Molina – Cultivos Probióticos 17. Yogurt Bebible Vigor Probiótico 18. Yogurt Natural Semi-Descremado Light Bircher-Benner 19. Yogurt Santa Natura 20. Biolactol 21. Lactéol® Fort 22. Lactibiane® 23. Enterogermina® 24. Control.

S: espectro convencional de sensibilidad a los antibióticos I: espectro convencional de sensibilidad intermedia a los antibióticos R: espectro de resistencia a los antibióticos convencionales.

Resumiendo el efecto sobre *Salmonella paratyphi A*, los probióticos evaluados en una alta proporción (20 = 86,9%), produjeron efectos bactericidas o bacteriostáticos significativos, salvo 3 de ellos (13,1%), cuyos efectos fueron más bien débilmente bacteriostáticos con tendencia a recibir una respuesta de resistencia por parte de la bacteria sometida al efecto antimicrobiano.

En la Figura 10 se presentó los efectos inhibitorios sobre el crecimiento de *Salmonella paratyphi* B (igualmente integrante de la familia Enterobacteriaceae), donde el control Gentamicina mostró un halo de 21 mm. de diámetro, con un efecto de sensibilidad completa, seguido del producto Lactibiane® (probiótico N° 22 de la Figura 10), que produjo el mayor efecto con un halo de 18 mm. Luego Yogurt Gloria Acti-Bio y Lactéol® fort (probióticos N° 7 y 21 de la Figura 10, respectivamente), que mostraron halos de 17 mm. Adicionalmente, los probióticos Leche en Tarro Gain Plus Advance, Bacilor, Yogurt Yoleit, Yogurt Laive Sbelt y Yogurt Bio frutado La Molina-Cultivos Probióticos (probióticos N° 1, 4, 8, 10 y 16 de la Figura 10, respectivamente), produjeron halos de 16 mm.

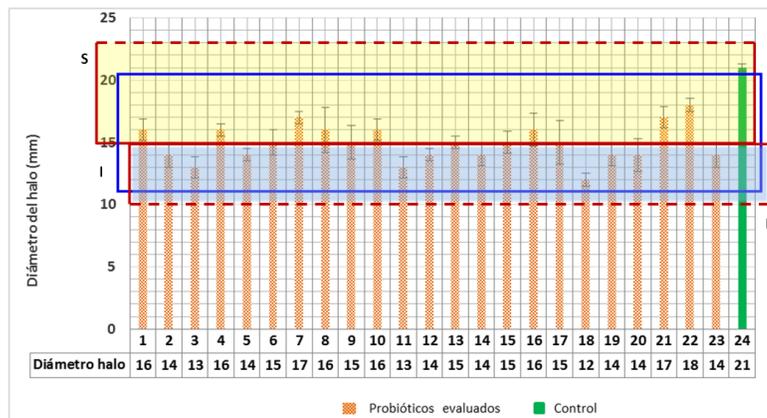


Figura 10. Efecto de probióticos sobre *Salmonella paratyphi* B

LEYENDA: 1. Leche en Tarro Gain Plus Advance 2. Leche en Tarro Nan 3 Junior 3. GLUTAPAK® reuteri 4. Bacilor 5. Leche en Tarro Nan Pro 2 6. Vacuna Gel Nb Probiótica 7. Yogurt Gloria Acti-Bio 8. Yogurt Yoleit 9. Yogurt Pura Vida Nutribio 10. Yogurt Laive Sbelt 11. Yogurt Hoja Verde 12. Yogurt Gloria Prodefensis 13. El Yogurt De Alonso 14. Yogurt Metro Bebible 15. Yogurt Wong Bebible 16. Yogurt Bio Frutado La Molina – Cultivos Probióticos 17. Yogurt Bebible Vígor Probiótico 18. Yogurt Natural Semi-Descremado Light Bircher-Benner 19. Yogurt Santa Natura 20. Biolactol 21. Lactéol® Fort 22. Lactibiane® 23. Enterogermina® 24. Control.

S: espectro convencional de sensibilidad a los antibióticos I: espectro convencional de sensibilidad intermedia a los antibióticos R: espectro de resistencia a los antibióticos convencionales.

Respecto a la respuesta de *Salmonella paratyphi* B, una comparación más general permitió afirmar que 13 de los probióticos evaluados (56,5%), produjeron efectos potencialmente bactericidas o bacteriostáticos con halos de diámetros iguales a 15 mm. o mayores a este límite inferior de sensibilidad alta por parte de las Enterobacteriaceae. Los demás probióticos (10= 43,5%) produjeron efectos débilmente bactericidas o

tendientes a coincidir con una respuesta de resistencia por parte de *Salmonella paratyphi* B.

En la Figura 11 se encontró los niveles de inhibición del crecimiento de *Salmonella typhi* por los probióticos utilizados en la presente investigación, donde se observó un efecto bactericida bastante significativo por parte de los productos Lactéol® fort (probiótico N° 21 de la Figura 11), con un halo de 27 mm., seguido por Lactibiane® (probiótico N° 22 de la Figura 11), con un halo de 26 mm., es importante resaltar que dicho efecto es mayor al causado incluso por el control Gentamicina, teniendo en cuenta que el efecto del control también es altamente bactericida sobre la *Salmonella typhi* evaluada en esta investigación.

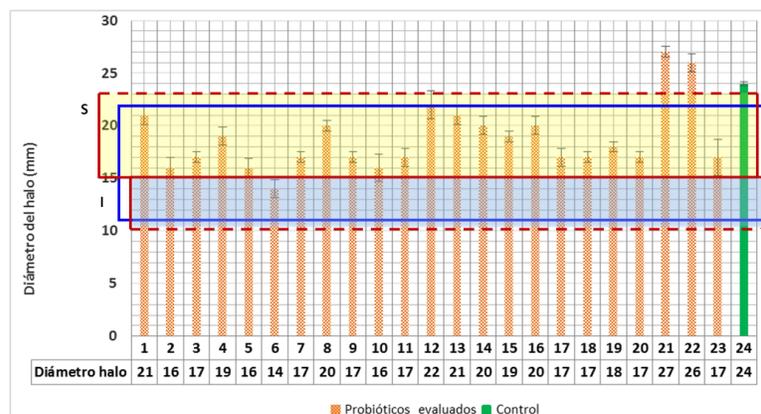


Figura 11. Efecto de probióticos sobre *Salmonella typhi*

LEYENDA: 1. Leche en Tarro Gain Plus Advance 2. Leche en Tarro Nan 3 Junior 3. GLUTAPAK® reuteri 4. Bacilor 5. Leche en Tarro Nan Pro 2 6. Vacuna Gel Nb Probiótica 7. Yogurt Gloria Acti-Bio 8. Yogurt Yoleit 9. Yogurt Pura Vida Nutribio 10. Yogurt Laive Sbelt 11. Yogurt Hoja Verde 12. Yogurt Gloria Prodefensis 13. El Yogurt De Alonso 14. Yogurt Metro Bebible 15. Yogurt Wong Bebible 16. Yogurt Bio Frutado La Molina – Cultivos Probióticos 17. Yogurt Bebible Vigor Probiótico 18. Yogurt Natural Semi-Descremado Light Bircher-Benner 19. Yogurt Santa Natura 20. Biolactol 21. Lactéol® Fort 22. Lactibiane® 23. Enterogermina® 24. Control.

S: espectro convencional de sensibilidad a los antibióticos I: espectro convencional de sensibilidad intermedia a los antibióticos R: espectro de resistencia a los antibióticos convencionales.

Entre los productos que presentaron una respuesta más cercana al control fueron Yogurt Gloria Prodefensis (probiótico N° 12 de la Figura 11), con un halo de 22 mm.; Leche en Tarro Gain Plus Advance y el Yogurt de Alonso (probióticos N° 1 y 13, de la Figura 11, respectivamente), con un halo de 21 mm.; Yogurt Yoleit, Yogurt Metro

Bebible y Yogurt Bio frutado La Molina-Cultivos Probióticos (probióticos N° 8, 14 y 16 de la Figura 11, respectivamente), con halos de 20 mm. como los más relevantes.

Un análisis más global sobre los efectos mencionados en el párrafo anterior (Figura 11), permitió afirmar que la casi totalidad de los probióticos evaluados (22=95,6%), produjeron efectos entre bactericidas y bacteriostáticos altos, sobre todo dos de ellos (8,7%), produjeron efectos claramente muy bactericidas, lo que condujo a afirmar que la *Salmonella typhi* evaluada fue muy sensible al efecto de los probióticos probados, incluso al producto Vacuna Gel NB Probiótica, que a pesar de ubicar su efecto en el rango de las categorías entre Intermedio y Resistente, dicho efecto podría ser potencialmente bacteriostático.

Análisis estadístico a nivel de medias totales y porcentajes globales

Adicionalmente, a efecto de un análisis comparativo a nivel de las medias totales y porcentajes globales, respecto al grado de sensibilidad de las bacterias patógenas (Tabla 6 y Figura 12), se tuvo en cuenta lo siguiente:

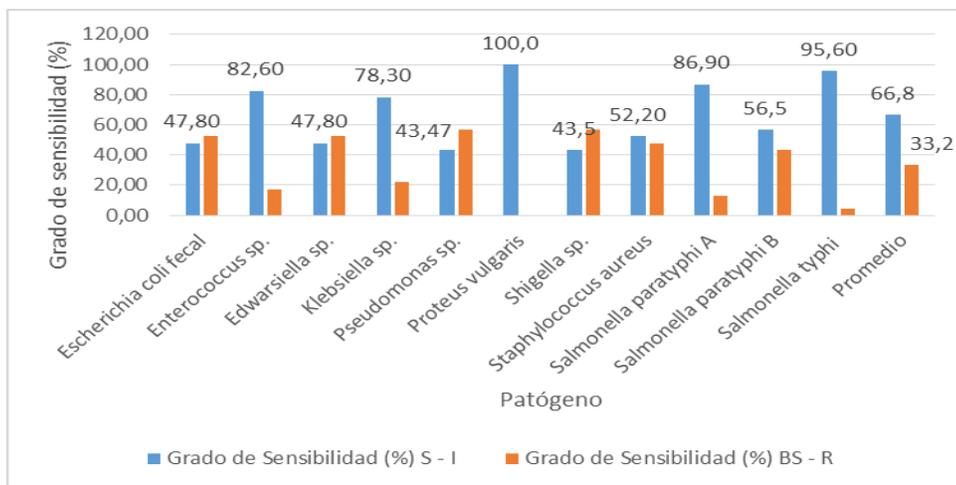
Se entiende que el grado de sensibilidad equivale a respuesta frente al efecto de los probióticos evaluados y de otro lado, teniendo en cuenta los criterios en relación a los límites de sensibilidad establecidos por el NCCLS (328) y García (330), expresados en las Tablas 2, 3, 4 y 5, puede señalarse que 5 de los patógenos sometidos al efecto de los probióticos (*Enterococcus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella paratyphi A* y *Salmonella typhi*), mostraron grados de sensibilidad promedios altos (sobre 75%), (Tabla 6), con respuestas equivalentes a los rangos de sensibilidad completa (S) y de sensibilidad intermedia (I) del espectro convencional de respuesta a los antibióticos establecidos para la terapia antibacteriana oficializada. Así mismo, la alta sensibilidad se correspondió con medias totales de los diámetros de inhibición del

crecimiento de los patógenos iguales o mayores a 16 mm., lo que también se corresponde con efectos probióticos de carácter bactericida y bacteriostático considerables.

Tabla 6. Porcentajes globales del grado de sensibilidad de los patógenos comunes frente a los 23 probióticos comerciales evaluados en la presente investigación.

Patógeno	Grado de Sensibilidad (%)		Medias Totales (halo en mm.)
	S - I	BS - R	
<i>Escherichia coli</i> fecal	47,80	52,20	14,5
<i>Enterococcus</i> sp.	82,60	17,40	18,8
<i>Edwardsiella</i> sp.	47,80	52,20	15,5
<i>Klebsiella</i> sp.	78,30	21,70	16,1
<i>Pseudomonas</i> sp.	43,47	56,53	19,6
<i>Proteus vulgaris</i>	100,0	0,00	19,7
<i>Shigella</i> sp.	43,50	56,50	15,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	52,20	47,80	15,7
<i>Salmonella paratyphi</i> A	86,90	13,10	18,2
<i>Salmonella paratyphi</i> B	56,50	43,50	15,2
<i>Salmonella typhi</i>	95,60	4,40	18,9
Promedio de sensibilidad	66,80	33,20	p < 0,05

S: sensibilidad completa. I: sensibilidad intermedia BS: baja sensibilidad R: resistente



S: sensibilidad completa. I: sensibilidad intermedia evidente. BS: baja sensibilidad. R: resistente

Figura 12. Porcentajes globales del grado de sensibilidad de los patógenos comunes frente a los 23 probióticos comerciales evaluados en la presente investigación.

Debe resaltarse, que en el caso contrario, se observó una escasa o ninguna sensibilidad (mayor reacción de resistencia), en los patógenos *Escherichia coli fecal*, *Edwardsiella sp.*, *Shigella sp.*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella paratyphi B* (Tabla 6 y Figura 12), cuyos grados de sensibilidad promedio fueron inferiores a 56,5%, contrarios a sus grados de potencial resistencia superiores a 40%, coincidiendo con promedios totales de halos de inhibición inferiores a 16 mm.

De manera complementaria a lo anteriormente expuesto y teniendo en cuenta el análisis estadístico, que se presenta a continuación, basado en la utilización del diseño en bloques completamente randomizados en relación al grado de sensibilidad de las cepas patógenas sometidas a la acción de los probióticos, resultaron ser **5** los patógenos que mostraron más sensibilidad a todos los probióticos evaluados, dichos patógenos fueron: *Klebsiella sp.*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella typhi* (bacterias gram negativas, pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae) y *Enterococcus sp.* (bacteria gram positiva) (89), cuyas medias totales de sus diámetros de inhibición (Tabla 6), fueron iguales o superiores a 16.0 mm., que fue el límite de efecto de sensibilidad (diámetro del halo de inhibición), definido para las Enterobacteriaceae y *Enterococcus sp.* en base a lo establecido por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (328) y García (330) y que fue tomado en cuenta para la elaboración de las Tablas 2, 3, 4 y 5, que han servido para la evaluación de efectos probióticos y respuestas bacterianas, de las Enterobacteriaceae y las bacterias gram positivas como *Enterococcus sp.*, incluyendo a *Staphylococcus aureus*.

De acuerdo a esto fue asumido que:

- Diámetro del halo igual o mayor a 16 mm = patógeno sensible o de otra parte, efectos probióticos bactericidas o bacteriostáticos evidentes.
- Diámetro del halo menor a 16 mm = patógeno con poca sensibilidad o resistente o de otra parte, poco o ningún efecto inhibitorio por parte del probiótico.

También debe resaltarse, respecto a los grados más altos de sensibilidad mostrados por la mayoría de las Enterobacteriaceae y *Enterococcus* sp, mencionados, que presentaron valores de sensibilidad alrededor de 80%, llegando incluso hasta 100% (Tabla 6 y Figura 12) y coincidentemente, la alta sensibilidad se reflejó también en las medias totales de los diámetros de los halos de inhibición que se produjeron en ellas, mayores a 18 mm. (con la excepción de *Klebsiella* sp. cuyo promedio de halo fue de 16,1 mm.). Este resultado es evidencia de que en este caso, los efectos de los probióticos fueron más bactericidas que bacteriostáticos.

De manera diferente, en el caso de *Pseudomonas* sp., (bacteria gram negativa que pertenece a la familia Pseudomonadaceae) (89), si bien es cierto los probióticos produjeron en ella una media total de halo de inhibición de 19,6 mm. (Tabla 6 y análisis estadístico), su porcentaje promedio de inhibición fue tan sólo de 43,47%, evidenciándose más bien una sensibilidad intermedia. Esto puede explicarse en los términos del límite de efecto de sensibilidad establecido por el NCCLS (328) y García (330), que definen como límite para *Pseudomonas* un diámetro de halo de inhibición de 19,0 mm. (Tabla 4), parámetro de comparación que se tuvo en cuenta para el análisis de sensibilidad de *Pseudomonas* sp.

Análisis estadístico de los datos obtenidos en base al Diseño de Bloques Completamente Randomizados – Grado de sensibilidad de los patógenos

Teniendo en cuenta que:

H₀: los patógenos (bloques) analizados presentan la misma respuesta.

H₁: existen diferencias en las respuestas de los patógenos (bloques).

ANOVA de dos factores: milímetros vs. bloque de producto

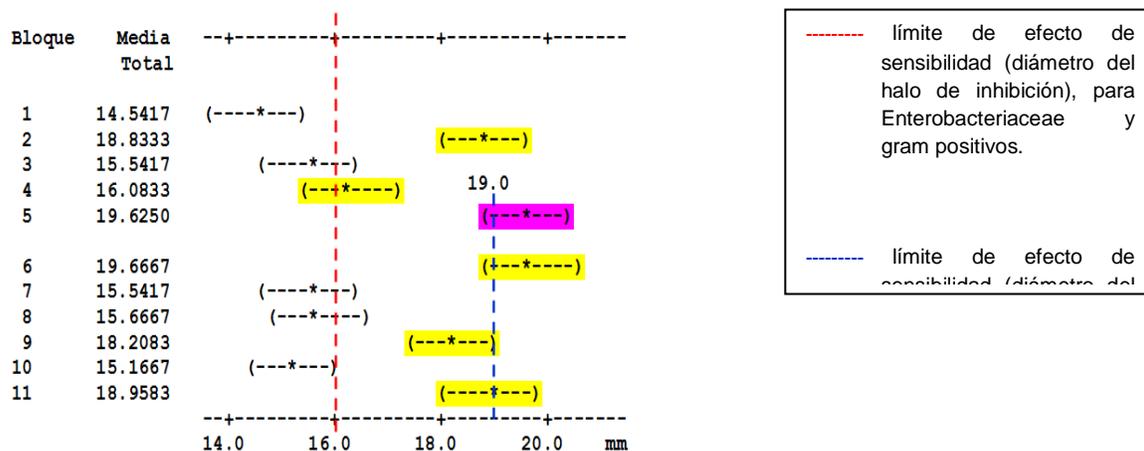
Fuente	GL	SC	MC	F	P
Bloque	10	932,90	93,2902	20,45	0,000
Producto	23	738,12	32,0922	7,03	0,000
Error	230	1049,46	4,5629		
Total	263	2720,48			

S = 2,136 R-cuad. = 61,42% R-cuad. (ajustado) = 55,89%

P-value para tratamiento menor a 0,05 (p<0,05)

ICs de 95% individuales para la media basados en Desviación Estándar Agrupada

Existen diferencias significativas entre los grupos de patógenos.



LEYENDA:

1. *Escherichia coli* 2. *Enterococcus* sp. 3. *Edwarsiella* sp. 4. *Klebsiella* sp. 5. *Pseudomonas* sp 6. *Proteus vulgaris* 7. *Shiguella* sp. 8. *Staphylococcus aureus* 9. *Salmonella paratyphi A* 10. *Salmonella paratyphi B* 11. *Salmonella typhi*

- Límite de efecto de sensibilidad para Enterobacteriaceae, *Enterococcus* sp. y *Staphylococcus aureus*:
 - Igual o mayor a 16 mm = sensible
 - Menor a 16 mm = poca sensibilidad o resistente
- Límite de efecto de sensibilidad para *Pseudomonas aeruginosa*:
 - Igual o mayor a 19 mm = sensible
 - Menor a 19 mm = poca sensibilidad o resistente

De otro lado, debe resaltarse a partir del análisis estadístico y Tabla 6, que 5 de las cepas patógenas respondieron con menor sensibilidad, dichas cepas fueron: *Escherichia coli* fecal, *Edwardsiella* sp., *Shigella* sp. y *Salmonella paratyphi* B (bacterias gram negativas de la familia Enterobacteriaceae) y *Staphylococcus aureus* (patógeno gram positivo). Los grados de sensibilidad de las cepas anteriormente mencionadas se encontraron entre los valores de 43,5 y 56,5% (Tabla 6 y Figura 12) y las medias totales de los diámetros de los halos de inhibición producidos en ellas, se ubicaron entre los 14,5 y 15,7 mm. (Tabla 6), dichas medias evidencian efectos de los probióticos bacteriostáticos débiles, con tendencia a generar una respuesta de resistencia por parte de las cepas sometidas a la acción probiótica.

De acuerdo a los resultados anteriormente expuestos, la variabilidad de comportamientos de los patógenos frente a los metabolitos probióticos antimicrobianos puede estar relacionada con dos aspectos importantes. Uno de ellos tiene que ver con la estructura celular microbiana del patógeno ya que de acuerdo a Calderón et al. (349), ha sido reportado que ciertas bacterias gram negativas serían más resistentes respecto a las bacterias gram positivas en relación a las bacteriocinas que producen los microorganismos probióticos por diferencias en la membrana externa y la misma constitución de la pared celular; aunque de acuerdo a Ouwehand et al. (338), las bacterias gram negativas resultarían ser más sensibles a otros metabolitos probióticos como ácidos orgánicos (ácido láctico y ácido acético), peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono; así como la producción de otros compuestos antimicrobianos como el diacetilo, el ácido piroglutámico, entre otros. También lo reportado por Naidu (339). explicaría el grado de sensibilidad de las cepas patógenas de la presente investigación indicando que ha sido comprobado que el diacetaldehido es más efectivo contra bacterias gram negativas, levaduras y hongos que contra

bacterias gram positivas (339) asimismo, reforzando los resultados, Lee et al. (183), hallaron que los ácidos orgánicos y posiblemente los biosurfactantes, que producen los probióticos inhiben el crecimiento de una amplia gama de bacterias patógenas gram positivas o negativas.

En este sentido se hace necesario la realización de estudios de verificación de los efectos mencionados pero de manera individual a fin de profundizar las causas de la sensibilidad o la resistencia de ciertos patógenos frente a los metabolitos probióticos contenidos en los productos que se expenden comercialmente.

Tabla 7. Medias totales de los halos de inhibición en mm. de los probióticos evaluados.

Probiótico	Media Total (mm)	Probiótico	Media Total (mm)
1	17.5	13	16.3
2	15.3	14	17.5
3	16	15	17.9
4	17.2	16	18.3
5	14.5	17	15.8
6	15.8	18	16.2
7	17.8	19	18.2
8	18.2	20	16.6
9	16.5	21	21.1
10	17.3	22	19.5
11	14.7	23	14.6
12	16.5		p<0.05

LEYENDA: 1. Leche en Tarro Gain Plus Advance 2. Leche en Tarro Nan 3 Junior 3. GLUTAPAK® reuteri 4. Bacilor 5. Leche en Tarro Nan Pro 2 6. Vacuna Gel Nb Probiótica 7. Yogurt Gloria Acti-Bio 8. Yogurt Yoleit 9. Yogurt Pura Vida Nutribio 10. Yogurt Laive Sbelt 11. Yogurt Hoja Verde 12. Yogurt Gloria Prodefensis 13. El Yogurt De Alonso 14. Yogurt Metro Bebible 15. Yogurt Wong Bebible 16. Yogurt Bio Frutado La Molina – Cultivos Probióticos 17. Yogurt Bebible Vigor Probiótico 18. Yogurt Natural Semi-Descremado Light Bircher-Benner 19. Yogurt Santa Natura 20. Biolactol 21. Lactéol® Fort 22. Lactibiane® 23. Enterogermina

En el otro sentido, en relación al efecto de los probióticos, puede establecerse a partir del análisis estadístico, además de lo mostrado en la Tabla 7 y Figura 13 y teniendo en cuenta el límite de efecto de sensibilidad (16,0 mm. de diámetro de halo de inihibición), establecido para las Enterobacteriaceae y los patógenos gram positivos (NCCLS y García) (328;330), probados en la presente investigación, fueron

17 probióticos: Leche en tarro Gain Plus Advance, Glutapak® Reuteri, Bacilor, Yogurt Gloria Acti-Bio, Yogurt Yoleit, Yogurt Pura Vida Nutribio, Yogurt Laive Sbelt, Yogurt Gloria Prodefensis, El Yogurt de Alonso, Yogurt Metro Bebible, Yogurt Wong Bebible, Yogurt Bio frutado La Molina-Cultivos Probióticos, Yogurt Natural Semi-Descremado Light Bircher-Benner, Yogurt Santa Natura, Biolactol, Lactéol®fort y Lactibiane® (probióticos N° 1, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21 y 22, de la Tabla 7), los que produjeron un efecto inhibitor ya sea bactericida o bacteriostático, con los niveles más altos de inhibición del crecimiento de las bacterias patógenas comunes.

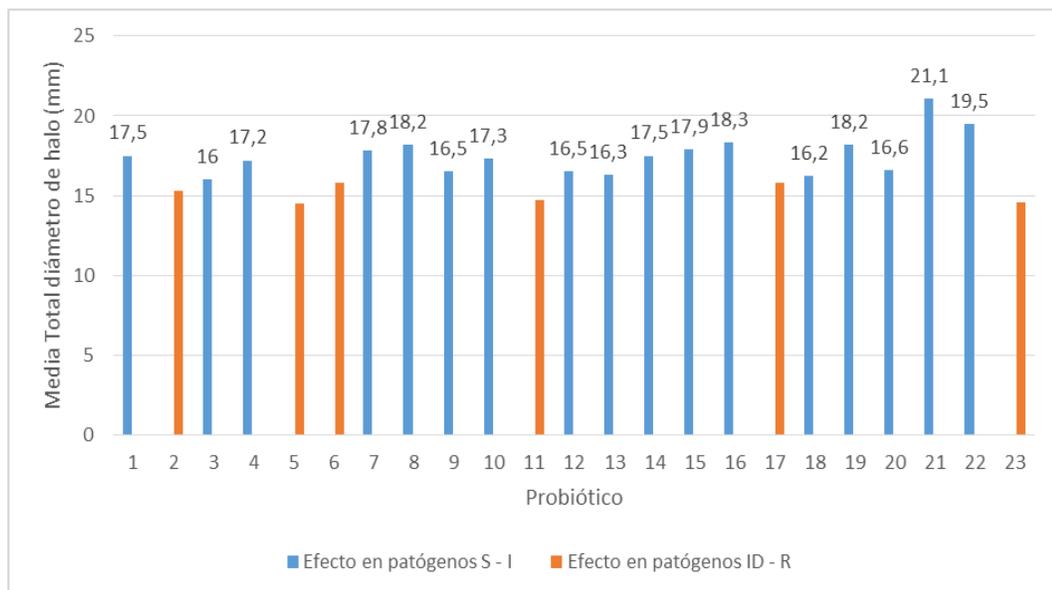


Figura 13. Medias totales de los halos de inhibición en mm. de los probióticos evaluados ($p < 0.05$)

LEYENDA: 1. Leche en Tarro Gain Plus Advance 2. Leche en Tarro Nan 3 Junior 3. GLUTAPAK® reuteri 4. Bacilor 5. Leche en Tarro Nan Pro 2 6. Vacuna Gel Nb Probiótica 7. Yogurt Gloria Acti-Bio 8. Yogurt Yoleit 9. Yogurt Pura Vida Nutribio 10. Yogurt Laive Sbelt 11. Yogurt Hoja Verde 12. Yogurt Gloria Prodefensis 13. El Yogurt De Alonso 14. Yogurt Metro Bebible 15. Yogurt Wong Bebible 16. Yogurt Bio Frutado La Molina – Cultivos Probióticos 17. Yogurt Bebible Vigor Probiótico 18. Yogurt Natural Semi-Descremado Light Bircher-Benner 19. Yogurt Santa Natura 20. Biolactol 21. Lactéol® Fort 22. Lactibiane® 23. Enterogermina®

Es importante mencionar que en el Perú el consumo de productos lácteos con probióticos va en incremento pero no se tiene una regulación establecida para el

rotulado (352). Por lo cual en la presente investigación se tuvo esta limitación. De allí que dos de los yogurts que tuvieron uno de los mayores promedios al límite de reportaron en su etiqueta que contenían 4 cepas probióticas y cultivos probióticos respectivamente, mas no indicaban la información del tipo de cepas o el número de ellas

Sin embargo el efecto inhibitor en los probióticos Yogurt Yoleit y Yogurt Laive Sbelt y Yogurt Natural Semi-Descremado Light Bircher-Benner, se explicaría en parte por su contenido de *Lactobacillus delbrueckii* subsp.*bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* (probióticos N° 8, 10,18 de la Tabla 7) que de acuerdo a la investigación de Piard et al. (341) estas cepas bacterianas al producir acetaldehído y no metabolizarlo inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* y *Escherichia coli* en productos lácteos.

Los otros 6 probióticos: Leche en Tarro Nan 3 Junior, Leche en Tarro Nan Pro 2, Vacuna Gel NB Probiótica, Yogurt Hoja Verde, Yogurt Bebible Vigor Probiótico y Enterogermina®(N° 2, 5, 6, 11, 17 y 23, de la Tabla 7), mostraron efectos bacteriostáticos débiles, potencialmente tendientes a inducir una respuesta de resistencia por parte de los patógenos analizados.

Análisis estadístico de los datos obtenidos en base al Diseño de Bloques Completamente Randomizados – Efecto de los probióticos

Teniendo en cuenta que:

H₀ los productos probióticos en análisis y el control presentan la misma respuesta.

H₁ existe diferencia entre en la respuesta de los productos probióticos, incluyendo el control.

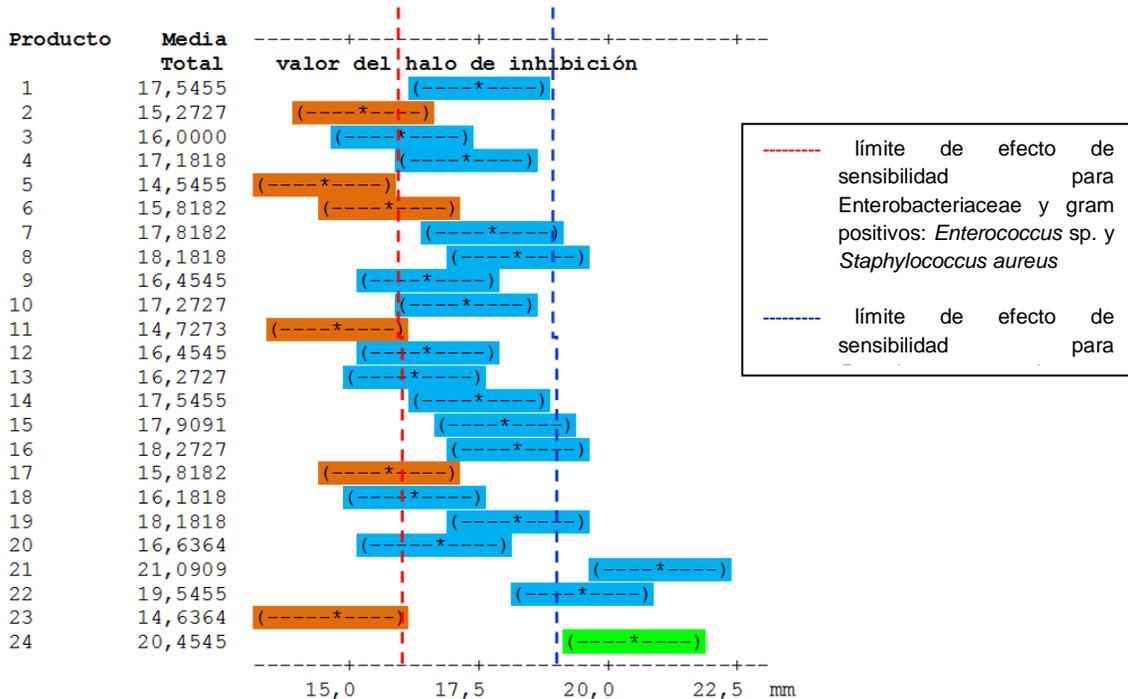
ANOVA de dos factores: milímetros vs. bloque, producto

Fuente	GL	SC	MC	F	P
bloque	10	932.90	93.2902	20.45	0.000
producto	23	738.12	32.0922	7.03	0.000
Error	230	1049.46	4.5629		
Total	263	2720.48			

S = 2.136 R-cuad. = 61.42% R-cuad. (ajustado) = 55.89%

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada

Existen diferencias significativas entre los productos (existe diferencias en la respuesta de los productos probióticos).



P-value para tratamiento menor a 0.05 ($p < 0.05$)

LEYENDA: 1. Leche en Tarro Gain Plus Advance 2. Leche en Tarro Nan 3 Junior 3. GLUTAPAK® reuteri 4. Bacilor 5. Leche en Tarro Nan Pro 2 6. Vacuna Gel Nb Probiótica 7. Yogurt Gloria Acti-Bio 8. Yogurt Yoleit 9. Yogurt Pura Vida Nutribio 10. Yogurt Laive Sbelt 11. Yogurt Hoja Verde 12. Yogurt Gloria Prodefensis 13. El Yogurt De Alonso 14. Yogurt Metro Bebible 15. Yogurt Wong Bebible 16. Yogurt Bio Frutado La Molina – Cultivos Probióticos 17. Yogurt Bebible Vigor Probiótico 18. Yogurt Natural Semi-Descremado Light Bircher-Benner 19. Yogurt Santa Natura 20. Biolactol 21. Lactéol® Fort 22. Lactibiane® 23. Enterogermina® 24. Control.

Los resultados están indicando que existen diferencias significativas ($p < 0,05$), entre los productos incluyendo el grupo control (número 24).

a) Límite de efecto de sensibilidad (diámetro del halo de inhibición), para Enterobacteriaceae y gram positivos, para agrupamiento:

- Igual o mayor a 16 mm = sensible
- Menor a 16 mm = poca sensibilidad o resistente

Productos con mayor promedio al límite de sensibilidad: 1,3,4,7,8,9,10,12,13,14,15,16,18,19, 20,21 y 22.

Productos con menor promedio al límite de sensibilidad: 2, 5, 6, 11, 17 y 23

b) Límite de efecto de sensibilidad (diámetro del halo de inhibición), para *Pseudomonas*, por agrupamiento:

- Igual o mayor a 19 mm = sensible
- Menor a 19 mm = poca sensibilidad o resistente

Productos con mayor promedio al límite de sensibilidad: 21 y 22.

Finalmente, la comprobación de los efectos de los probióticos que se expenden en nuestro país sobre las bacterias patógenas más comunes, realizada a través de la presente investigación, permitió afirmar que dichos productos están cumpliendo, en mayoría, con los requisitos respecto a su potencial inhibidor del crecimiento de bacterias patógenas, efecto que fue verificado, en condiciones de laboratorio y que es relevante señalar requiere de estudios adicionales in vivo a fin de determinar el potencial de efectividad en condiciones de uso para tratamientos terapéuticos preventivos o curativos, dado que hasta la fecha no se han realizado estudios de esta naturaleza en nuestro país destinados a asegurar un consumo confiable de los productos probióticos en general.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

1. Se verificó la viabilidad de los microorganismos probióticos mediante la recuperación de los mismos en medios de cultivo. Asimismo se aseguró la producción de los principios antibacterianos comprobándose esto al aplicar el método de Kirby Baier.
2. Se comprobó que los niveles de inhibición in vitro del crecimiento de patógenos bacterianos comunes, de los probióticos que se comercializan en nuestro país, son comparables con los efectos establecidos en los parámetros convencionales sobre la actividad antibacteriana de los antibióticos recomendados oficialmente para el tratamiento de infecciones causadas por dichos patógenos.
3. Los efectos promedio de sensibilidad que produjeron, in vitro, los probióticos evaluados en el presente estudio, en su mayoría (66,8%), se encontraron dentro del rango de las categorías de respuestas bacterianas de sensibilidad completa o de sensibilidad intermedia y en una menor proporción (33,2%), en el rango de sensibilidad intermedia baja o de completa resistencia.
4. Existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los efectos de los productos. Así, 17 probióticos (73,1%) (Leche en tarro Gain Plus Advance, Glutapak[®] Reuteri, Bacilor, Yogurt Gloria Acti-Bio, Yogurt Yoleit, Yogurt Pura Vida Cultivos

Nutribio, Yogurt Laive Sbelt, Yogurt Gloria Prodefensis, El Yogurt de Alonso, Yogurt Metro Bebible, Yogurt Wong Bebible, Yogurt Bio frutado La Molina-Cultivos Probióticos, Yogurt Natural Semi-Descremado Light Bircher-Benner, Yogurt Santa Natura, Biolactol, Lactéol®fort y Lactibiane®), produjeron los niveles más altos de inhibición del crecimiento de las bacterias patógenas comunes, de este grupo 2 probióticos (Lactéol® fort y Lactibiane®), originaron los mayores efectos de inhibición.

5. Los grados promedio de sensibilidad de las bacterias expuestas a la actividad de los probióticos, de manera individual, mostraron una variabilidad importante (diferencias significativas $p < 0,05$), de ello 5 patógenos (*Klebsiella* sp., *Proteus vulgaris*, *Salmonella paratyphi* A, *Salmonella typhi* y *Enterococcus* sp.), mostraron mayor sensibilidad, la misma que pudo ser por diversos factores propios de la naturaleza de cada bacteria o de cada producto probiótico.

5.2. Recomendaciones

1. Realizar estudios complementarios sobre la actividad, *in vitro*, de manera individual, de los probióticos que se comercializan en nuestro país, utilizando ensayos a nivel genético o molecular para esclarecer el origen de los efectos bactericida o bacteriostático, así como los de resistencia a los probióticos.
2. Los estudios *in vitro* deben ser complementados con estudios *in vivo*, que permitan determinar la eficacia real del efecto de los probióticos que se comercializan en nuestro país, respecto a las infecciones que producen los patógenos comunes.
3. El uso de nuevos probióticos debe estar condicionado a estudios como el presente a fin de verificar sus potenciales efectos, con la finalidad de garantizar el beneficio implícito de tales productos.

LISTA DE REFERENCIAS

- (1) Gagniere J, Raisch J, Veziat J, Bamich N, Bonnet R, Buc E, Bringer MA, Pezet D, Bonnet M. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2016; 22(2): 501-518.
- (2) Valero Y, Colina J, Herrera H. La microbiota intestinal y su rol en la diabetes. *An Venez Nutr* 2015; 28(2): 132-144.
- (3) Thakur N, Rokana N, Panwar H. Probiotics: Selection criteria, safety and role in health and disease. 2016; 3 (1): 259-270.
- (4) Balamurugan R, Chandragunasekaran AS, Chellappan G, et al. Probiotic potential of lactic acid bacteria present in home made curd in southern India. *Indian J Med Res.* 2014; 140: 345-355.
- (5) Abbas MM. and Mahasneh AM. Functional Characteristics of *Lactobacillus* Strains Isolated from Camel's Milk. *British Journal of Medicine & Medical Research* 2015; 7(1): 25-39.
- (6) Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota *World J Gastroenterol*, 2015; 21(29): 8787-8803.
- (7) Rashmi BS, Gayathri D. Partial purification, characterization of *Lactobacillus* sp G5 lipase and their probiotic potential. *International Food Research Journal* 2014; 121 (5):1737- 43.
- (8) Jitendra K, Amit P. An Overview of Prospective Study on Functional Food. *International Journal of Recent Scientific Research* 2015; 6 (7): 5497-5500.
- (9) Conlon MA, Bird AR. The Impact of Diet and Lifestyle on Gut Microbiota and Human Health. *Nutrients*. 2015; 7: 17-44.
- (10) Tufarelli V, Laudadio V. An Overview on the Functional Food Concept: Perspectives and Applied Researches in Probiotics, Prebiotics and Synbiotics. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences.* 2016; 4(3S): 273-278.
- (11) Bron PA, Kleerebezem M, Brummer R-J, Cani PD, Mercenier A, MacDonald TT, Garcia-Ródenas CL, Wells JM. Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function?. *British Journal of Nutrition*. 2017; 117 (1): 93-107.
- (12) Zhang YJ, Li S, Gan RY, Zhou T, Xu D, Li HB. Impacts of Gut Bacteria on Human Health and Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16, 7493-19.

- (13) Mishra A, Sharma KP, Isolation and characterization of probiotic microorganism from fermented dairy products GEF Bulletin of Biosciences. 2014; 5 (1):10-14.
- (14) Shokryazdan P, Siew Ch, Kalavathy R, Juan Boo JL, et al. Research Article: Probiotic Potential of Lactobacillus Strains with Antimicrobial Activity against Some Human Pathogenic Strains. Hindawi Publishing Corporation Bio Med Research International 2014; 1-16.
- (15) De Almada CN, Nunes de Almada C, Martinez RCR, Sant'Ana A de S. Characterization of the intestinal microbiota and its interaction with probiotics and health impacts. Appl Microbiol Biotechnol. 2015; 99(10): 4175-99.
- (16) Nagao-Kitamoto H, Kitamoto S, Kuffa P, Kamada N. Pathogenic role of the gut microbiota in gastrointestinal diseases. Intest Res. 2016; 14(2):127-38.
- (17) Gómez-Cortés E, Pérez-Cabeza R, Martínez-Hernández JE, Guerrero-Celis N, Mondragón-Terán P, Alcaráz-Estrada SL, López-Hernández LB, Suárez-Cuenca JA. Permeabilidad intestinal y eje intestino-hígado. Rev Esp Méd Quir 2015; 20: 83-89.
- (18) Biedermann L, Rogler G. The intestinal microbiota: its role in health and disease. Eur J Pediatr 2015; 174 (2): 151-67.
- (19) Moraes-Filho JP, Quigley EMM. The intestinal microbiota and the role of probiotics in irritable bowel syndrome: a review. Arq Gastroenterol. 2015; 52 (4):331-338.
- (20) Bäumlér JA, Sperandio V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. Nature. 2016; 535: 85-93.
- (21) Magdoub MN, Hassan ZM, Baher AM, Effat BA, Sadek ZI, et al. Original Research Article Probiotic Properties of Some Lactic Acid Bacteria Isolated from Egyptian Dairy Products. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 2015; 4(12): 758-766.
- (22) Woting A, Blaut M. The Intestinal Microbiota in Metabolic Disease. Nutrients 2016; 8(4): 202.
- (23) Boulangé CL, Neves A, Chilloux J, Nicholson JK, Dumas M. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. Genome Medicine 2016; 8:42.
- (24) Rodríguez JM. Probióticos: del laboratorio al consumidor. Nutr Hosp. 2015; 31(1):33-47.

- (25) Joshi N, Pawar A, Ekbote J, Ekbote G. Review Article: Human Gut Flora Int.J. Curr. Microbiol. App. Sci 2015; 2: 82-91.
- (26) Ahasan ASML, Agazzi A, Invernizzi G, Bontempo V and Savoini G. The Beneficial Role of Probiotics in Monogastric Animal. Nutrition and Health. J Dairy Vet Anim Res. 2015; 2(4).
- (27) Leung K, Thuret S. Gut Microbiota: A Modulator of Brain Plasticity and Cognitive Function in Ageing. Healthcare 2015; 3: 898-916.
- (28) Gowri RS, Meenambigai P, Prabhavathi P, Rajeswari P, Yesudoss LA. Probiotics and its Effects on Human Health-A Review Int.J. Curr.Microbiol. App.Sci 2016; 5(4): 384-392
- (29) Suarez JS, Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos. Nutr Hosp. 2015; 31(1):3-9.
- (30) Kataoka k. The intestinal microbiota and its role in human health and Disease. J. Med. Invest. 2016; 63: 27-37.
- (31) Amenu D. Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria from Human Milk. J Med Microb Diagn 2014; S3 (5).
- (32) Distrutti E, Monaldi L, Ricci P, Fiorucci S. Gut microbiota role in irritable bowel syndrome: New therapeutic strategies World J Gastroenterol. 2016; 22(7): 2219-41.
- (33) Oriach CS, Robertson RC, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG. Food for thought: The role of nutrition in the microbiota-gut brain axis. Clinical Nutrition Experimental. 2016;6: 25-38.
- (34) Mika A, Day HE, Martinez A, Rumian NL, Greenwood BN, Chichlowski M, Berg BM, Fleshner M. Early life diets with prebiotics and bioactive milk fractions attenuate the impact of stress on learned helplessness behaviours and alter gene expression within neural circuits important for stress resistance. Eur J Neurosci.2017; 45(3):342-357.
- (35) Villanueva-Millán MJ, Pérez MP, Oteo RJ. Gut microbiota: a key player in health and disease. A review focused on obesity. J Physiol Biochem.2015; 71 (3):509-25.
- (36) Mu C, Yang Y, Zhu W. Gut Microbiota: The Brain Peacekeeper. Front. Microbiol. 2016; 7 (345): 1-11.
- (37) Alarcón CT, D'Auria G, Delgado PS, Del Campo MR, Ferrer MM. Microbiota. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2016.

- (38) Burokas A, Arboleya S, D.Moloney RD, Peterson VL, Murphy K, Clarke G, Stanton K, Dinan TG, Cryan JF. Targeting the Microbiota-Gut-Brain Axis: Prebiotics Have Anxiolytic and Antidepressant-like Effects and Reverse the Impact of Chronic Stress in Mice *Biological Psychiatry* 2017; (82);7 472-487.
- (39) De Araújo N, Gutiérrez LA, Ruiz OS, Montoya OI, técnicas para la microencapsulación de probióticos y el impacto en su funcionalidad: Una Revisión. *Revista Alimentos Hoy* - 112. 2015; 23(36).
- (40) Dimidi E, Christodoulides S, Scott SM, Whelan K. Mechanisms of Action of Probiotics and the Gastrointestinal Microbiota on Gut Motility and Constipation. *Adv Nutr.* 2017;8(3):484-494.
- (41) Del Coco VF. Los microorganismos desde una perspectiva de los beneficios para la salud *Microorganisms conferring beneficial health effects. Rev Argent Microbiol.* 2015; 47(3):171-173.
- (42) Rodríguez JM, Murphy K, Catherine Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N, Avershina E, Rudi k, et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial Ecology in Health & Disease* 2015; 26.
- (43) Medina M, Izquierdo E, Ennahar S, Sanz Y. Differential immunomodulatory properties of *Bifidobacterium logum* strains: relevance to probiotic selection and clinical applications. *Clinical and Experimental Immunology.* 2007; 150 (3): 531–538.
- (44) Sánchez B, Delgado S, Blanco-Míguez A, Lourenco A, Gueimonde M, Margolles A. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease *Mol. Nutr. Food Res.* 2017; 61 (1).
- (45) Pérez C. Probióticos en la diarrea aguda y asociada al uso de antibióticos en pediatría. *Nutr Hosp.* 2015; 31(1):64-67.
- (46) Delgado AM. Gut Microbiota – Our Microbial Self. *BAOJ Microbio* 2015; 1(1):006.
- (47) Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol.* 2016; 14(1): 20–32.
- (48) Hansen JJ, Sartor RB. Therapeutic Manipulation of the Microbiome in IBD: Current Results and Future Approaches. *Curr Treat Options Gastroenterol.* 2015; 13(1): 105–120.
- (49) Tamang JP, Shin D-H, Jung S-J, Chae S-W. Functional Properties of Microorganisms in Fermented Foods. *Front. Microbiol.* 2016; 7:578.

- (50) Vandenas Y, Huys G, Daubec G. Probiotics: an update. *Jornal de Pediatría. Rio J.* 2015; 91(1):6-21.
- (51) Vizcaíno R, Macias-Tomei C, Márquez JS, Morales A, Torres N. Usos clínicos de los probióticos. *Arch Venez Puer Ped.* 2016; 79 (1). 29-40.
- (52) Rodríguez-Guerrero V, Guerrero-Beltrán JA. Probióticos: resistencia gastrointestinal y microencapsulación. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos.* 2010; 4(2): 48-57.
- (53) Ahmed Z, Haque M, Sayeed N, Uddin ME, Akter T. Reviews On Probiotics – It’s Uses And Applications. *World Journal of Pharmaceutical Research* 2016; 5(5) 24-34.
- (54) Walsh CM, Guinane CM, O’Toole PW, Cotter PD. Beneficial modulation of the gut microbiota. *Federation of European Biochemical Societies.* 2014; 588: 4120–4130.
- (55) Di Cerbo A, Palmieri B. The market of probiotics. *Pak J Pharm Sci* 2015; 28(6): 2199-2206.
- (56) Onyenweaku F, Obeagu EI, Ifediora AC, Nwandikor UU. Research Article Health Benefits of Probiotics. *International Journal of Innovative and Applied Research* 2016; 4(3): 21- 30.
- (57) Fredua-Agyeman M, Parab S, Gaisford S. Evaluation of Commercial Probiotic Products. *Br J Pharm.* 2016; 1 (1): 84-89.
- (58) Maartens MM, Chantel W. Swart CW, Pohl CH and Kock LJ. Antimicrobials, chemotherapeutics or antibiotics? *Scientific Research and Essays* 2011; 6(19): 3927-29.
- (59) Hirsch J. An Anniversary for Cancer Chemotherapy. *J.Am.Med. Assoc.* 2006; 296: 1518-20.
- (60) Lax E The Mold in Dr. Florey’s Coat: the story of the penicillin miracle. Henry Holt and Company. 2004; 1-295.
- (61) Rolinson GN. 6-APA and the development of the β -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemoth.* 1979; 5: 7-14.
- (62) Basualdo JA. Coto CE. Torres RA. *Microbiología Biomédica. Bacteriología, Micología, Virología, Parasitología, Inmunología.* Bs.As. Argentina. Editorial Atlante; 1996.
- (63) Prescott JF. Antimicrobial drug resistance and its epidemiology. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine Third Ed.* Edited by Prescott JF, Baggot JD, Walker RD. Iowa State Press, Ames, Iowa. 2000; 3.

- (64) Guardabassi L, Courvalin P. Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacteria resistance in Antimicrobial Resistance in bacteria of animal origin ed. Frank Aarestrup, ASM Press, Washington, DC. 2006; 1: 1-18.
- (65) Bbosa GS, Mwebaza N, Odda J, Kyegombe DV, Ntale M. Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. Health.2014; .6 (5):410-425.
- (66) Mims C, Playfair J, Roitt I, Wakelin D, Williams R. Microbiología Médica. Harcourt Brace. Madrid. España.1999.
- (67) AVMA. 2015. “Antimicrobial use and antimicrobial resistance FAQ” Accessed Oct. 27, 2015. <https://www.avma.org/KB/Resources/FAQs/Pages/Antimicrobial-Use-and-Antimicrobial-Resistance-FAQs.aspx>.
- (68) Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Brock Biology of Microorganisms. 12th ed. Pearson Education International. New York. 2009.
- (69) Smith Ra, M’ikanatha M, Read AF Antibiotic Resistance: A Primer and Call to Action. Health Communication 2014; 1–6.
- (70) Sánchez LS, Sáenz EA, Pancorbo JM, Lanchipa PY, Zegarra RD. Antibióticos Sistémicos En Dermatología. Primera parte: Betalactámicos–Carbapenems–Aminoglucósidos – Macrólidos. Dermatología Peruana. 2004; 14 (1): 7-20.
- (71) Vineetha N, Vignesh RA, Sridhar D. Preparation, Standardization of Antibiotic Discs and Study of Resistance Pattern for First-Line Antibiotics in Isolates from Clinical Samples. International Journal of Applied Research 2015; 1(11): 624-631.
- (72) Quintana A. Antibióticos. Bases microbiológicas del uso de antimicrobianos. 2010. (fecha de acceso 29 de marzo de 2016. URL disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2028.pdf>.
- (73) Angelakis E, Merhej V, Raoult D, Review Related actions of probiotics and antibiotics on gut microbiota and weight modification 2013;13 (10): 889-99.
- (74) . Johnston B, Goldenberg J, Vandvik P, Sun X, Guyatt G. Probióticos para la prevención de la diarrea asociada con antibióticos en niños (Revisión Cochrane traducida). Cochrane Database of Systematic Reviews 2011; 11.
- (75) Hod K, Ringel Y. Probiotics in functional bowel disorders. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2016; 30(1):89-97.

- (76) Qiao YQ, Cai CW, Ran ZH. Therapeutic modulation of gut microbiota in inflammatory bowel disease: More questions to be answered. 2016; 17 (12):800-810.
- (77) Bäumlér JA, Sperandio V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature*. 2016; 535: 85–93.
- (78) Murray P, Rosenthal K, Kobayashi G, Pfaller M. *Microbiología Médica*. 7ª ed. Editorial Elsevier. España S.A. Barcelona- España. 2012.
- (79) Vives EA, Medvedovsky D, Rothlin R. *Farmacología II Farmacología General de las Drogas Antibacterianas*. 2003; 1-29 (fecha de acceso 29 de marzo de 2016. URL disponible en: <https://farmacomedia.files.wordpress.com/2010/05/farmacologia-general-de-las-drogas-antibacterianas.pdf>).
- (80) Murray P, Rosenthal K, Kobayashi G, Pfaller M. *Microbiología Médica*. 4ª ed. Editorial Elsevier. España S.A. Barcelona- España. 2002.
- (81) Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiología Médica*. Ed. Elsevier-Mosby. 7º ed. Barcelona- España. 2014
- (82) Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, et al. A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. *Cell*. 2007; 130(5): 797-810.
- (83) Reeks BY, Champlin FR, Paulsen DB, Scruggs DW, Lawrence ML. Effects of sub-minimum inhibitory concentration antibiotic levels and temperature on growth kinetics and outer membrane protein expression in *Mannheimia haemolytica* and *Haemophilus somnus*. *Can J Vet Res*. 2005; 69(1): 1–10.
- (84) Cordiés JL, Machado RL, Hamilton CM. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Médica* 1998; 8(1):13-27.
- (85) Cercenado E, Saavedra-Lozano J. El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales (I). *An Pediatr Contin*. 2009; 7(4):214-7.
- (86) Goldstein F, Soussy CJ, Thabaut A. Definition of the Clinical Antibacterial Spectrum of Activity. *Clinical Microbiology and Infection*. 1996; 2 (1):40-45.
- (87) Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices, *Clin. Infect. Dis*. 2009; 49: 1749-55.
- (88) Rodloff A, Bauer T, Ewig S, Kujath P, Müller E. Susceptible, Intermediate, and Resistant - The Intensity of Antibiotic Action. *Dtsch Arztebl Int*. 2008; 105(39): 657–662.

- (89) Brooks GF, Carroll KC, Morse SA, Mietzner TA. Microbiología Médica. Jawetz, Melnick y Adelberg. 26ª ed. Mc Graw-Hill. Interamericana .México D.F. 2014.
- (90) Clinical and Laboratory Standards Institute. Métodos para Pruebas de Sensibilidad a los antimicrobianos por dilución para bacterias que crecen en condiciones aeróbicas. Estándar aprobado—8ª ed. Documento CLSI M07-A8. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
- (91) Balouiri Mounyr, Moulay Sadiki, Saad Koraichi Ibsouda. Review Paper Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis 6 (2016) 71–79.
- (92) Corrales RL, Castillo CA, Melo VA. Artículo producto de la investigación Evaluación del potencial antibacterial in vitro de *Croton lechleri* frente a aislamientos bacterianos de pacientes con úlceras cutáneas. NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. 2013; 11(19).
- (93) Brooks GF, Butel JN, Ornston NL, Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. Microbiología Médica. 8ª ed. México D.F. El Manual Moderno. S.A. 1992.
- (94) Murray P, Kobayashi G. Microbiología Médica. 2ª ed. Editorial Elsevier. España S.A. Barcelona- España. 1997.
- (95) Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiology. 3ª ed. WCB Publishers. 1996.
- (96) Tortora GJ, Funke RB, Case CL. Introducción a la Microbiología. 3ª ed. Acribia, S.A. España; 1993.
- (97) Estrada A, Gutiérrez L, Montoya O. Evaluación in vitro del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. contra *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*. Revista de la Facultad Nacional Agraria de Medellín. Medellín. Colombia. 2005; 58 (1).
- (98) Castillo I, Lodeiros C, Núñez M, Campos I. Evaluación in vitro de sustancias antibacterianas producidas por bacterias aisladas de diferentes organismos marinos. Rev. Biol. Trop. Venezuela 2001; 49(3-4): 1213-22.
- (99) Binns N. Probiotics, Prebiotics and the Gut Microbiota. International Life Sciences Institute. Brussels Belgium. Europe. 2013.
- (100) Arribas B, Rodríguez ME, Camuesco D, Zarzuelo A, Galvez J. Aplicaciones terapéuticas de los probióticos. Ars Pharm 2008; 49 (1).

- (101) De Vecchi E, and Drago L. *Lactobacillus sporogenes* or *Bacillus coagulans*: misidentification or mislabelling? *International Journal of Probiotics and Prebiotics* 2006; 1(1): 3-10.
- (102) Mayorga-Reyes L, Azaola-Espinosa A y Gutiérrez-Nava A. Revisión Bibliográfica. Probióticos y su potencial en la prevención del cáncer de colon. Laboratorio de Biotecnología, Dpto. Sistemas Biológicos, UAM-X. 2010.
- (103) Joyanes M, Marcos A. Probióticos: características nutricionales y factores implicados *Rev Esp Nutr Comunitaria* 2001; 7(1-2):28-33.
- (104) Leahy SC, Higgins DG, Fitzgerald GF, Sinderen D. Getting better with bifidobacteria. *J Appl Microbiol.* 2005; 98: 1303–15.
- (105) Wanderley MB, Toyama FA, Mota RC, Pereira F. Effectiveness of Probiotics in the Prophylaxis of Necrotizing Enterocolitis in Preterm Neonates: A Systematic Review and Meta-analysis. 2013; 89 (1). 18-24.
- (106) WGO. Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos. WGO Practice Guideline: Probiotics and prebiotics. 2011.
- (107) Zeeshan IM, Qadir MI, Hussain T, Janbaz KH, Khan YH, and Ahmad B. REVIEW Probiotics and their beneficial effects against various diseases. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 2014; 27(2): 405-415.
- (108) Salam MA. Probiotics: Concept and applications. *Bangladesh Journal of Medical Science* 2014; 3(4):373-376
- (109) Jankovic I, Sybesma W, Phothirath P, Ananta E, Mercenier A. Application of probiotic in food products - Challenges and new approaches. *Current Opinion in Biotechnology.* 2010; 21:175–181.
- (110) Naidu KS, Adam JK, Govender P. The use of probiotics and safety concerns: A review *Afr. J. Microbiol. Res.* 2012; 6(41): 6871-77.
- (111) FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in foods. London Ontario, Canada: working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. 2002; 1-11.
- (112) Granato D, Branco GF, Cruz G, Faria JF, Shah N P. Probiotic dairy products as functional foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food* 2010; 9(5), 455-70.
- (113) Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* 2004; 73: 444-50.

- (114) Singh K, Kallali B, Kumar A, Thaker V. Probiotics: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2011; S287-S290.
- (115) Behnsen J, Deriu E, Sassone-Corsi M, Raffatellu M. Probiotics: Properties, Examples, and Specific Applications. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013; 3(3).
- (116) Shahverdi E. Probiotics and Gastrointestinal Diseases. *Int J Dig Dis*. 2016; 2(1):22.
- (117) Guarner F, Malagelada JR, Review. Gut flora in health and disease. *The Lancet*. 2003; 360: 512- 519.
- (118) Farías NM, Kolbach M. Probióticos y prebióticos: ¿beneficio real en dermatología? 2011; 26 (5): 227-30.
- (119) Martirosyan DM, Singh J. Functional Foods in Health and Disease 2015; 5(6):209-223.
- (120) Cencic A, Chingwaru W. The Role of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements in Intestinal Health. *Nutrients*. 2010; 2(6): 611–625.
- (121) Pandey KR, Naik SR, Vakil BV. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *J Food Sci Technol*. 2015; 52: 7577- 87.
- (122) Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Report on Functional Foods, Food Quality and Standards Service (AGNS), 2007. Available online: http://www.fao.org/ag/agn/ agns/files/Functional_Foods_Report_Nov2007.pdf (accessed on 25 February 2015).
- (123) Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2014; 11:506-14.
- (124) De las Cagigas AR, Blanco JA. Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. *Revista Cubana Aliment Nutr*. 2002; 16(1):63-8.
- (125) Rodríguez YA, Rojas AF, Rodríguez-Barona S. Encapsulación de probióticos para aplicaciones alimenticias. *Revista Biosalud* 2016; 15(2): 106-115.
- (126) Rodríguez-Barona S, Giraldo GI, Zuluaga YP. Evaluación de la Incorporación de Fibra Prebiótica sobre la Viabilidad de *Lactobacillus casei* Impregnado en Matrices de Mora (*Rubus glaucus*) *Información Tecnológica* 2015; 26(5): 25-34.

- (127) Tripathi MK, Giri SK. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*. 2014; 9:225-241.
- (128) Blajman JE, Zbrun MV, Astesana DM, Berisvil AP, et al. Probióticos en pollos parrilleros: una estrategia para los modelos productivos intensivos. *Rev Argent Microbiol*. 2015; 47(4):360-367.
- (129) Schrezenmeir J, De Vress M. Probiotics, prebiotics and symbiotic-approaching a definition. *Am J Clin Nutr*. 2001; 73: 361-364.
- (130) Papadimitriou K, Zoumpoulou G, Foligné B, Alexandraki V, Kazou et al. Discovering probiotic microorganisms: in vitro, in vivo, genetic and omics approaches. *Front Microbiol*. 2015; 6:1- 27.
- (131) Marín AN, Saavedra TJ, Zúñiga CL, Salguero C. Los Probióticos: Microorganismos vivos que previenen enfermedades en adultos y niños. *Medicina Bogotá*. 2016; 38 (3): 247-263.
- (132) Tkhruni FN, Karapetyan K J, Danova ST, Dimov SG, Karimpour F. Probiotic properties of endemic strains of lactic acid bacteria. *Journal Bioscience Biotechnology* 2013; 2 (2):109-115.
- (133) García-Morales E, Angulo-Castellanos E, Carrillo-Ruvalcaba SA, López-Varela MG, et al. Eficacia y seguridad de los probióticos en el recién nacido pretérmino. *Revista Médica MD*. 2014 5(4):238-247.
- (134) Singh V. Bunger R. Probiotics and Gut Health. *JIMSA*. 2014; 27 (1): 41-43.
- (135) Bahri F, Lejeune A, Dubois-Dauphin R, Elmejdoub T, et al. Research Paper: Characterization of Lactobacillus strains isolated from Algerian children faeces for their probiotic properties. *African Journal of Microbiology Research* 2014; 8(3): 297-303.
- (136) Parvez, S., Malik, K. A., Kang, A., & Kim, H. Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology* 2006; 100(6): 1171-1185.
- (137) Sornplang P, Piyadeatsoontorn S. Probiotic isolates from unconventional sources: a review. *Journal of Animal Science and Technology* 2016; 58(26):1-11.
- (138) Algburi A, Volski A, Cugini C., Walsh EM, Chistyakov VA, Mazanko MS, Bren AB, Dicks LM, Chikindas ML. Safety Properties and Probiotic Potential of *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895. *Advances in Microbiology*. 2016; 6: 432-452.

- (139) Shewale RN, Sawale PD, Khedkar CD and Singh A. Selection criteria for probiotics: A review. *International Journal of Probiotics and Prebiotics* 2014; 9 (1): 1-6.
- (140) Sunkata R, Herring J, Walker LT, Verghese M. Chemopreventive Potential of Probiotics and Prebiotics *Food and Nutrition Sciences* 2014; 5: 1800-1809.
- (141) Ghoshal UC, Shukla R, Ghoshal U, Gwee K-A, Ng SC, Quigley EMM. The Gut Microbiota and Irritable Bowel Syndrome: Friend or Foe? *International Journal of Inflammation*. 2012.
- (142) Haghshenas B, Haghshenas M, Nami Y, Khosroushahi AY, Abdullah N, Barzegari A, Rosli R, Hejazi MS. Probiotic Assessment of *Lactobacillus plantarum* 15HN and *Enterococcus mundtii* 50H Isolated from Traditional Dairies *Microbiota Adv Pharm Bull*. 2016; 6(1): 37-47.
- (143) Eckmann L. Innate immunity and mucosal bacterial interactions in the intestine. *Curr Opin Gastroenterol*. 2004; 20:82-88.
- (144) Meier R, Steuerwald M, Place of Probiotics. *Curr Opin Crit Care*. 2005; 11; 318- 325.
- (145) Pérez-Luyo A. Probióticos: Una nueva alternativa en la prevención de la caries dental? *Rev Estomatol Herediana* 2008; 18(1):65-68.
- (146) Rodríguez JM, Sobrino OJ, Marcos A, Collado MC, Pérez-Martínez G, Martínez-Cuesta MC, Peláez C, Requena T. ¿Existe una relación entre la microbiota intestinal, el consumo de probióticos y la modulación del peso corporal? *Nutr Hosp* 2013; 28 (1):3-12.
- (147) Saad N, Delattre C, Urdaci M, Schmitter JM, and Bressollier P. An Overview of the Last Advances in Probiotic and Prebiotic Field. *LWT. Food Science and Technology Journal*.2013; 50: 1-16.
- (148) Tien MT, Girardin SE, REgnault B, Le BL, et al. Anti-inflammatory Effect of *Lactobacillus Casei* on *Shigella*-infected Human intestinal Epithelial Cells. *Journal of Immunology* 2006; 176: 1128-1237.
- (149) Muñoz-Quezada S, Bermudez-Brito M, Chenoll E, Genovés S, et al. Competitive inhibition of three novel bacteria isolated from faeces of breast milk-fed infants against selected enteropathogens. *British Journal of Nutrition* 2013; 109, S63–S69.
- (150) Bermudez-Brito M, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Matencio E, Romero F, Gil A. *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 and its culture supernatant modulate Salmonella-induced inflammation in a novel transwell co-culture of human intestinal-like dendritic and Caco-2 cells. *BMC Microbiol*. 2015; 15: 79.

- (151) Oliveira G, González-Molero Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica. *Endocrinol Nutr.* 2016.
- (152) Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. Probiotic Mechanisms of Action. *Ann Nutr Metab* 2012; 61:160–174.
- (153) Shiina T, Shima T, Naitou K, Nakamori H, Sano Y, Horii K, Shimakawa M, Ohno H, Shimizu Y. Actions of Probiotics on Trinitrobenzenesulfonic Acid-Induced Colitis in Rats. *BioMed Research International* 2015.
- (154) Lescheid DW. *Functional Foods in Health and Disease* 2014; 4(7):299-311.
- (155) Mardinoglu A, Shoaie S, Bergentall M, Ghaffari P, Zhang C, Larsson E, Bäckhed F, Nielsen J. The gut microbiota modulates host amino acid and glutathione metabolism in mice. *Mol Syst Biol.* 2015; 11(10): 834.
- (156) Dheer R, Santaolalla R, Davies JM, Lang JK, Phillips MC, et al. Intestinal Epithelial Toll-Like Receptor 4 Signaling Affects Epithelial Function and Colonic Microbiota and Promotes a Risk for Transmissible Colitis. 2016; 84 (3).
- (157) Bourlioux P, Koletzko B, Guarner F, Braesco V. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium “The Intelligent Intestine”, held in Paris, June 14, 2002. *Am J Clin Nutr.* 2003; 78(4): 675-683.
- (158) Sun J, Shen X, Li J et al Alteraciones y Posibles Tratamientos de la Barrera de Moco Intestinal en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal *Nutrients* 2016; 8(1):1-15.
- (159) Ohland CL, Macnaughton WK, Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 298: G807–G819.
- (160) Cani PD, Van Hul M. Novel opportunities for next-generation probiotics targeting metabolic syndrome. *Current Opinion in Biotechnology* 2015; 32:21–27.
- (161) Quigley EM, Flourie B. Probiotics and irritable bowel syndrome: a rationale for their use and an assessment of the evidence to date. *Neurogastroenterology y Motility* 2007; 19(3): 66-72.
- (162) Sanz Y, Collado MC, Dalmau J. Probióticos: Criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta Pediátrica Española.* 2006; 61:476-482.
- (163) Saxelin M, Tynkkynen S, Mattila-Sandholm T, De Vos WM. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Curr Opin Biotechnol.* 2005; 16: 204-211.

- (164) Larsson E, Tremaroli V, Lee Y, Koren O, Nookaew I. et al. Analysis of gut microbial regulation of host gene expression along the length of the gut and regulation of gut microbial ecology through 2012; 61: 1124–1131.
- (165) Salvo-Romero E, Alonso-Cotoner C, Pardo-Camacho C, Casado-Bedmar M, Vicario M. Función barrera intestinal y su implicación en enfermedades digestivas Rev Esp Enferm Dig Madrid 2015; 107 (11): 686-696.
- (166) Furrie E, Macfarlane S, Kennedy A, Cummings JH, Walsh SV, O'neil DA, Macfarlane GT: Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum* /Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. Gut 2005; 54: 242–249.
- (167) O'Hara AM, Shanahan F. Mechanisms of Action of Probiotics in Intestinal Diseases The Scientific World Journal 2007; 7: 31–46.
- (168) Faujdar SS, Mehrishi P, Bishnoi S, Sharma A. Role of Probiotics in human health and disease: An update. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci 2016; 5(3): 328-344.
- (169) Asahara T, Nomoto K, Shimizu K, Watanuki M, Tanaka R. Increased resistance of mice to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection by synbiotic administration of *Bifidobacteria* and transgalactosylated oligosaccharides. J Appl Microbiol. 2001; 91: 985-996.
- (170) Simrén M, Barbara G, Flint HJ, Spiegel BM, Spiller RC, Vanner S, Verdu EF, Whorwell PJ, Zoetendal EG. Intestinal microbiota in functional bowel disorders. Gut. 2013; 62(1):159-76.
- (171) Hummel S, Veltman K, Cichon C, Sonnenborn U, Schmidt MA. Differential targeting of the E-cadherin/catenin complex by Gram-positive probiotic lactobacilli improves epithelial barrier function. Appl Environ Microbiol 2012; 78: 1140–1147.
- (172) Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke J-D, Serino M, et al. Intestinal permeability a new target for disease prevention and therapy. BMC Gastroenterol 2014; 14(1):189.
- (173) Collado MC, Meriluoto J, Salminen S. Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. Letters in Applied Microbiology 2007; 45: 454–460.
- (174) Both E, Gyorgy E, Abrahám B, Lányi S. Beneficial effects of probiotic microorganisms. A review Acta Univ. Sapientiae, Alimentaria 2011; 4: 44–58.

- (175) Mikov MM, Stojančević MP, Bojić GM. Probiotics as a Promising Treatment for Inflammatory Bowel Disease Hospital Pharmacology. 2014; 1(1):52-60.
- (176) Leung K, Thuret S Review Gut Microbiota: A Modulator of Brain Plasticity and Cognitive Function in Ageing. Healthcare 2015; 3: 898-916.
- (177) Ouwehand AC, Salminen S, Tolkkio S, Roberts P, Ovaska J, Salminen E: Resected human colonic tissue: new model for characterizing adhesion of lactic acid bacteria. Clin Diag Lab Immunol 2002; 9: 184–186.
- (178) Van Tassell ML, Miller MJ: Lactobacillus adhesion to mucus. Nutrients 2011; 3: 613–636.
- (179) Gogineni VK, Morrow LE, Malesker MA, Probiotics: Mechanisms of Action and Clinical Applications. J Prob Health 2013; 1:101.
- (180) Hemaiswarya S, Raja R, Ravikumar R, Carvalho IS. Mechanism of action of probiotics. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2013; 56 (1):113-119.
- (181) Fernández MF, Boris S, Barbés C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. Journal of Applied Microbiology. The Society for Applied Microbiology 2003; 94, 449–455.
- (182) Parada J, Ricoy C, Bianchi A, Soccol C. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2007; 50(3): 521-542.
- (183) Lee YK, Lim CY, Teng WL, et al. Quantitative approach in the the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria. Applied and Environmental Microbiology 2000; 66:3692–97.
- (184) Bevins C, Salzman N. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. Nat Rev Microbiol. 2011; 9: 356-368.
- (185) Salzman N, Hung K, Haribhai D, Chu H, Karlsson-Sjöberg J ,Amir E, et al. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. Nat Immunol. 2010; 11(1):76- 83.
- (186) O’Shea EF, Cotter PD, Stanton C, Ross RP, Hill C: Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. Int J Food Microbiol 2012; 152: 189–205.

- (187) Oelschlaeger TA, Mechanisms of probiotic actions - A review. *Int J Med Microbiol.* 2010; 300: 57–62.
- (188) Turpin W., Humblot C., Noordina ML, Thomas M, y Guyot JP. Lactobacillaceae and cell adhesion: genomic and functional screening. *PLoS ONE* 2012; 7(5).
- (189) Hemarajata P, Versalovic J. Effects of Probiotics on gut microbiota: Mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation *Therapeutic Advances in Gastroenterology.* 2013; 6(1) 39–51.
- (190) Alkanani AK, Hara N, Lien E, Ir D, Kotter CV, Robertson CE, Wagner BD, Frank DN, Zipris D. Induction of Diabetes in the RIP-B7.1 Mouse Model Is Critically Dependent on TLR3 and MyD88 Pathways and Is Associated With Alterations in the Intestinal Microbiome. *American Diabetes Association. Diabetes* 2014; 63:619–631.
- (191) Lazado C, Lacsamana JJ. and Caipang CM. Mechanisms of probiotic actions in shrimp: Implications to tropical aquaculture. *Biotechnological Advances in Shrimp Health Management in the Philippines* 2015; 89-114.
- (192) Shida K, Nomoto K. Probiotics as efficient immunopotentiators: Translational role in cancer prevention *Indian J Med Res.* 2013; 138: 808-814.
- (193) Bergmann KR, Liu SXL, Tian R, Kushnir A, Turner JR, Li HL et al. Bifidobacteria stabilize claudins at tight junctions and prevent intestinal barrier dysfunction in mouse necrotizing enterocolitis. *The American journal of pathology.* 2013; 182 (5): 1595–606.
- (194) Gollwitzer ES, Saglani S, Trompette A, Yadava K, Sherburn R, McCoy KD, Nicod LP, Lloyd CM, Marsland BJ. Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1 *Nature Medicine* 2014;20,642–647.
- (195) Siciliano RA, y Mazzeo MF. Molecular mechanisms of probiotic action: a proteomic perspective. *Current Opinion in Microbiology* 2012; 15(3), 390-396.
- (196) Cross M. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunol Medical Microbiol.* 2002; 34: 245-253.
- (197) Wedajo B. Lactic Acid Bacteria: Benefits, Selection Criteria and Probiotic Potential in Fermented Food. *J Prob Health* 2015; 3 (2):129.
- (198) Huffnagle GB. The Microbiota and Allergies/Asthma *PLoS pathogens* 2010; 6 (5).

- (199) Trueba AF, Ritz T. Stress, asthma, and respiratory infections: pathways involving airway immunology and microbial endocrinology. *Brain, behavior, and immunity* 2013; 29: 11–27.
- (200) World Gastroenterology Organisation. *Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos* 2011.
- (201) Panisello J. Probióticos y prebióticos en edad pediátrica: de la evidencia a la práctica clínica. *Form Act Pediatr Aten Prim*. 2014; 7(4):196-207.
- (202) Guzmán E, Montes P, Monge E, Artículo de revisión Probióticos, prebióticos y simbióticos en el síndrome de intestino irritable Probiotics, prebiotics, and symbiotics in the irritable bowel syndrome. *Acta Méd. Peruana* 2012; 29(2).
- (203) Reid G. Probiotics: definition, scope and mechanisms of action *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2016; 30: 17-25.
- (204) Mortazavian AM, Mohammadi R and Sohrabvandi S. Delivery of Probiotic Microorganisms into Gastrointestinal Tract by Food Products. *New Advances in the Basic and Clinical Gastroenterology* 2012; 122-146.
- (205) Palou A, Serra F. Perspectivas europeas sobre los alimentos funcionales. *Alimentación Nutrición y Salud* 2000; 7 (3): 76-90.
- (206) Bourrie BCT, Willing BP, Cotter PD. The Microbiota and Health Promoting Characteristics of the Fermented Beverage Kefir. *Front. Microbiol* 2016; 7:647.
- (207) Manzanares W, Alonso M, Biestro A. Probióticos, Prebióticos y Simbióticos en pacientes críticos. *Rev Bras Nutr Clin* 2006; 21(2):155-62.
- (208) Caglar E, Kargul B, Tanboga I. Bacteriotherapy and probiotics' role on oral health. *Oral Dis*. 2005; 11(3):131-7.
- (209) Michalak I, Chojnacka K. Functional Fermented Food and Feed from Seaweed. *Fermented Foods, Part I: Biochemistry and Biotechnology* 2016; 246.
- (210) Floch M, Ringel YW, Walker A. *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology. Implications for Human Health, Prebiotics, Probiotics, and Dysbiosis*. 1st ed. Elsevier Inc. All rights reserved. 2017.
- (211) Sadeghi A. In vitro Assessment of Some Probiotic Properties of *Lactobacillus fermentum* Isolated from Pickled Garlic. *Journal of Food Quality and Hazards Control* 2016; 3: 67-72.

- (212) Casarotti SN, Monteiro DA, Moretti MMS, Penna ALB. Influence of the combination of probiotic cultures during fermentation and storage of fermented milk. *Food Research International* 2014; 59, 67-75.
- (213) Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan MJ, Gibson L. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 2008; 274:1-14.
- (214) Rosenfeldt V, Michaelsen KF, Jakobsen M, Larsen CN, Moller PL, et al. Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in young children hospitalized with acute diarrhea. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2002; 21:411-416.
- (215) Guler-Akin MB, Goncu B, Akin MS. Some Properties of Probiotic Yoghurt Ice Cream Supplemented with Carob Extract and Whey Powder *Advances in Microbiology*, 2016; 6: 1010-1020.
- (216) Praveen V, Praveen S. Microbiome-Gut-Brain Axis: A Pathway for Improving Brainstem Serotonin Homeostasis and Successful Autoresuscitation in SIDS-A Novel Hypothesis. *Front Pediatr.* 2017; 4: 136.
- (217) López J, Ochoa A, Santoyo G, Anaya J, Medina E, Martínez M, et al. Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. Julio-septiembre 2008, 39 (3): 49-57.
- (218) Parra RH. Yogur en la salud humana. *Revista Lasallista de Investigación*. 2012; 9 (2):162-177.
- (219) Ferrer L, Dalmau J. Alimentos funcionales: probióticos. Centro Atención Primaria de Alaquás. Valencia. Sección Nutrición. Hospital Infantil «La Fe». Valencia. *Acta Pediatr Esp* 2001; 59: 150-155.
- (220) Rutella GS, Tagliazucchi D, Solieri L. Survival and bioactivities of selected probiotic lactobacilli in yogurt fermentation and cold storage: New insights for developing a bi-functional dairy food. *Food Microbiol.* 2016; 60:54-61.
- (221) Heyman M, Ménard S. Review Probiotic microorganisms: How they affect intestinal pathophysiology. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 2002; 59: 1-15.
- (222) Yerlikaya O. Starter cultures used in probiotic dairy product preparation and popular probiotic dairy drinks. *Food Science and Technology Campinas* 2014; 34(2): 221-229.
- (223) Kandylis P, Pissaridi K, Bekatorou A, Kanellaki M, Koutinas AA. Dairy and non-dairy probiotic beverages. *Current Opinion in Food Science*. 2016; 7, 58-63.

- (224) Cáceres PR, Gotteland MR. Alimentos Probióticos en Chile: ¿Qué cepas y qué propiedades saludables? *Rev Chil Nutr* 2010; 37 (1): 97-109.
- (225) Gomes AC, Bueno AA, Machado de Souza RG, Mota JF. Gut microbiota, probiotics and diabetes. *Nutrition Journal* 2014; 13:60.
- (226) Stecher B. The Roles of Inflammation, Nutrient Availability and the Commensal Microbiota in Enteric Pathogen Infection. *Microbiol Spectr*. 2015; 3(3): 233.
- (227) Chen X, Dong M, Sun X. Mechanisms of action and applications of probiotics for the treatment of *Clostridium difficile* infection. *Formatex* 2013.
- (228) Guslandi M. Role of Probiotics in Crohn's Disease and in Pouchitis. *J Clin Gastroenterol*. 2015; 49 1:S46-9.
- (229) Gionchetti P, Calabrese C, Lauri A, Rizzello F. The therapeutic potential of antibiotics and probiotics in the treatment of pouchitis *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 2015;9: 1175-81.
- (230) Derikx LAAP, Dieleman LA, Hoentjen F. Probiotics and prebiotics in ulcerative colitis *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 2016; 30 (1): 55-71.
- (231) Lichtenstein L, Avni-Biron I, Ben-Bassat O. Probiotics and prebiotics in Crohn's disease therapies. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2016; 30(1):81-8.
- (232) Rosales-Hartshorn MU. Probiotic cultures as functional foods. *Adv Food Technol Nutr Sci Open J*. 2015; 1(6): 124-129.
- (233) Vanderhoof JA. Probiotics and intestinal inflammatory disorders in infant and children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000; 30: S34-S38.
- (234) Orel Rok, Trop Kamhi Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease *World J Gastroenterol*. 2014;20(33): 11505-524.
- (235) Quigley EM. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacol Res*. 2010; 61(3):213-8.
- (236) Scaldaferri F, Gerardi V, Lopetuso LR, Del Zompo F, Mangiola F, Boškoski I, Bruno G, et al. Gut Microbial Flora, Prebiotics, and Probiotics in IBD: Their Current Usage and Utility. *BioMed Research International* 2013; 9.
- (237) Ford AC, Quigley EM, Lacy BE, Lembo AJ, Saito YA, Schiller LR, Soffer EE, Spiegel BM, Moayyedi P. Efficacy of prebiotics, probiotics, and synbiotics in irritable bowel

syndrome and chronic idiopathic constipation: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2014; 109 (10):1547-61.

- (238) Hyland NP, Quigley EM, Brint E. Microbiota-host interactions in irritable bowel syndrome: epithelial barrier, immune regulation and brain-gut interactions. *World J Gastroenterol.* 2014; 20 (27):8859-66.
- (239) Currò D, Ianiro G, Pecere S, Bibbò S, Cammarota G. Probiotics, fibre and herbal medicinal products for functional and inflammatory bowel disorders. *Br J Pharmacol.* 2017; 174(11):1426-1449.
- (240) Millette M, Luquet F-M, Ruiz MT, Lacroix M. Characterization of probiotic properties of *Lactobacillus* strains. *Dairy Science & Technology, EDP sciences/Springer*, 2008; 88 (6):695-705.
- (241) Slattery J, MacFabe DF, Frye RE. The Significance of the Enteric Microbiome on the Development of Childhood Disease: A Review of Prebiotic and Probiotic Therapies in Disorders of Childhood. *Clin Med Insights Pediatr.* 2016; 10:91-107.
- (242) Georigia Vêras de Araujo GV, de Oliveira MH, Peixoto DM, Sarinhoa EC. Probiotics for the treatment of upper and lower respiratory-tract infections in children: systematic review based on randomized clinical trials. 2015; 91 (5): 413–427.
- (243) Shi LH, Balakrishnan K, Thiagarajah K, Ismail NIM, Yin OS. Beneficial Properties of Probiotics *Tropical Life Sciences Research* 2016; 27(2), 73–90.
- (244) Arase S, Watanabe Y, Setoyama H, Nagaoka N, Kawai M, Matsumoto S. Disturbance in the Mucosa-Associated Commensal Bacteria Is Associated with the Exacerbation of Chronic Colitis by Repeated Psychological Stress; Is That the New Target of Probiotics? *PLoS One* 2016; 11 :(8).
- (245) Lo RS, Austin AS, Freeman JG. Is There a Role for Probiotics in Liver Disease? *The Scientific World Journal* 2014; 1-7.
- (246) Emara MH, Elhawari SA, Yousef S, Radwan MI, Abdel-Aziz HR. Emerging Role of Probiotics in the Management of *Helicobacter pylori* Infection: Histopathologic Perspectives. *Helicobacter.* 2016; 21(1):3-10.
- (247) Dinan TG, Stanton C, Cryan JF. Psychobiotics: a novel class of psychotropic. *Biol Psychiatry* 2013; 74(10):720-6.
- (248) Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ. Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options. *J Physiol Pharmacol.* 2011; 62(6):591-599.

- (249) Saulnier DM, Ringel Y, Heyman MB, Foster JA, Bercik P, Shulman RJ, Versalovic J, Verdu EF, Dinan TG, Hecht G, Guarner F. The intestinal microbiome, probiotics and prebiotics in neurogastroenterology. *Gut Microbes* 2013; 4(1):17-27.
- (250) Wang H, Lee I-S, Braun C, Enck P. Effect of Probiotics on Central Nervous System Functions in Animals and Humans: A Systematic Review *Journal of Neurogastroenterology and Motility* 2016; 22(4): 589-605.
- (251) Liu X, Cao S, Zhang X. Modulation of Gut Microbiota-Brain Axis by Probiotics, Prebiotics, and Diet. *J Agric Food Chem.* 2015; 63(36):7885-95.
- (252) Escobedo G, López-Ortiz E, Torres-Castro I. Gut microbiota as a key player in triggering obesity, systemic inflammation and insulin resistance *Rev Invest Clin.* 2014; 66 (5): 450-59.
- (253) Morales P, Brignardello J, Gotteland M. La microbiota intestinal: Un nuevo actor en el desarrollo de la obesidad. *Rev Med Chile* 2010; 138: 1020-1027.
- (254) Polanco A. Microbiota y enfermedades gastrointestinales *An Pediatr Barc.* 2015; 83(6):443.e1-443.e5.
- (255) Guarner F. Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. Unidad de Investigación de Aparato Digestivo. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona. España. *Nutr Hosp.* 2007; 22(2):14-9.
- (256) Thakur AK, Shakya A, Husain GM, Emerald M, Kumar V. Review Article Gut-Microbiota and Mental Health: Current and Future Perspectives. *Journal of Pharmacology & Clinical Toxicology* 2014; 2(1):1016.
- (257) König J, Brummer RJ. Alteration of the intestinal microbiota as a cause of and a potential therapeutic option in irritable bowel syndrome. *Benef Microbes.* 2014; 5(3):247-261.
- (258) Guarner F. El colon como órgano: hábitat de la flora bacteriana Unidad de Investigación de Aparato Digestivo. Hospital Universitario Vall d'Hebron. Barcelona. *Nutr. Hosp.* 2002; XVII (2) 7-10.
- (259) Konturek PC, Haziri D, Brzozowski T, Hess T, Heyman S, Kwiecien S, Konturek SJ, Koziel J. Emerging role of fecal microbiota therapy in the treatment of gastrointestinal and extra-gastrointestinal diseases. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2015; 66 (4): 483-491.

- (260) Llorente C, Schnabl B. The Gut Microbiota and Liver Disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2015; 1(3): 275–284.
- (261) Guinane CM, Cotter PD Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ *Ther Adv Gastroenterol* 2013; 6(4) 295–308.
- (262) Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, et al. Prebiotic effects: Metabolic and health benefits. *Br. J. Nutr.*, 2010 ;(104): 1-63.
- (263) Harakeh SM, Khan I, Kumosani T, Barbour E, Almasaudi SB, Bahijri SM,Alfadul SM, Ajabnoor GMA, Azhar EI.Gut Microbiota: A Contributing Factor to Obesity. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2016; 6:95.
- (264) Schulberg J, De Cruz P. Characterisation and therapeutic manipulation of the gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Intern Med J.* 2016; 46(3):266-73.
- (265) Casén C, Vebo HC, Sekelja M, Hegge FT, Karlsson MK, Ciemniejewska E, Dzankovic S, Froyland C, et al. Deviations in human gut microbiota: a novel diagnostic test for determining dysbiosis in patients with IBS or IBD. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015; 42(1):71-83.
- (266) Jayasinghe TN, Chiavaroli V, Holland DJ, Cutfieldn WS, O’Sullivan JM. The New Era of Treatment for Obesity and Metabolic Disorders: Evidence and Expectations for Gut Microbiome Transplantation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2016; 6: 15.
- (267) Erdman SE, Poutahidis T. Gut bacteria and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1856(1): 86–90.
- (268) D’Argenio V, Salvatore F. The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clinica Chimica Acta.* 2015; 451: 97-102.
- (269) Guzmán CE, Montes TP, Monge SE. Probióticos, prebióticos y simbióticos en el síndrome de intestino irritable *Acta Med Per* 2012; 29(2).
- (270) Chermesh I, Shamir R. El papel de la microbiota en la enfermedad inflamatoria intestinal *Ann Nestlé [Esp]* 2009; 67:27–38.
- (271) Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. *Cell* 2012; 148 (16): 1258-70.
- (272) Icaza-Chávez Microbiota intestinal en salud y enfermedad. The intestinal microbiota in health and disease. *Revista de Gastroenterología de México.*2012; 77 (1): 23 – 25.

- (273) Morán-Ramos S, López-Contreras BE, Villarruel-Vázquez R y Canizales-Quinteros S. Microbiota Intestinal y Obesidad Infantil Gut Microbiota And Childhood Obesity. Universidad Nacional Autónoma de México Mensaje Bioquímico. 2016; XL: 167-184.
- (274) Ryu EH, Chang HC. In vitro study of potentially probiotic lactic acid bacteria strains isolated from kimchi. *Annals of Microbiology* 2013.
- (275) Mondot S, Lepage P. The human gut microbiome and its dysfunctions through the meta-omics prism. *Ann N Y Acad Sci.* 2016; 1372 (1):9-19.
- (276) Monda V, Villano I, Messina A, Valenzano A, Esposito T, Moscatelli F et al. Exercise Modifies the Gut Microbiota with Positive Health Effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2017: 8.
- (277) Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota. Masters of host development and Physiology. *Nature Reviews Microbiology* 2013; 11: 227–238.
- (278) Gotteland M. El papel de la microbiota intestinal en el desarrollo de la obesidad y de la diabetes de tipo-2. *Rev. chil. endocrinol. diabetes* 2013; 6 (4): 155-162.
- (279) Halmos T, Suba I. Physiological patterns of intestinal microbiota. The role of dysbacteriosis in obesity, insulin resistance, diabetes and metabolic syndrome. *Orv Hetil.* 2016; 157(1):13-22.
- (280) Graf D, Di Cagno R, Fak F, Flint HJ, Nyman M, Saarela M, Watzl B. Contribution of diet to the composition of the human gut microbiota. *Microb Ecol Health Dis.* 2015; 26:261-64.
- (281) Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes, Hirschfield GM, Hold G, Quraishi MN, Kinross J, Smidt H, Tuohy KM, Thomas LV, Zoetendal EG, Hart A. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut.* 2016; 65(2): 330–339.
- (282) Gómez M, Acero Artículo de revisión. Composición y funciones de la flora bacteriana intestinal. *Repertorio de Medicina y Cirugía.* 2011; 20(2).
- (283) Martínez-Cócera C, Mesa del Castillo Payá M. Probióticos: ¿fantasía o realidad? *An Med Interna (Madrid)* 2005; 22: 53-54.
- (284) Vitetta L, Briskey D, Alford H, Hall S, Coulson S. Probiotics, prebiotics and the gastrointestinal tract in health and disease. *Inflammopharmacology.* 2014; 22(3):135-54.
- (285) Quinto EJ, Jiménez P, Caro I, Tejero J, Mateo J, Girbés T, Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review *Food and Nutrition Sciences* 2014; 5: 1765-1775.

- (286) Wallace TC, Guarner F, Madsen K, Cabana MD, Gibson G, et al. Human gut microbiota and its relationship to health and disease. *Nutrition Reviews* 2011; 69:392–403.
- (287) Gerritsen J, Smidt H, Rijkers GT, De Vos WM. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes Nutr.* 2011; 6:209–240.
- (288) Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10: 159-169.
- (289) Baucells BJ, Hally MM, Álvarez AS y Figueras JA. Asociaciones de probióticos para la prevención de la enterocolitis necrosante y la reducción de la sepsis tardía y la mortalidad neonatal en recién nacidos pretérmino de menos de 1.500 g: una revisión sistemática. *An Pediatr (Barc).* 2016; 85(5):247-255.
- (290) Xiaofei Xu, Pingping Xu, Chungwah Ma., Jian Tang and Xuewu Zhang. Gut Microbiota, Host Health, and Polysaccharides. *Biotechnology Advances* 2013; 31: 318–337.
- (291) Curtis TP, Sloan WT. Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Curr Opin Microbiol.* 2004; 7:221-226.
- (292) Duangjitcharoen Y, Duangporn K, Chutinun P, Sartjeen P, Chaiyavat Ch. Selection and characterization of probiotic lactic acid bacteria with heterocyclic amine binding and nitrosamine degradation properties. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2014; 4 (07): 014-023.
- (293) He F. 2006. The intestinal microbiotic of the elderly. In Ouwehand AC, Vaughan EE, ed. *Gastrointestinal microbiology*. New York: Taylor and Francis 75-92.
- (294) MaCartney AL, Gibson GR. The normal microbiota of the human gastrointestinal tract: history of analysis, succession, and dietary influences. In: Ouwehand AC, Vaughan EE, ed. *Gastrointestinal microbiology*. New York: Taylor 2006; 51-73.
- (295) Mountzouris KC, McCartney AL, Gibson GR. Intestinal microflora of human infants and current trends for its nutritional modulation. *Brit J Nutr.* 2002; 87:405-420.
- (296) Dethlefsen L, Eckburg PB, Bik EM, Relman DA. Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol Evol,* 2006; 21:517-523.

- (297) Lee HJ, Choi JK, Ryu HS, Choi CH, Kang EH, Park KS, Min YW, Hong KS. Therapeutic Modulation of Gut Microbiota in Functional Bowel Disorders. *J Neurogastroenterol Motil.* 2017; 23(1):9-19.
- (298) Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011; 108 (1):4578–85.
- (299) Thompson RS, Roller R, Mika A, Greenwood BN, Knight R, Chichlowski M, Berg BM, Fleshner M. Dietary Prebiotics and Bioactive Milk Fractions Improve NREM Sleep, Enhance REM sleep Rebound and Attenuate the Stress-Induced Decrease in Diurnal Temperature and Gut Microbial Alpha Diversity. *Front Behav Neurosci.* 2017; 10:240.
- (300) Chung WS, Walker AW, Louis P, Julian Parkhill², Vermeiren J, Bosscher D, Duncan SH, Harry J. Flint HJ. Modulation of the human gut microbiota by dietary fibres occurs at the species level. *BMC Biology.* 2016; 14(3).
- (301) Tojo R, Suárez A, Clemente M, de los Reyes-Gavilán C, Margolles A, ET AL. Intestinal microbiota in health and disease: Role of bifidobacteria in gut homeostasis *World journal of Gastroenterology* 2014; 7- 20(41): 15163-176.
- (302) Million M, Lagier J-C, Yahav D, Paul M. Gut bacterial microbiota and obesity *Clinical Microbiology and Infection*, 2013; 19: 4.
- (303) Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Flint, H. J. et al. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2012; 9: 577–589.
- (304) Houghteling PD, Walker WA. Why Is Initial Bacterial Colonization of the Intestine Important to Infants' and Children's Health? *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition.* 2015; 60: 294–307.
- (305) Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(26):11971-5.
- (306) Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M, Xaus J, Fernández L, Olivares M, Xaus J, Fernández L, Rodríguez JM. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol.* 2008; 159(3):187-93.
- (307) Moles L, Gómez M, Heilig H, Bustos G, Fuentes S, et al. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PLoS One* 2013; 8(6).

- (308) Makino H; Kushiro, Ishikawa A, Muylaert E, Kubota D, et al. Transmission of intestinal *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strains from mother to infant, determined by multilocus sequencing typing and amplified fragment length polymorphism. *Applied and environmental microbiology* 2011; 77(19):6788–93.
- (309) Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr* 2003; 91: 48-55.
- (310) Mueller NT, Bakacs E, Combellick J, Grigoryan Z, Dominguez-Bello MG. The infant microbiome development: mom matters. *Trends Mol Med*. 2015; 21(2): 109–117.
- (311) Scott KP, Gratz SW, Sheridan PO, Flint HJ, Duncan SH. The influence of diet on the gut microbiota *Pharmacological Research* 2013; 69: 52–60.
- (312) Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, Welling GW. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2000; 30: 61-67.
- (313) Suvorov A. Gut Microbiota, Probiotics, and Human Health *Biosci Microbiota Food Health*. 2013; 32(3): 81–91.
- (314) Serrano CA, Harris PR. Desarrollo del microbioma intestinal en niños. Impacto en salud y enfermedad. *Rev Chil Pediatr*. 2016; 87(3):151-53.
- (315) Dash SK. Selection criteria for Probiotic. *Suplement Agro Food industry* 2009; 20(3):26-28.
- (316) Elmer, GW, MacFarland L, MacFarland M. *The Power of Probiotics*. Haworth Press, inc., Washington 2007; pp.1-128.
- (317) Sanders ME, Akkermans LM, Haller D, Hammerman C, Heimbach J, Hörmannspurger G, Huys G, Levy DD, Lutgendorff F, Mack D, Phothirath P, Solano-Aguilar G, Vaughan E. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes*. 2010; 1:164-185.
- (318) Lavilla-Lerma L, Pérez-Pulido R, Martínez BM, Maqueda M, Valdivia E. Characterization of functional, safety, and gut survival related characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from farmhouse goat's milk cheeses *International Journal of Food Microbiology* 2013:136-145.
- (319) Becker C, Neurath MF, Wirtz S. The Intestinal Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. *ILAR Journal* 2015; 56(2):192-204.

- (320) Foxx-Orenstein AE, Chey WD. Manipulation of the Gut Microbiota as a Novel Treatment Strategy for Gastrointestinal Disorders. *The American Journal of Gastroenterology Supplements* 2012; (1): 41-46.
- (321) Artis D. Epithelial cell recognition of commensal bacteria and a maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 411- 420.
- (322) Maloy KJ, Powrie F. Interstitial Homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* 2011; 474: 298-306.
- (323) Manzoni P. Probiotics and their mechanisms of action, current research and application for pediatric and neonatal disease: an update. *Pediatric Health*. 2007; 1(1): 31-33.
- (324) Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. *Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas color. Tomo II. 5ª ed.* Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires-Argentina. 1999.
- (325) Muñoz AD, Duarte CV. *Manual de Procedimientos para la determinación de Susceptibilidad Antibiótica en Patógenos de Importancia Hospitalaria.* Instituto Nacional de Salud. 2012.
- (326) Instituto Nacional de Salud. *Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión.* Elaboración: Rosa Sacsquispe Contreras y Jorge Velásquez Pomar - Lima: Ministerio de Salud. 2002.
- (327) Win W., Allen S., Janda W., Koneman E., Procop G., Schreckenberger P. y Woods G. *Diagnóstico Microbiológico. 6ta. Edición.* Editorial Médica Panamericana S. A. Buenos Aires. Argentina 2008.
- (328) NCCLS, Wayne, PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Disk diffusion supplemental tables. Document M100-S10.* 2000.
- (329) Navarro F, Miró E, Mirelis B. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2010. 28: 638-45.
- (330) García J., Cantón R., García J., Gómez M., Martínez Rodríguez C. y Vila J. *Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* Madrid. España. 2000.
- (331) Tormo RC. Probióticos. Concepto y mecanismos de acción. *Anales de Pediatría.* 2006; 4 (S1).

- (332) Beserra LJR, Ramires LME, Guimarães JPC, Franco RM, Sloboda MAC. Viability of probiotic micro-organism *Lactobacillus acidophilus* in dairy chocolate dessert and its action against foodborne pathogens *Ciência Rural*, Santa Maria 2016; 46(2):368-374.
- (333) Abdulla AA, Abed TA, AL-Saffar AK, Alahmed SG, AL-Saffar HK, Wesawei YA. Analysis of Probiotic properties of *Lactobacillus acidophilus* from commercial yoghurt *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 2015; 4(12): 548-554.
- (334) El-Kholy AM, El-Shinawy SH, Meshref AMS, Korny AM. Screening of Antagonistic Activity of Probiotic Bacteria against Some Food-Borne Pathogens. *Journal of Applied & Environmental Microbiology* 2014; 2 (2): 53-60.
- (335) Restrepo A. et al. *Microbiología de las infecciones humanas*. Editorial CIB. Corporación para Investigaciones Biológicas. Primera Reimpresión. Bogotá. Colombia 2008.
- (336) Hor YY, Liong MT. Use of extracellular extracts of lactic acid bacteria and bifidobacteria for the inhibition of dermatological pathogen *Staphylococcus aureus* *Dermatologica Sinica*. 2014; 32 (3): 141-147.
- (337) Calderón O., Padilla C., Chaves C., Villalobos L., Arias M. Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 2007. Vol. 57 N° 1.
- (338) Ouwehand AC, Tuomola EM, Tolkkio S & Salminen S. Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. *Int J Food Microbiol*. 2001; 64: 119-126.
- (339) Naidu A. Probiotics spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB). *Critical Rev. Food Science Nut*. 1999; 38: 13-126.
- (340) Villanueva FR. Probióticos: una alternativa para la industria de alimentos. *Ingeniería Industrial*. Universidad de Lima. Perú. 2015; 33: 265-275.
- (341) Piard JC., Desmazeaud M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: Oxygen meatolites and catabolism end-products. *Lait* 1991; 71: 525-541.

APÉNDICES

APÉNDICE 1. GALERÍA FOTOGRÁFICA

METODOLOGÍA EMPLEADA

Productos sólidos reconstituidos



Siembra en el medio agar M.R.S.



Estandarización de la obtención de extractos crudos

Tubos con caldo M.R.S. con los productos probióticos



Incubación: Tubos con caldo MRS con los productos probióticos en estufa a 35°C



Agitación: Tubos con caldo MRS con los productos probióticos



Antes de centrifugar



Filtración del sobrenadante a través de bujías con membranas de filtración.

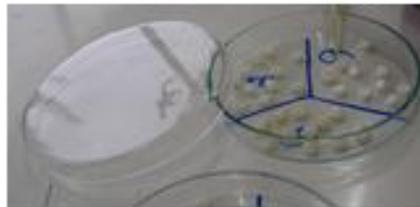
sobrenadante colocado en tubos con tapa rosca



Inoculación del patógeno de prueba (Preparación de las placas con el patógeno)
Se sumerge un hisopo estéril en la suspensión Estricción con el hisopo para inoculación del patógeno



Aplicación de los discos



Medición y registro de los diámetros de los halos de inhibición



ANEXOS

ANEXO 1. MEDICIONES: tres mediciones de cada producto probiótico enfrentado al patógeno

Escherichia coli

MEDICIONES				Promedio	DES
Probiótico	1	2	3	Diámetro halo	ST
1	15	14	16	15	1.00
2	12	11	13	12	1.00
3	12	14	16	14	2.00
4	16	14	15	15	1.00
5	12	13	12	12	0.50
6	14	14	12	13	0.87
7	13	14	15	14	1.00
8	14	15	13	14	1.00
9	13	14	16	14	1.80
10	15	13	14	14	1.00
11	12	12	13	12	0.50
12	14	13	13	13	0.50
13	15	16	15	15	0.50
14	15	16	14	15	1.00
15	14	14	15	14	0.87
16	17	16	18	17	1.00
17	16	15	15	15	0.50
18	13	16	13	14	1.73
19	16	15	14	15	1.00
20	15	15	16	15	0.50
21	17	16	15	16	1.00
22	15	16	17	16	1.00
23	14	16	15	15	1.00
C	21	21	21	21	0.346

Edwardsiella sp.

MEDICIONES				Promedio	DES
Probiótico	1	2	3	Diámetro halo	ST
1	15	14	14	14	0.87
2	13	15	14	14	1.00
3	12	14	13	13	1.00
4	15	16	15	15	0.50
5	12	12	13	12	0.87
6	18	20	20	19	0.87
7	17	20	20	19	1.73
8	15	14	16	15	0.87
9	12	13	14	13	0.87
10	13	13	14	13	0.87
11	15	16	15	15	0.50
12	12	11	13	12	0.87
13	15	15	13	14	1.32
14	14	15	17	15	1.32
15	18	17	17	17	0.50
16	17	16	16	16	0.87
17	14	15	14	14	0.87
18	14	14	15	14	0.87
19	12	14	13	13	1.00
20	13	14	13	13	0.50
21	21	22	24	22	1.80
22	22	21	23	22	1.00
23	16	14	15	15	1.00
C	24	24	24	24	0.10

Enterococcus sp.					
MEDICIONES				Promedio	DES
Probiótico	1	2	3	Diámetro halo	ST
1	18	17	17	17	0.50
2	14	15	16	15	1.00
3	21	22	21	21	0.50
4	21	20	20	20	0.50
5	17	16	16	16	0.50
6	22	21	21	21	0.50
7	20	19	19	19	0.87
8	21	22	21	21	0.87
9	20	19	18	19	1.00
10	22	21	23	22	1.00
11	14	14	15	14	0.87
12	15	16	17	16	0.87
13	16	15	18	16	1.32
14	20	22	21	21	1.00
15	22	23	19	21	2.18
16	22	22	20	21	0.87
17	15	15	16	15	0.87
18	13	13	16	14	1.73
19	22	22	20	21	0.87
20	23	22	21	22	1.00
21	23	22	21	22	1.00
22	21	20	20	20	0.50
23	16	15	17	16	1.00
C	22	23	22	22	0.50

Proteus vulgaris					
MEDICIONES				Promedio	DES
Probiótico	1	2	3	Diámetro halo	ST
1	25	23	21	23	2.00
2	22	21	20	21	1.00
3	22	21	20	21	1.00
4	19	21	20	20	1.00
5	21	22	18	20	1.80
6	16	16	17	16	0.87
7	18	19	18	18	0.50
8	21	19	20	20	1.00
9	19	18	18	18	0.87
10	17	19	16	17	1.80
11	18	17	17	17	0.87
12	20	20	18	19	0.87
13	16	18	17	17	1.00
14	20	18	19	19	1.00
15	23	19	22	21	1.80
16	21	23	22	22	1.00
17	21	20	19	20	1.00
18	22	22	20	21	1.32
19	21	22	23	22	1.00
20	17	18	17	17	0.50
21	22	22	20	21	1.32
22	21	22	20	21	1.00
23	18	16	18	17	1.32
C	24	24	24	24	0.20

Staphylococcus aureus

MEDICIONES				Promedio	DES
Probiótico	1	2	3	Diámetro halo	ST
1	17	15	16	16	0.87
2	15	14	14	14	0.87
3	15	15	16	15	0.50
4	16	17	16	16	0.50
5	14	16	13	14	1.32
6	18	17	16	17	1.00
7	21	20	20	20	0.50
8	19	20	19	19	0.87
9	18	16	17	17	1.00
10	19	18	18	18	0.50
11	12	12	13	12	0.87
12	15	16	17	16	0.87
13	17	16	13	15	1.80
14	18	19	18	18	0.87
15	15	16	17	16	0.87
16	15	16	15	15	0.50
17	14	14	12	13	0.87
18	13	12	12	12	0.50
19	16	14	16	15	1.32
20	13	13	16	14	1.73
21	18	17	16	17	1.00
22	19	18	18	18	0.50
23	14	12	14	13	0.87
C	16	16	16	16	0.20

Klebsiella sp.

MEDICIONES				Promedio	DES
Probiótico	1	2	3	Diámetro halo	ST
1	14	14	15	14	0.50
2	13	15	14	14	1.00
3	16	14	15	15	1.00
4	17	16	16	16	0.50
5	14	13	13	13	0.50
6	17	18	17	17	0.50
7	17	18	17	17	0.50
8	18	17	19	18	1.00
9	20	19	18	19	1.00
10	21	19	20	20	1.00
11	14	14	15	14	0.87
12	16	15	15	15	0.50
13	15	16	15	15	0.50
14	17	18	17	17	0.50
15	16	16	17	16	0.87
16	15	16	15	15	0.50
17	16	17	16	16	0.50
18	18	17	17	17	0.50
19	19	18	18	18	0.50
20	17	16	16	16	0.87
21	20	21	20	20	0.50
22	16	15	17	16	1.00
23	13	12	11	12	1.00
C	16	16	16	16	0.10

Salmonella paratyphi A

MEDICIONES				Promedio	DES
Probiótico	1	2	3	Diámetro halo	ST
1	18	20	19	19	1.00
2	17	18	17	17	0.50
3	15	16	15	15	0.87
4	18	17	16	17	1.00
5	14	13	16	14	1.80
6	15	16	12	14	1.80
7	15	18	18	17	1.73
8	21	24	22	22	1.80
9	17	19	18	18	1.00
10	22	21	21	21	0.50
11	14	14	15	14	0.87
12	18	19	20	19	0.87
13	18	19	20	19	1.00
14	19	17	18	18	0.87
15	17	19	19	18	0.87
16	22	22	20	21	0.87
17	15	15	16	15	0.87
18	18	17	17	17	0.87
19	22	21	18	20	1.80
20	16	18	17	17	0.87
21	26	23	26	25	1.73
22	21	20	20	20	0.50
23	16	17	16	16	0.50
C	24	24	24	24	0.20

Shigella sp.

MEDICIONES				Promedio	DES
Probiótico	1	2	3	Diámetro halo	ST
1	15	16	15	15	0.87
2	13	13	14	13	0.87
3	16	15	15	15	0.87
4	15	16	15	15	0.87
5	12	11	13	12	1.00
6	14	13	13	13	0.50
7	20	19	19	19	0.87
8	17	16	15	16	1.00
9	14	14	15	14	0.87
10	13	15	14	14	1.00
11	17	14	15	15	1.50
12	16	17	16	16	0.87
13	13	16	13	14	1.73
14	16	14	15	15	1.00
15	16	15	18	16	1.32
16	15	16	15	15	0.50
17	17	16	16	16	0.50
18	19	18	18	18	0.50
19	18	19	18	18	0.87
20	16	16	17	16	0.87
21	18	19	18	18	0.50
22	16	15	17	16	1.00
23	13	12	11	12	1.00
C	22	22	22	22	0.17

Salmonella paratyphi B

MEDICIONES				Promedio	DES
Probiótico	1	2	3	Diámetro halo	ST
1	16	17	16	16	0.87
2	13	15	14	14	1.00
3	14	14	12	13	0.87
4	17	16	16	16	0.50
5	14	15	14	14	0.50
6	15	14	16	15	1.00
7	17	18	17	17	0.50
8	18	15	16	16	1.80
9	14	16	16	15	1.32
10	16	17	16	16	0.87
11	14	12	14	13	0.87
12	15	14	14	14	0.50
13	15	16	15	15	0.50
14	15	13	15	14	0.87
15	16	16	14	15	0.87
16	15	18	16	16	1.32
17	14	17	14	15	1.73
18	12	12	13	12	0.50
19	15	14	14	14	0.87
20	13	16	14	14	1.32
21	16	18	18	17	0.87
22	19	18	18	18	0.50
23	13	15	14	14	1.00
C	21	21	21	21	0.30

Salmonella typhi

MEDICIONES				Promedio	DES
Probiótico	1	2	3	Diámetro halo	ST
1	22	20	22	21	0.87
2	16	15	17	16	1.00
3	17	18	17	17	0.50
4	19	20	19	19	0.87
5	17	16	16	16	0.87
6	15	14	14	14	0.87
7	17	18	17	17	0.50
8	20	21	20	20	0.50
9	18	17	17	17	0.50
10	17	15	17	16	1.32
11	18	17	17	17	0.87
12	23	21	23	22	1.32
13	22	22	20	21	0.87
14	20	20	21	20	0.87
15	19	20	19	19	0.50
16	20	21	20	20	0.87
17	17	17	18	17	0.87
18	17	17	18	17	0.50
19	19	18	18	18	0.50
20	17	17	18	17	0.50
21	28	27	27	27	0.50
22	25	27	27	26	0.87
23	16	16	19	17	1.73
C	24	24	24	24	0.20

Pseudomonas sp.

MEDICIONES				Promedio	DES
Probiótico	1	2	3	Diámetro halo	ST
1	23	22	24	23	1.00
2	18	18	19	18	0.50
3	16	17	18	17	1.00
4	21	20	20	20	0.50
5	18	18	19	18	0.50
6	15	16	15	15	0.87
7	20	19	18	19	1.00
8	19	20	18	19	1.00
9	16	17	18	17	1.00
10	20	19	19	19	0.87
11	19	20	19	19	0.87
12	19	18	20	19	1.00
13	17	19	19	18	0.87
14	21	21	22	21	0.50
15	25	25	23	24	0.87
16	24	24	22	23	0.87
17	19	17	19	18	0.87
18	23	22	21	22	1.00
19	25	27	26	26	1.00
20	22	23	22	22	0.50
21	27	26	28	27	1.00
22	23	22	22	22	0.50
23	14	15	14	14	0.87
C	11	11	11	11	0.20