



**Universidad  
Norbert Wiener**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA**

**ESCUELA ACADEMICO PROFESIONAL DE FARMACIA Y  
BIOQUIMICA**

**“Efecto Antagónico *in vitro* de *Lactobacillus spp.*  
aislados de ‘tocosh’- *Solanum sp.*, proveniente de  
Huánuco, frente a bacterias enteropatógenas”**

Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

Presentado por:

**Br. Gutiérrez Rodríguez, Ivette Evelyn**

Asesor:

**Dr. Félix Veliz, Luis Miguel**

Co-Asesor:

**Dr. Gavián Chávez, Ronnie Gustavo**

Lima - Perú

2019

## **DEDICATORIA**

Este trabajo está dedicado a mi padre Rolando Blanco Valerio, a mi madre Alejandrina Rodríguez Chaupe, a mis hijas Ariana y Samantha que son mi motivación principal y la razón para seguir esforzándome cada día en el logro de mis metas.

### **Agradecimientos:**

Agradezco a mi padre celestial por darme sabiduría y base de mi fe para continuar y no decaer a pesar de cada tropiezo que tuve.

Al Instituto Nacional de Salud por permitirme desarrollar esta investigación dentro del Laboratorio de Enteropatógenos, en su apoyo a la formación de investigadores.

Así mismo a mi Co-Asesor al PhD. Ronnie Gavilán Chávez por su aporte valioso y amplio conocimiento en microbiología y biología molecular además de guiarme durante mi estancia en el laboratorio y enseñarme que la investigación es dedicación, paciencia cuyo objetivo es el bien para la comunidad.

También agradecer a una persona tan especial que contribuyo en el diseño y ejecución del proyecto la Mg. Ana María Chávez, gracias por su paciencia, exigencia constante.

Al Dr. Luis Miguel Félix por su aporte, dedicación y amplio conocimiento en la revisión de la tesis.

# INDICE GENERAL

	Pág.
<b>INDICE GENERAL</b>	iv
<b>INDICE DE TABLAS</b>	vi
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	vii
<b>INDICE DE ANEXOS</b>	viii
<b>RESUMEN</b>	ix
<b>ABSTRACT</b>	x
<b>I. INTRODUCCION</b>	1
- Situación problemática	1
- Marco teórico referencial	3
- Estudios antecedentes	15
- Importancia y justificación de la investigación	22
- Objetivo del estudio	23
- Hipótesis de investigación	23
<b>II. MATERIALES Y METODOS</b>	24
2.1. Enfoque y Diseño	24
2.2. Población, muestra y muestreo	24
2.3. Variables de estudio	25
2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	25
2.5. Proceso de recolección de datos	31
2.5.1. Autorización y coordinaciones previas para la recolección de datos	31

2.5.2. Aplicación de instrumentos de recolección de datos	31
2.6. Métodos de análisis estadístico	32
2.7. Aspectos bioéticos	32
<b>III. RESULTADOS</b>	<b>33</b>
<b>IV. DISCUSIÓN</b>	<b>52</b>
4.1. Discusiones	52
4.2. Conclusiones	56
4.3. Recomendaciones	57
<b>CITAS Y REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>58</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>67</b>

## INDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Cepas patógenas referenciales del Instituto Nacional de Salud.	26
<b>Tabla 2.</b> Resultados correspondientes a la identificación microscópica.	33
<b>Tabla 3.</b> Resultados del efecto antagónico de cepas de <i>Lactobacillus spp.</i> frente a enteropatógenos por el método de Burkholder.	36
<b>Tabla 4.</b> Resultados de la comparación del efecto antagónico de <i>Lactobacillus spp.</i> aisladas de 'tocosh'- <i>Solanum sp.</i> in vitro frente a bacterias enteropatógenas, por el método de Burkholder.	40
<b>Tabla 5.</b> Prueba de T de student del efecto antagónico de <i>Lactobacillus spp.</i> aisladas de 'tocosh'- <i>Solanum sp.</i>	42
<b>Tabla 6.</b> Resultados del efecto antagónico de cepas de <i>Lactobacillus spp.</i> frente a enteropatógenos por el método modificado de difusión en pozos - evaluación de producción de metabolitos extracelulares.	43
<b>Tabla 7.</b> Resultados de la comparación del efecto antagónico de <i>Lactobacillus spp.</i> aisladas de 'tocosh'- <i>Solanum sp.</i> in vitro frente a bacterias enteropatógenas, método del sobrenadante.	46
<b>Tabla 8.</b> Prueba de T de student del efecto antagónico de <i>Lactobacillus spp.</i> aisladas de 'tocosh'- <i>Solanum sp.</i> in vitro frente a bacterias enteropatógenas, por método del sobrenadante.	49
<b>Tabla 9.</b> Prueba de t de student del efecto antagónico producido por <i>Lactobacillus spp.</i> aisladas de 'tocosh'- <i>Solanum sp.</i> comparación del método modificado de difusión Burkholder y el método del sobrenadante libre de células.	50

## INDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Mecanismo de fermentación de carbohidratos.	5
<b>Figura 2.</b> Árbol filogenético de los miembros del grupo de <i>Lactobacillus</i> , análisis de secuenciación del gen 16S RNA.	6
<b>Figura 3.</b> Estructura de pared celular de lactobacilos.	8
<b>Figura 4.</b> Resultado según porcentaje de la identificación microscópica.	34
<b>Figura 5.</b> Medias de halos de inhibición expresadas en mm, efecto antagónico por método de Burkholder de <i>Lactobacillus spp.</i> frente a <i>Vibrio cholerae</i> 1.457.10 INABA.	38
<b>Figura 6.</b> Medias de halos de inhibición expresados en mm, efecto antagónico por método de Burkholder de <i>Lactobacillus spp.</i> frente a <i>Salmonella typhi</i> 2.240-16.	39
<b>Figura 7.</b> Efecto antagónico que presentan las bacterias del género <i>Lactobacillus spp.</i> aisladas de 'tocosh'- <i>Solanum sp.</i> frente a bacterias enteropatógenas; por el método de Burkholder, estadística por grupos.	41
<b>Figura 8.</b> Medias de halos de inhibición expresados en mm, efecto antagónico por método modificado de difusión en pozos - evaluación de producción de metabolitos extracelulares de <i>Lactobacillus spp.</i> frente a <i>Vibrio cholerae</i> 1.457.10 Inaba.	45
<b>Figura 9.</b> Medias de halos de inhibición expresados en mm, efecto antagónico por el método de Burkholder de <i>Lactobacillus spp.</i> frente a <i>Salmonella typhi</i> 2.240-16.	46
<b>Figura 10.</b> Comparación del efecto antagónico de bacterias del género <i>Lactobacillus spp.</i> aisladas de 'tocosh'- <i>Solanum sp.</i> <i>in vitro</i> , frente a bacterias enteropatógenas, método del sobrenadante.	48
<b>Figura 11.</b> Comparación de medias entre grupos de los métodos modificados de difusión Burkholder y sobrenadante libre de células.	51

## INDICE DE ANEXOS

	Pág.
<b>Anexo A.</b> Matriz de consistencia	68
<b>Anexo B.</b> Operacionalización de variables	70
<b>Anexo C.</b> Instrumentos de recolección de datos	71
<b>Anexo D.</b> Instrumento de validación	75
<b>Anexo E.</b> Dictamen de informe de comité de ética	76
<b>Anexo F.</b> Evidencias de trabajo de campo	78



## RESUMEN

Según la OMS las enfermedades diarreicas (EDAS) son la segunda causa de muerte en niños menores de cinco años a nivel mundial. Desde la época incaica el 'tocosh' es caracterizado por poseer propiedades nutraceuticas. La presente investigación tuvo como **Objetivo:** Evaluar el efecto antagónico de *Lactobacillus spp.* aislados de 'tocosh' - *Solanum sp.* proveniente de Huánuco, frente a bacterias enteropatógenas: *Escherichia coli enteropatógena* (EPEC), *Salmonella typhi*, *Shiguella flexneri* y *Vibrio cholerae* Inaba. **Métodos:** La población fue extraída del tocosh producido en pozos de fermentación ubicados en la provincia de Yarowilca distrito de Obas, las bacterias fueron aisladas en caldo Man Rogosa Sharpe, en anaerobiosis e incubadas por 48 horas; para purificar las cepas de *Lactobacillus spp.* se realizaron las pruebas según el manual de Bergey; en la evaluación del efecto antagónico se emplearon los métodos de Burkholder y el método sobrenadante libre de células (CFS), el ensayo se realizó por triplicado a una concentración 2 de la escala de Mac Farland de bacterias lácticas incubándose en aerobiosis a 37°C por 18 horas. **Resultados:** De un total de 223 muestras 44 cepas presentaron características microscópicas y bioquímicas compatibles con *Lactobacillus spp.*, las medias de halos de inhibición formados por el método de Burkholder frente a *Vibrio cholerae* Inaba 1.457.10 (11,36 mm), *Salmonella typhi* 2.240-16 (9,86 mm), *Shiguella flexneri* WHO SH-15.3 (6 mm), *Escherichia coli enteropatógena* (EPEC) 2.734-18 (6mm) y por el método sobrenadante libre de células se obtuvo medias de *Vibrio cholerae* Inaba 1.457.10 (13,62 mm), *Salmonella typhi* 2.240-16 (10,52 mm), *Shiguella flexneri* WHO SH-15.3 (6,33 mm), *Escherichia coli enteropatógena* (EPEC) 2.734-18 (6,19 mm). En la comparación de grupos se determinó que el mayor efecto se obtuvo frente a *Vibrio cholerae* Inaba por ambos métodos. **Conclusiones:** Se determinó que *Lactobacillus spp.* aislados de 'tocosh' presentó efecto antagónico frente a bacterias enteropatógenas referenciales causantes de EDAS.

**Palabras clave:** 'tocosh' - *Solanum sp.*, *Lactobacillus spp.*, Enteropatógenos, sobrenadante libre de células, Método Burkholder

## ABSTRACT

According to the WHO, diarrheal diseases (EDAS) are the second leading cause of death in children under five years of age worldwide. From the Inca period the 'tocosh' is characterized by having nutraceutical properties. The present investigation had as **Objective:** To evaluate the antagonistic effect of *Lactobacillus spp.* isolated from 'tocosh' - *Solanum sp.* from Huánuco, against enteropathogenic bacteria: *Escherichia coli enteropathogen* (EPEC), *Salmonella typhi*, *Shiguella flexneri* and *Vibrio cholerae* Inaba. **Methods:** The population was extracted from the tocosh produced in fermentation wells located in the province of Yarowilca district of Obas, the bacteria were isolated in Man Rogosa Sharpe broth, in anaerobiosis and incubated for 48 hours; To purify the *Lactobacillus spp.* strains, tests were performed according to the Bergey manual; Burkholder methods and the cell-free supernatant method (CFS) were used in the evaluation of the antagonistic effect, the assay was performed in triplicate at a concentration of 2 of the Mac Farland scale of lactic bacteria incubating in aerobiosis at 37° C for 18 hours **Results:** Of a total of 223 samples, 44 strains had microscopic and biochemical characteristics compatible with *Lactobacillus spp.*, The means of inhibition halos formed by the Burkholder method versus *Vibrio cholerae* Inaba 1,457.10 (11,36 mm), *Salmonella typhi* 2.240-16 (9,86 mm), *Shiguella flexneri* WHO SH-15.3 (6 mm), *enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC) 2.734-18 (6mm) and by means of the cell-free supernatant method averages of *Vibrio cholerae* Inaba 1.457.10 were obtained (13,62 mm), *Salmonella typhi* 2.240-16 (10,52 mm), *Shiguella flexneri* WHO SH-15.3 (6,33 mm), *enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC) 2.734-18 (6,19 mm). In the comparison of groups, it was determined that the greatest effect was obtained against *Vibrio cholerae* Inaba by both methods. **Conclusions:** It was determined that *Lactobacillus spp.* isolated from 'tocosh' had an antagonistic effect against EDS causing enteropathogenic bacteria.

**Keywords:** 'tocosh' - *Solanum sp.*, *Lactobacillus spp.*, Enteropathogens, cell-free supernatant, Burkholder Method.

## I. INTRODUCCION

### - Situación problemática

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) las enfermedades diarreicas agudas (EDAS), son la segunda mayor causa de muerte en niños menores de cinco años a nivel mundial y su mortalidad asciende a 525 000 niños cada año, siendo reportados 1 700 millones de casos en todo el mundo <sup>(1)</sup>.

Entre las causas globales de mortalidad por EDAS observada en niños menores de cinco años, se encuentran organismos tales como: *Rotavirus*, *Calicivirus* y enteropatógenos, de los cuales las más infecciosas son *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteropatógena (EPEC) que comprende los genes formadores de fimbrias *bundle forming pili* (bfpA) e intimina *attaching and effacing* (eae), *shiguella*, *salmonella*, *Vibrio cholerae* y *Campylobacter*; mientras que en nuestro país un estudio cohorte reveló que en Lima Norte prevalecen *Norovirus* en un 35%, seguido de EPEC con un valor de 11.4% y *Campylobacter* 10.6%.<sup>(2,3)</sup>

En el Perú, hasta el 2017 se han reportado 964 343 episodios de EDA, de los cuales Lima, Arequipa y Piura notifican el 50,2% del total nacional, observándose en los niños menores de un año la más alta tasa de incidencia (TIA) con 206 por 1 000 menores de un año, seguido de los niños de uno a cuatro años con 131,1 TIA por 1 000 niños. De los episodios notificados de EDA el 97,5% fueron acuosas y el 2,5 % fueron disentéricas, presentándose en Lima el más alto porcentaje de notificaciones. <sup>(4)</sup>

Así mismo, durante el tratamiento antimicrobiano, el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades de la Unión Europea, informa sobre la resistencia de enteropatógenos frente a fluoroquinolonas, aminoglucósidos y carbapenémicos; mediada principalmente por la producción de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEEs) es por ello que el control de las enterobacterias se atribuye como prioridad crítica y la OMS promueve la investigación para el descubrimiento de nuevos antibióticos. <sup>(5,6)</sup> A este escenario se suman los reportes de reacciones adversas tales como anafilaxia y urticaria frente a

quinolonas, macrólidos y sulfonamidas así como, la inhibición de la síntesis del ácido nicotínico, la aparición de ictericia durante el tratamiento de EDAS a dosis profilácticas y erupciones cutáneas.<sup>(7,8)</sup>

Ante esta problemática, se necesitan alternativas exentas de resistencia y minimice las reacciones adversas; siendo el uso de probióticos una opción consistente con tales características. Precisamente, los probióticos son definidos como microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud en el huésped. <sup>(9)</sup> Los lactobacilos son un tipo de bacterias lácticas, son efectivos como coadyuvante durante la profilaxis con antibióticos, además de ello, en el tracto gastrointestinal pueden constituirse como barreras microbianas contra patógenos a través de la exclusión competitiva y modulación del sistema inmune del huésped. <sup>(10,11)</sup>

Las bacterias lácticas antes citadas, pueden encontrarse en el “tocosh”, un alimento fermentado tradicionalmente en la tierra a base de maíz o papa, en altitudes considerables de los andes centrales del Perú; siendo más frecuente la elaboración del ‘tocosh’ de papa por la gran variedad de papas nativas que se adaptan a diferentes condiciones climáticas. <sup>(12)</sup>

En este contexto es importante conocer la actividad de estas bacterias lácticas ya que, una de sus propiedades puede ser beneficiosa para la salud previniendo o ayudando al tratamiento en enfermedades diarreicas además, uno de los métodos que será aplicado permitirá determinar con mayor sensibilidad si existe tal actividad antagónica, al enfrentar *in vitro* lactobacilos directamente con bacterias patógenas referenciales del Instituto Nacional de Salud.

## - Marco teórico referencial

### 1. El tocosh

El 'tocosh', "tuqush" en quechua, es el resultado de una técnica tradicional que proviene de la época incaica en el Perú consumido como Tocosh Api, una variante es la mazamorra de consistencia menos espesa; combate infecciones y cicatriza heridas. El 'tocosh' de papa es el más conocido no obstante también se obtiene también a partir del maíz, olluco y yuca, los principales departamentos de producción son Ancash, Cuzco, Huánuco y Junín. La técnica de conservación consiste mediante la colocación de diferentes variedades de papas a una altitud de 4200 a 4400 msnm, en una cama de paja llamada «shicshi», que se trae de las alturas y una profundidad de 1 a 1,5mt, practicado a orillas del río. La fermentación se lleva a cabo durante un periodo de tiempo variable (hasta 8 meses) expuesta a bajas temperaturas y a la luz solar intensa. Su acción antibacterial se debe a la reducción de celulosa del almidón concentrado por acción de bacterias en el pozo de fermentación. <sup>(13-15)</sup>

#### A. Procesamiento y elaboración del tocosh

La elaboración del 'tocosh' es similar a la producción de la tunta o moraya, su diferencia radica en la calidad y variedad de la papa, se elabora con frecuencia entre los meses de marzo a septiembre <sup>(16)</sup>, las etapas de procesamiento incluyen:

- **Selección:** Se emplea la papa más pequeña entre ellas la de segunda y tercera calidad tales como Shiri y Hualash.
- **Excavación de pozos:** Se realiza muy cercano a corrientes de agua como manantial, ríos o puquio, con una profundidad de 1.5 metros, 1 metro de ancho debiendo tener un canal de entrada y salida y evitar que el agua arrastre suciedad al pozo.
- **Empozado:** El llenado debe ser por debajo de 20 cm, luego se procede a tapar con ichu o paja haciendo una especie de nido.

- **Transformación:** Después del llenado del pozo, empieza el proceso de fermentación, el tiempo es entre 1 a 6 meses, dándole los cuidados para que este no se contamine de microorganismos patógenos.
- **Extracción:** El momento de la extracción es cuando el producto presenta un líquido lechoso y no hay parte dura al ser presionado por las yemas de los dedos.
- **Ecurrido:** se realiza en canastas o cestos por un periodo de 2 a 4 horas hasta notar una masa compacta y blanquecina.
- **Oreado:** se extiende sobre una superficie bajo la sombra por 24 horas, facilitando de esta manera el escurrido final. A este producto obtenido se le conoce como 'tocosh fresco', a partir del cual puede iniciarse su comercialización y consumo.

#### **B. Características organolépticas**

Sus características comprenden

**Tamaño y peso:** menor a 80 g

**Color:** Blanco crema

**Sabor:** Ácido

**Olor:** *sui generis*

**Textura:** semidura

#### **C. Composición fitoquímica**

El screening fitoquímico confirma la presencia de alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides, cumarinas y aminoácidos en los extractos acuosos e hidroalcohólico de 'tocosh' y mazamorra de 'tocosh'. <sup>(17)</sup> Los macronutrientes principales son almidón 15,69%, 0,79% de proteínas totales obtenidos a partir de muestra fresca. <sup>(17)</sup>

#### **D. Características microbiológicas**

Su composición microbiológica es resultado de la fermentación láctica de carbohidratos; producto del proceso de fermentación se encuentra una

gran población de hongos, que va decreciendo al final del proceso, encontrándose principalmente organismos del género *Lactobacillus*.<sup>(18)</sup>

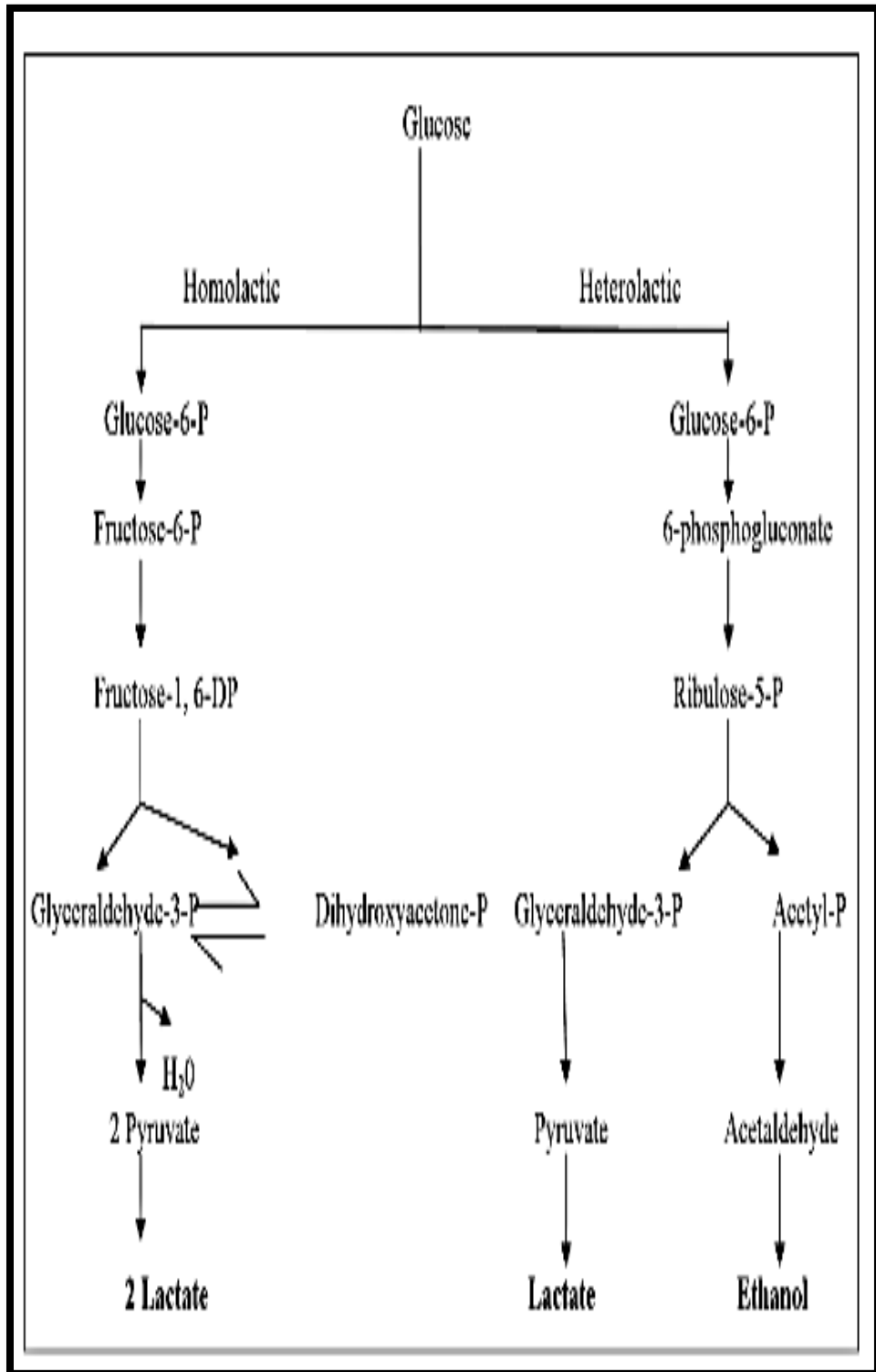


Figura 1. Mecanismo de fermentación de carbohidratos.<sup>(18)</sup>

## E. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se debe a la presencia de bacterias lácticas que durante el proceso de fermentación producen metabolitos secundarios con distintas propiedades nutraceuticas. (19)

## 2. Bacterias Acido lácticas

Las bacterias lácticas propiamente dichas pertenecen a 19 géneros distribuidos en siete grupos filogenéticos dentro del orden *Lactobacillales*, conforman un grupo muy heterogéneo de bajo contenido de guanina y citosina (G+C) dentro del filo *Firmicutes*, que han sido estudiadas mediante la secuenciación del gen ARNr 16S de *Lactobacillus*. (20)

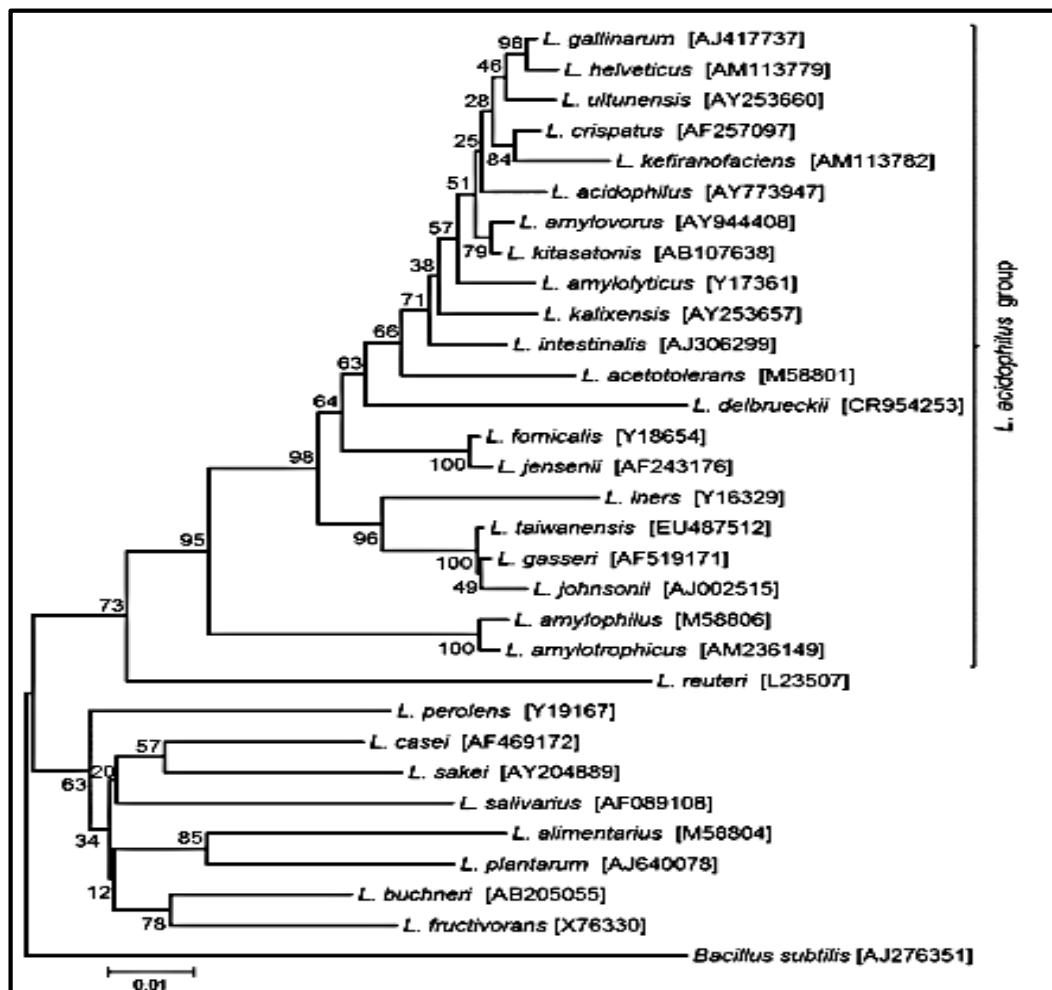


Figura 2. Árbol filogenético de los miembros del grupo de *Lactobacillus*, análisis de secuenciación del gen 16S RNA. (20)



## A. Características del género *Lactobacillus*

### i. Características macroscópicas:

- **Tamaño:** Por lo general sus colonias miden entre 2 a 5 mm de diámetro
- **Bordes:** Enteros, convexo,
- **Textura:** Lisa brillante
- **Color:** Blanco y sin pigmento, algunos casos amarillento o rojizo, no emiten ningún olor característico

### ii. Características microscópicas

Los miembros del género *Lactobacillus* están constituidos por células con forma de varilla, Gram positivas, no esporuladas.

### iii. Propiedades bioquímicas

#### Metabolismo

Pueden utilizar dos tipos de vías metabólicas:

- **Vía Homofermentativa:** Pueden fermentar hexosas como glucosa, manosa, galactosa o fructosa utilizando la vía Embden-Meyerhof, cuyo producto metabólico fundamental es el ácido láctico.
- **Vía Heterofermentativa Facultativa:** Fermentan hexosas con baja limitación de glucosa, utilizan la vía fosfoquinasa inducible cuyos productos son el ácido láctico y el ácido acético.
- **Vía Heterofermentativa obligatoria:** Además de ácido láctico ocurre la formación de ácido acético, etanol, anhídrido carbónico (CO<sub>2</sub>) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), utilizan la vía del fosfogluconato para el metabolismo de las hexosas y las pentosas por la ruta pentosa fosfato. <sup>(16)</sup>

La utilización de una u otra vía dependerá de la presencia de las enzimas que intervienen en la transformación del azúcar en ácido, la fructosa-1,6-difosfato-aldolasa en el primer caso, y una fosfocetolasa (aldolasa), en el segundo.

Otra característica es que estas bacterias no reducen nitratos, son catalasa citocromoxidasa negativas, su hábitat es el sistema gastrointestinal de aves, mamíferos y productos fermentados de origen vegetal o animal. <sup>(21,22)</sup>

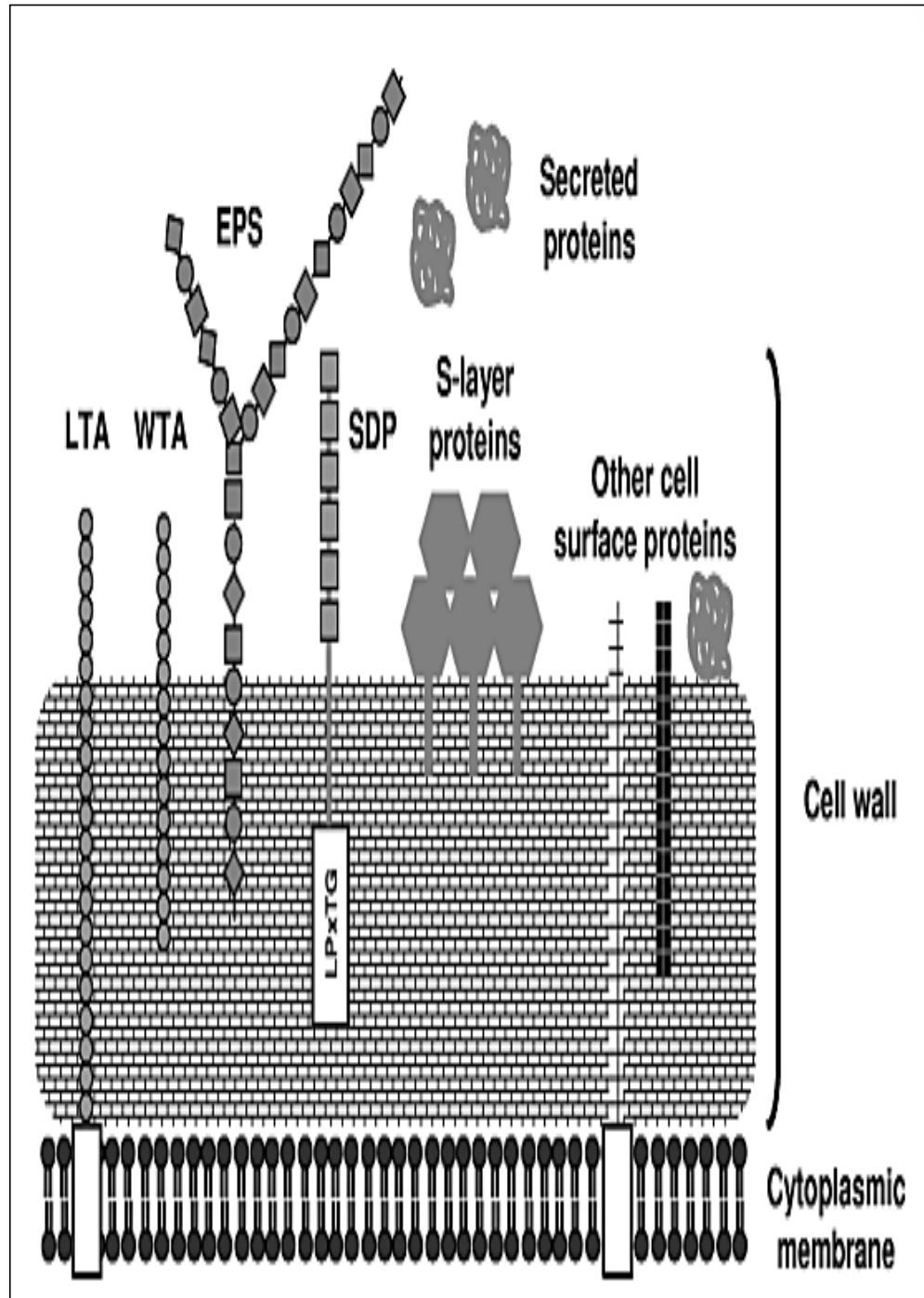


Figura 3. Estructura de pared celular de lactobacilos. <sup>(21)</sup>

#### **iv. Nutrición y condiciones de cultivo**

Son microorganismos muy exigentes, requieren de nucleótidos, aminoácidos y vitaminas, algunos de ácido pantoténico, nicotínico, biotina y B12. La variación de requerimientos es dependiente de la codificación genética de cada especie de *Lactobacillus*, sin embargo, entre los nutrientes esenciales que debe contener el medio está la peptona, algunos suplementos como manganeso y Tween 80, todos estos componentes están incluidos en el medio Man Rogosa Sharpe.

(20)

El crecimiento es óptimo cuando el pH del medio inicial es de 6,4 a 5,4, luego cesa el crecimiento cuando llega a un pH 3,6 – 4,0. Son anaerobios y aerobios facultativos con necesidades mínimas de CO<sub>2</sub> (5%), son quimiorganotrofos que requieren de medios enriquecidos.

(21)

### **B. Sustancias antagonistas producidas por bacterias lácticas**

#### **i. Ácidos orgánicos**

El efecto primario en la fermentación de carbohidratos es la reducción del pH, ello puede limitar el crecimiento de bacterias enteropatógenas; el ácido láctico y el ácido acético son débilmente disociados, produciendo así otros tipos de metabolitos como CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, este último frente a microorganismos Gram positivos, tiene acción bacteriostática mientras que frente a bacterias Gram negativas presenta acción bactericida. (22)

#### **ii. Bacteriocinas**

Son un tipo de proteínas o complejos proteicos producidas en su mayoría por la familia Lactobacillaceae pero también son producidas por Gram negativas; según investigaciones estas muestran actividad antibiótica, lo que justificaría su categorización como antibióticos sin embargo, la principal diferencia es que las bacteriocinas restringen su actividad a cepas de la misma especie, mientras que los antibióticos tienen un espectro de acción más amplio. Se sintetizan

ribosómicamente y se producen durante la fase primaria de crecimiento. <sup>(23,24)</sup>

Estas sustancias son utilizadas en la industria alimentaria como barrera frente a agentes patógenos y deterioro de los alimentos. Las cepas productoras de bacteriocinas tienen que protegerse de la acción y el efecto tóxico de sus propios metabolitos, esto ocurre a través de la producción de proteínas de inmunidad específicas. Los genes que codifican inmunidad están en estrecha proximidad genética a otros genes de procesamiento estructural de esta proteína. A menudo el gen estructural y el gen de inmunidad pueden ubicarse en el mismo operón. <sup>(25)</sup>

### 3. Bacterias enteropatógenas

Principales bacterias enteropatógenas causantes de EDAS

#### A. Genero *Escherichia*

##### ***Escherichia coli***

Pertenece a la familia Enterobacteriaceae, es un bacilo Gram negativo corto de 0,5 por 1 a 3 µm, anaerobio facultativo; las colonias presentan morfología con bordes definidos, son circulares, convexas y lisas. Crece muy bien en agar tripticosa soya y en agar sangre donde se observa hemólisis, así como también en medios selectivos como agar Mac Conkey. Entre sus características bioquímicas destacan la rápida fermentación de lactosa y como producto del metabolismo de glucosa forma dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), no presenta enzima citocromo oxidasa, produce indol a partir del triptófano y descarboxila la lisina. <sup>(26)</sup>

Esta especie es la más frecuente en aislamientos clínicos y la más relacionada a diversas enfermedades entre ellas gastroenteritis, las cepas involucradas están clasificadas en cinco principales grupos:

- ***Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)**
- ***Escherichia coli* enterotoxígena (ECET),**
- ***Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH)**
- ***Escherichia coli* enteroinvasiva (ECEI)**

- ***Escherichia coli* enteroagregativa (ECEA)**

i. ***Escherichia coli* enteropatógena**

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), es uno de los patotipos diarreogénicos de *E. coli* y la principal causante de diarreas en niños menores de cinco años; la diarrea provocada se manifiesta primero de forma espontánea y luego puede llegar a ser crónica sin sangre, su factor de virulencia está asociado a la expresión los antígenos capsular K, flagelar H, somático O, además contiene un plásmido que codifica genes que sintetizan las proteínas de adherencia alterando así la morfología de los enterocitos por lesión y borrado, según se detalla a continuación. <sup>(27)</sup>

ii. **Patogenia**

- **Adherencia inicial al enterocito:** La primera fase es ponerse en contacto la bacteria con la célula mediante la adherencia del flagelo y el pili tipo IV codificado por los genes *bundle-forming pilus* (BFP), conducen a la auto agregación y adherencia formando microcolonias, la presencia del factor de adherencia EAF-adherence factor plasmid permiten su clasificación en *Escherichia coli típica* (tEPEC) como atípica (aEPEC). <sup>(28)</sup>

- **Translocación de señales intracelulares:** Estas dependen de los sistemas de secreción de tipo III (T3SS) para trasladar los factores de virulencia directamente a las células huésped, codificados por una gran variedad de genes aproximadamente 40 kb, que codifican genes de proteínas efectoras, secretoras, de translocación de proteínas que pasan a través de poros a la membrana del enterocito y la subsecuente modificación del potencial de membrana de la mitocondria. <sup>(29)</sup>

- **Adherencia íntima bacteriana:**

En la segunda fase de patogenicidad los genes *eae* codifican la adhesina bacteriana 'intimina al formarse la adhesión bacteriana con el correspondiente *translocated intimin receptor* (Tir) y la unión de

T3SS al enterocito, ingresa la proteína Tir que daña la célula destruyendo las microvelocidades luego sale el receptor al ápice para conjugarse con la intimina, realizándose la transmisión de señales. <sup>(29)</sup>

## **B. Género Shiguella**

### ***Shiguella***

Bacilo anaerobio facultativo, Gram negativo sin embargo, su crecimiento es mejor en condiciones aeróbicas, presentan colonias convexas, circulares con borde definido cuyo diámetro es de 2 mm. Entre sus características bioquímicas están la fermentación de glucosa, la formación de gas producto del metabolismo de los hidratos de carbono, pero no pueden fermentar la lactosa. El cuadro clínico se desarrolla en el tubo digestivo y es poco frecuente la invasión a la circulación sanguínea; la dosis infecciosa es del orden  $10^3$  UFC/mL. Las especies patógenas de *Shiguella* son: *Shiguella flexneri*, *S. dysenteriae*, *S. boydii* y *S. sonnei* basados en el antígeno O, de las cuales *S. flexneri* es el agente etiológico más común en países en vías de desarrollo. <sup>(30)</sup>

#### **i. Manifestaciones clínicas**

Empieza con período de incubación de uno a dos días, los síntomas que se presentan son dolor abdominal, fiebre y diarrea líquida lo que conlleva a pérdida de agua y electrolitos, desencadenándose cuadros de deshidratación y acidosis; a partir de los siguientes días cursa con diarreas sanguinolentas que puede terminar en la muerte.

#### **ii. Patogenia**

La forma de contagio es fecal-oral y para que se produzca una infección por *Shiguella flexneri* basta con la dosis de 10 a 100 bacterias; a pesar de no presentar movilidad la carga mínima bacteriana es suficiente para desencadenar todo el proceso infeccioso. *S. flexneri* puede alterar la expresión de las mucinas encargadas de la secreción del moco y así penetrar a las células de Microfold o células M ubicadas en el íleo y colon, de esta manera es fagocitado por macrófagos una vez introducidas, estas salen de la

vacuola fagocítica induciendo apoptosis de los mismos, para invadir luego las células epiteliales de las superficies basolaterales para así multiplicarse, conllevando a la activación de interleuquinas-8 (IL-8) propagándose los neutrófilos que causan destrucción del epitelio lo que conduce a la diarrea mucosa con sangre. <sup>(31)</sup>

### C. Genero *Salmonella*

Son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, móviles debido a los flagelos peritricos que presentan entre sus características bioquímicas la formación de gas a partir del metabolismo de glucosa, producción de sulfuro de hidrogeno, no presenta enzima citocromo oxidasa. <sup>(30)</sup>

Existen más de 2500 especies de *Salmonella*, las especies más patógenas son *Salmonella typhi*, *Paratyphi A* y *Salmonella Paratyphi B*. Su incidencia es elevada en niños menores de cinco años y adultos mayores de 60 años, la forma como se transmite la enfermedad es fecal-oral por alimentos contaminados, el reservorio se encuentra en animales y la dosis de infección sintomática para *Salmonella typhi* es de  $10^3$  lo contrario para los demás tipos de salmonellas en las cuales se requiere un inóculo mayor entre  $10^6$  a  $10^8$  bacterias para que se produzca la enfermedad. <sup>(30)</sup>

El período de incubación en fiebre tifoidea dura de 10 a 14 días, los síntomas son diarreas, náuseas, vómitos, fiebre y mialgias sin embargo la enfermedad más frecuente es la enterocolitis causada por más de 1500 especies de *Salmonella*, cuyos síntomas pueden manifestarse después de las ocho horas de instaurada la infección con un inicio brusco. <sup>(30,32)</sup>

## D. Genero Vibrio

### *Vibrio cholerae*

Son bacilos curvos anaerobios facultativos Gram negativos, poseen un flagelo polar, presentan forma de coma de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de longitud, crecen a temperatura de 37 °C, sus colonias son convexas, lisas y redondas.

Además presentan enzima citocromo oxidasa, que las distingue de las demás bacterias Gram negativas entéricas, se reproducen a un pH muy alto (8,5 a 9,5), son sensibles a pH ácido, la mayoría son halotolerantes y el cloruro de sodio (NaCl) estimula su crecimiento. <sup>(26)</sup>

También presenta un antígeno H flagelar, existen más de 139 grupos con antígenos O, contenidos en los lipopolisacáridos estos a su vez se diferencian en los serogrupos O1 y el O139 los que causan la enfermedad del cólera, el serogrupo O1 se subdivide en tres serotipos Ogawa, Inaba y Hikojima a su vez presentan los biotipos o biovar: El tor y clásico, siendo este último el más patógeno, sin embargo el biovar El Tor fue el causante de la epidemia en la costa del Perú en los años 90. La importancia del antígeno O radica en que este es capaz de producir las toxinas liberadas en el huésped, responsable de las epidemias ocasionadas a nivel mundial. <sup>(33,34)</sup>

El hábitat de esta bacteria se encuentra en los ríos, mares o en crustáceos quitinosos, algas, zooplancton e insectos marinos; la dosis de infección a través de alimentos contaminados es baja, mientras que para la infección a través de agua contaminada la dosis es más alta por el efecto del ácido gástrico. <sup>(34)</sup>



- **Estudios antecedentes**

**Antecedentes internacionales**

**Lin T-H y Pan T-M. (2019)**, en su estudio denominado “Characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus plantarum* NTU 102, tuvieron como **objetivo**: analizar las bacteriocinas producidas por *L. plantarum* NTU 102 y caracterizar esta sustancia antibacteriana y probarla frente a cepas indicadoras de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* subsp. *Entérica*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Cronobacter sakazakii* y *Candida albicans*. **Metodología**: emplearon el sobrenadante libre de células (CFS) a partir de un cultivo de *L. plantarum* NTU 102 que incubaron en caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe) a 37° C durante 24 h; ello fue el extracto que utilizaron para aplicar cromatografía en columna de gel de sílice luego enfrentaron el CFS a bacterias indicadoras por el método modificado de difusión de pozos de agar cuyos cultivos contenían aproximadamente 10<sup>9</sup> unidades formadoras de colonias (UFC) / ml, inoculadas en placas de agar Müeller-Hinton. Los pocillos tenían 7 mm de diámetro, sobre la cual aplicaron 60 µL de CFS, incubándose a 37° C por 24 h. **Resultados**: encontraron que el CFS tenía actividad frente a Gram positivos, negativos y hongos con halos de inhibición mayor a 10 mm, la bacteriocina aislada tuvo actividad bactericida frente a *V. parahaemolyticus* a una concentración de 5 a 125 µg/ml, la sustancia identificada por HPLC fue 2- (2-1 mino -1-hidroxietoxi) etil 2-metilpropanoato péptido similar a la leucina y lisina además **concluyeron**: la sustancia antibacteriana producida por *L. plantarum* NTU 102 tenía actividad antibacteriana contra *V. parahaemolyticus* podría resultar útil como conservante de alimentos para controlar los patógenos transmitidos por los alimentos. <sup>(35)</sup>

**Jiménez E, et al. (2018)**, en la investigación titulada “Exploring diversity and biotechnological potential of lactic acid bacteria from tocosh - traditional Peruvian fermented potatoes - by high throughput sequencing (HTS) and culturing”, cuyo **objetivo**: fue explorar la biodiversidad de este alimento ancestral ‘tocosh’ a partir de muestras extraídas de pozos de la comunidad de Tambogán (Huánuco,

Perú), evaluando además el potencial biotecnológico, técnicas de cultivo y secuenciación por HTS. En la **metodología**: emplearon diversas técnicas, para la evaluación de la biodiversidad emplearon pirosecuenciación del gen 16 ARNr, en la evaluación biotecnológica (degradación de fitatos, actividad amilolítica, producción de exopolisacáridos (EPS), producción de aminas biogénicas, producción de folatos y riboflavina) y en la evaluación antagónica utilizaron la prueba de mancha en agar y su actividad la expresaron por halos de inhibición + (presencia) y – (ausencia), los organismos indicadores fueron *L. monocytogenes* y *B. subtilis*. Los **resultados** fueron: entre cero y un mes de fermentación de la papa se encuentran microorganismos como: *Leuconostoc*, *Clostridium*, *zymophilus* y *Prevotella*; mientras que a los ocho meses de fermentación la población dominante con más del 80% fueron los *Lactobacillus*, entre ellos *Lb. brevis*, *Lb. casei*, *Lb. fermentum*, *Lb. sakei* y *Lb. farmicinis* y en menor proporción *Pediococcus* y *Enterococcus*. Aislaron 62 cepas de un total de 151 de las cuales la actividad amilolítica solo se identificó en *Ln. mesenteroides* (23%) y *Lb. sakei* (7%), la actividad degradante de fitato (> 100 U / ml) se encontraron en las tres especies. Producción de EPS *Ln. mesenteroides* (100%) y *Lb. sakei* (18%). *Lb. sakei* produce folatos, mientras que *Ln. mesenteroides* producen principalmente riboflavina. *Ln. mesenteroides* (9%) y *Lb. sakei* (11%) mostraron actividad antimicrobiana anti-Listeria, mientras que la inhibición contra *Bacillus subtilis* se distribuyó de manera diversa por lo que **concluyen** que el género lactobacilos se encuentra presentes en mayor cantidad en pozos entre seis a ocho meses de fermentación así mismo estas bacterias lácticas tienen alto potencial biotecnológico para ser utilizado como aditivo en la conservación de alimentos envasados. <sup>(36)</sup>

**Yépez et al. (2017)**, realizaron un estudio titulado “Biopreservation potential of lactic acid bacteria from Andean fermented food of vegetal origin”, plantearon como **objetivo**: evaluar la actividad antimicrobiana sobrenadante libre de células (CFS) contra hongos toxigénicos y bacterias patógenas; cuantificación de los compuestos bioactivos del CFS y por último el perfil de resistencia de las cepas LAB. Según su **metodología**, con respecto a la actividad antimicrobiana

utilizaron 32 muestras a partir de 130 cepas aisladas tanto de tocosh de Perú como de chicha fermentada a base de maíz de origen argentino, la técnica fue mancha en agar con algunas modificaciones para la prueba in situ luego para la evaluación del CFS el ensayo fue por difusión en pozos células a partir de un cultivo de 18 horas y enfrentadas a bacterias indicadoras de contaminación alimentaria tales como: *Listeria monocytogenes*, *E. coli* 0157:H7 y *Salmonella typhi*, cuyos **resultados** demostraron que todas las cepas probadas de *Lactobacillus* excepto una cepa de *L. sakei* inhibieron a los tres patógenos por la prueba de mancha en agar (6 a > 10mm) de diámetro de inhibición entre las cuales *L. plantarum* exhibieron mayor actividad. **Conclusiones:** *L. plantarum* tuvo mayor actividad frente a bacterias patógenas transmitidas por alimentos por el ello lo consideran como una alternativa para la conservación de alimentos, aislaron 15 componentes activos a partir del CFS, el CFS no presenta resistencia a fármacos. <sup>(37)</sup>

**Sánchez L. et al. (2015)**, en Cuba, realizaron una investigación titulada “Cepas de *Lactobacillus spp.* con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos” cuyo **objetivo** planteado fue la caracterización de lactobacilos mediante pruebas *in vitro*, resistencia a sales biliares, al jugo gástrico y su capacidad de producir sustancias inhibitorias frente a cuatro bacterias patógenas de importancia veterinaria. **Metodología:** aislaron cepas cuya procedencia fue la saliva e diferentes partes del intestino delgado de terneros sanos, seleccionaron cepas que cumplan con las características fenotípicas para lactobacilos, en el ensayo de antagonismo emplearon la técnica spot en la cual aplicaron 10 µL de la cepa a indicadora (*Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Salmonella sp.* (ATCC6539) y *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), obtenidos del Laboratorio de Culturas Lácticas do BIOAGRO (Universidad Federal de Viçosa) a una concentración de  $10^7$  -  $10^6$  UFC/mL y luego se incubaron a 37 °C por 48 horas. Los **resultados** dieron a conocer que 17 cepas cumplieron las características fenotípicas, pero solo evaluaron seis cepas para la actividad antagonista debido al perfil de resistencia a sales biliares y crecimiento frente a diferentes pH demostrando que

la inhibición fue desde 11,24 mm hasta 32,62 mm frente a los cuatro patógenos sin embargo, al neutralizarlo con bicarbonato solo dos cepas presentaron actividad antagonista además, observaron que *Lactobacillus* presenta viabilidad a pH desde 2,5, 4,5 y 7 así mismo, las concentraciones mayores a  $10^6$  UFC/mL para inhibir a bacterias patógenas, por ende **concluyeron** que cuatro cepas demostraron mayor actividad probiótica, las cuales podrían resultar útiles como suplementos en la alimentación de terneros neonatos para prevenir enfermedades por microorganismos patógenos. <sup>(38)</sup>

**Bamidele TA, et al. (2014)**, en su investigación titulada. Identification, antagonistic activities against *Vibrio cholerae* 01 of lactic acid bacteria isolated from Nigerian grown salad vegetables, se plantearon como **objetivo** identificar bacterias lácticas a partir de vegetales crecidos en Nigeria e identificación genética de los mismos así mismo evaluar su antagonismo frente a *Vibrio cholerae* 01 causante de la enfermedad del cólera. Aplicaron en su **metodología** un diseño descriptivo, utilizaron microbiología básica para el aislamiento de las bacterias lácticas; obtenidas a partir de col, zanahoria, pepino y lechuga que fueron adquiridos de 12 puntos de venta de vegetales en el estado de Lagos, Nigeria. Además utilizaron la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de una fracción del gen 16S rRNA. Los sobrenadantes libres de células (CFS) de ocho especies seleccionadas al azar de bacterias lácticas (BL) se emplearon en los ensayos antagonistas siguiendo la técnica de Kirby – Bauer por pozos en agar, frente a cuatro cepas de brotes de *Vibrio cholerae* 01 al 0.5 de la escala de Mac Farland incubándolas posteriormente a 37°C en 24h. Obteniendo en sus **resultados**: 96 aislados de las cuales al realizar el secuenciamiento estas mostraron entre 89-99% de similitudes con 16 especies diferentes de BL comparados en el GeneBank; *Lactobacillus spp* (8), *Weissella spp* (3), *Pediococcus spp* (3), *Solibacillus* no cultivado (1) y *Enterococcus durans* (1); con respecto al ensayo antagonista *Lactobacillus plantarum* aislado de pepino y col solo inhibió a un tipo de brote de *Vibrio cholerae* 01 cuyos halos de inhibición promedio fluctuaron entre 14 a 15mm de diámetro; a diferencia de *L. fermentum* que mostraron halos entre 10 a 20mm de diámetro. **Concluyendo**

que estas bacterias muestran actividad antagónica contra cepas de brotes de *V. cholerae* 01, contribuyendo así a la exploración de estos probióticos contra este patógeno. <sup>(39)</sup>

### **Antecedentes nacionales**

**Avila Carmen, Nori (2019)**, en su tesis titulada “Efecto inhibitorio de *Lactobacillus sp.* sobre el crecimiento de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Piura, Perú, 2018”. Tuvo como **objetivo** determinar el efecto inhibitorio de *Lactobacillus sp* frente a *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*; cuya **metodología** fue empleando la técnica de doble capa, sembrando por puntura inicialmente de Lactobacilos en MRS y luego cubriendo con una capa del microorganismo patógeno con una turbidez de 0.5 de la escala de Mc Farland ( $1-2 \times 10^8$  UFC/ml) en agar tripticasa soya (TSA) fundido y enfriado a 45°C luego incubaron a 37 °C por 24h. en consecuencia los **resultados** obtenidos frente a *Salmonella typhimurium* fueron de 1,5 cm hasta 2,1 cm de halos de inhibición y frente a *Staphylococcus aureus* desde 1,5 cm hasta 2,7 cm de medias de halo de inhibición. Por ultimo **concluye** que logro aislar *Lactobacillus delbrueckii* a partir de macerado de cebada además esta inhibe a *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. <sup>(40)</sup>

**Enciso Ylla, S (2019)**, en su tesis titulada “Actividad antibacteriana del extracto de *Solanum tuberosum* “tocosh” y clorhexidina al 0.12% sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 in vitro. Propuso como **objetivo** Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Solanum tuberosum* “Tocosh” al 25%, 50%, 75%, 100% frente al *Streptococcus mutans* cepa ATCC 25175 y realizar un estudio comparativo frente a un grupo control con clorhexidina al 0.12%; la autora empleo en su **metodología** para la prueba de inhibición el método de Método de Kirby – Bauer por pozos en agar, realizándose en agar Brain Heart Infusión (BHI) alrededor de 20 ensayos con cepa de *Streptococcus mutans* haciendo cinco orificios de 6mm de diámetro colocando 35µl de Extracto hidroalcohólico de tocosh a cuatro orificios y al quinto

35µl de clorhexidina al 0.12%; obteniendo como **resultados**: el extracto de tocosh al 100% obtuvo mayor halo de inhibición (33,15mm±2,21mm) frente al *Streptococcus mutans* mientras que el menor fue el extracto al 25% con un halos de inhibición promedio de 20,20mm±1,88mm y frente al control con clorhexidina al 0.12% este obtuvo 26mm de halos de inhibición. En **conclusión** el extracto hidroalcohólico de tocosh inhibió a *Streptococcus mutans* a todas las concentraciones probadas aun al compararlo frente al grupo control siendo este probiótico útil para tratar problemas de caries. <sup>(41)</sup>

**Nina Flores Yulitza-J. (2019)**, en su tesis titulada “Estudio in Vitro del Efecto Antibacteriano de un Queso Artesanal con Cepas Probióticas: *Saccharomyces Boulardii*, *Lactobacillus Casei*, *Lactobacillus Acidophilus*; sobre el Crecimiento del *Candida Albicans*, en los Laboratorios de la UCSM, Arequipa 2016”. Postula como **objetivo** determinar el efecto inhibitorio in vitro del Queso artesanal enriquecido con cepas probióticas, sobre el crecimiento de la *Candida Albicans*. Aplicando en su **metodología** un diseño descriptivo en la cual evaluó promedios de 10 repeticiones del ensayo antagonista frente a *Candida Albicans* ATCC 10231 proporcionados por el laboratorio de la Universidad Católica de Santa María, utilizo la técnica de prueba de Kirby – Bauer con discos de difusión donde el papel filtro estéril fue embebido con las cepas probióticas a investigar. Sus **resultados** demostraron que de las tres cepas probióticas, la cepa *Saccharomyces boulardii* obtuvo mayor promedio de halos de inhibición (19 ± 3.20mm) frente crecimiento de la *Candida albicans*, le sigue el *Lactobacillus acidophilus* con 18 ± 1.96mm y el de menor efecto antibacteriano es el *Lactobacillus casei* con 10 ± 1.37mm, en sus **conclusiones** sustenta que hubo diferencias significativas en el efecto antibacteriano entre las tres cepas probióticas frente a la *Candida sp.* a un 95% de significancia, importante resultado dentro del marco de salud pública para combatir la candidiasis oral. <sup>(42)</sup>

**Aguilar G, Villalobos E. (2018)** en su estudio titulado “Efecto antibacteriano de ‘tocosh’ fresco de *Zea mays* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Escherichia coli*”, plantearon como **objetivo** comprobar el efecto

antibacteriano in vitro del tocosh fresco de *Zea mays* en cepas patógenas así mismo, determinar la concentración de tocosh que tenga mayor efecto inhibitorio además de compararlos con antibióticos de referencia. Aplicaron en su **metodología** el extracto acuoso a partir de tocosh fresco por tamizado y luego llevado a rotavapor seguidamente, prepararon diluciones al 25,50 y 100%. El método de Método de Kirby – Bauer por pozos en agar fue aplicado para la evaluación del efecto inhibitorio con sacabocados de 6 mm de diámetro donde colocaron 20 µL del extracto, comparándolos con discos de ceftriaxona para *Staphylococcus aureus* ATCC 25623, ciprofloxacino para *Bacillus cereus* ATCC 13061 y Sulfametoxazol / Trimetoprima para *Escherichia Coli* ATCC 25922, sus lecturas lo realizaron a las 24h. En sus **resultados** hallaron que el extracto acuoso del ‘tocosh’ presentó mayor actividad inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* a una concentración del 100% con halos promedio de 34,62 mm de diámetro comparado con ceftriaxona 27,50 mm para los demás microorganismos los antibióticos tuvieron mayor actividad que el extracto. Por lo que **concluyeron** en que el extracto acuoso de tocosh tiene actividad inhibitoria frente a cada uno de las bacterias antes mencionadas sin embargo tuvo mayor efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25623. <sup>(43)</sup>

**Rodríguez J, García-Godos P. (2017)** en su artículo titulado “Capacidad probiótica de bacterias lácticas aisladas de chicha de molle” cuyo **objetivo** fue evaluar la capacidad probiótica de bacterias lácticas aisladas de aisladas de chicha de molle tanto in vitro como in vivo en *Ratus norvegicus* “rata” cepa Holtzman. En su **metodología** utilizaron 55 muestras de chicha de molle obtenido de dos anexos pertenecientes a las provincias de Huanta y Huamanga, para la identificación emplearon coloración Gram y fermentación de carbohidratos, en la prueba de antagonismo usaron cepas patógenas como: *Escherichia coli*, ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 a la concentración del tubo N° 2 de la escala de Mac Farland con 10<sup>9</sup> UFC/mL al igual que las cepas de lactobacilos colocando 20µL en un pocillo de 6 mm de diámetro siguiendo la metodología de Difusión en pozos. E n sus **resultados** lograron aislar 55 cepas de bacterias lácticas

además, demostraron que *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus maltaromicus* presentaron antagonismo frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 con diámetros de halos de inhibición de 14 a 15mm. Así mismo, el efecto *in vivo* es beneficioso puesto que aumenta la carga microbiana de probióticos mejorando el estado físico en ratas aumentando su peso en 46 gr más con extracto de yacón a comparación de 24 gr en tratamiento solo con Lactobacilos, **concluyendo** que aislaron cepas: *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus maltaromicus*, 14 de ellas evidenciaron antagonismo frente a cepas patógenas. <sup>(44)</sup>

Sin embargo, aún no existen estudios que demuestren la actividad *in vitro* de *Lactobacillus* directamente con bacterias patógenas causantes de EDAS puesto que, con el método Burkholder modificado se podría obtener mayor efecto antagónico por las condiciones físicas y nutricionales que se alterarían durante el ensayo.

#### - **Importancia y justificación de la investigación**

Esta investigación es muy importante a nivel de salud pública ya que las bacterias patógenas ensayadas provienen del marco de estandarización de la **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)** en el Instituto Nacional de Salud. Algunas de ellas con alto perfil de resistencia frente a antibióticos comúnmente utilizados en el campo de la medicina, que al ser enfrentadas a estos probióticos nos brindan información sobre su posible forma de antagonizarlos.

El presente trabajo de investigación está justificado por lo siguiente:

##### **Valor teórico**

Contribuirá proporcionando nuevas evidencias científicas sobre la capacidad antagónica de *Lactobacillus* spp. aislados del 'tocosh', frente a bacterias enteropatógenas.

##### **Valor metodológico**

Proporciona un nuevo modelo de metodología a emplear para demostrar el antagonismo de lactobacilos frente a enteropatógenos cuyos resultados han



sido recolectados con instrumentos validados obteniendo resultados confiables que fueron procesados con el software SPSS versión 24.

**Valor práctico:**

Permitirá contar con base para difundir el conocimiento de las propiedades antibióticas y así promover su consumo por la población desde su fuente natural que no utiliza este alimento fermentado.

Asimismo, incentivará la realización de estudios en instituciones orientadas a la producción investigativa que promuevan al 'tocosh' como una nueva fuente de probióticos, que ayuden en la prevención de posibles enfermedades diarreicas.

- **Objetivo del estudio**

**Objetivo general**

Evaluar el efecto antagónico *in vitro* de *Lactobacillus spp.* aislados de 'tocosh' - *Solanum sp.* proveniente de Huánuco, frente a bacterias enteropatógenas.

- **Hipótesis de investigación**

Los *Lactobacillus spp.* aislados de 'tocosh' - *Solanum sp.* proveniente de Huánuco presenta efecto antagónico frente a bacterias enteropatógenas.

## II. MATERIALES Y METODOS

### 2.1. Enfoque y Diseño

a. **Tipo de investigación:** Descriptivo

b. **Diseño de Investigación:** No experimental, Transversal, descriptivo

c. **Enfoque:** Cuantitativo

La justificación, objetivos, hipótesis y diseño de investigación se describen de manera resumida en el anexo A.

### 2.2. Población, muestra y muestreo

#### 2.2.1. Población

La población estuvo conformada por bacterias identificadas en el 'tocosh' que hayan cumplido el criterio de selección, esta se obtuvo de tres pozos de producción pertenecientes a la provincia de Yarowilca distrito de Obas, departamento de Huánuco.

#### 2.2.2. Muestra

La muestra estuvo conformada por Lactobacilos que presentaron actividad antagónica frente a bacterias enteropatógenas. El muestreo se realizó por conveniencia.

#### 2.2.3. Criterios de inclusión y exclusión

- **Criterios de Inclusión**

Bacterias que cumplan con las características fenotípicas según el manual de Bergey, correspondientes al género *Lactobacillus* <sup>(20)</sup>.

- **Criterios de Exclusión**

1. Bacterias provenientes de pozos con menos de tres meses de fermentación. <sup>(14)</sup>
2. Bacterias provenientes de pozos inadecuadamente procesados. <sup>(26)</sup>

### **2.3. Variables de estudio**

**Variable independiente:** *Lactobacillus spp.* aislados de 'tocosh' – *Solanum sp.*

**Variable dependiente:** Efecto antagónico frente a bacterias enteropatógenas

### **2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos**

Se elaboraron formatos como instrumentos para la recolección de datos en base a las variables, indicadores y criterios de medición (Anexo B) y descritas en el anexo C.

Los cuales se validaron por los expertos en el área a investigar, considerándose la valoración obtenida y las sugerencias hechas por los expertos descritos en la matriz de validación de expertos, véase anexo D. Estos fueron divididos según cada etapa de la investigación como se describe en el flujograma del anexo F.

1. Operaciones preliminares
2. Identificación fenotípica
3. Antagonismo por competición de espacio y nutrientes
4. Antagonismo para la evaluación de producción de metabolitos extracelulares

#### **A. Materiales, reactivos y equipos**

Los equipos utilizados en los diferentes ensayos se encuentran detallados en el anexo F. indicando número de serie y fecha de adquisición.

##### **1. Material vegetal**

Pulpa de papa rosada fermentada – *Solanum tuberosum*, Véase anexo F.

## 2. Material biológico

**Tabla 1.** Cepas patógenas referenciales del Instituto Nacional de Salud

<b>Cepa</b>	<b>Código</b>
<i>Escherichia coli</i> <i>enteropatógena</i>	2.734-18
<i>Salmonella typhi</i>	2.240-16
<i>Shiguelia flexneri</i>	WHO SH-15.3
<i>Vibrio cholerae Inaba</i>	1.457.10

## 3. Materiales empleados en la recolección de la muestra

- Tubos cónicos estériles de 50mL
- Hielo seco
- Termómetro
- Caja de poliestireno

## 4. Materiales, reactivos y equipos utilizados en el aislamiento y purificación de *Lactobacillus* spp. presentes en el 'tocosh'

### Materiales

- Bolsa de polipropileno para equipo homogeneizador
- Pipetas de 35 mL
- Probeta 50 mL
- Probeta de 500 mL
- Placas Petri 100 x 15 mm
- Pro-pipeta
- Balón de 1000 mL
- Balón de 500 mL
- Espátula
- Placas de Petri 100 x 15 mm
- Puentes de tinción

- Portaobjetos
- Asa de siembra de platino

**Reactivos:**

- Agua destilada
- Medio de cultivo Man Rogosa Sharpe (MRS), Merck Peruana
- Lugol
- Safranina
- Cristal Violeta
- Alcohol
- Acetona 1:1
- Peróxido de hidrógeno 50%, laboratorios Alkomed E.I.R.L.
- Bactiden oxidasa, laboratorios Merck

**5. Materiales y reactivos utilizados en la evaluación del efecto antagónico de *Lactobacillus* presentes en el 'tocosh'**

**Materiales**

- Placas Petri 100 x 15 mm
- Sacabocado de 6 mm de diámetro
- Aguja estéril
- Micropipeta de 100 µL
- Puntas de 100 µL
- Filtros de jeringa estériles Millipore Millex, Merck Peruana
- Tubos de vidrio con taparosca de 25ml
- Asa de siembra

**Reactivos**

- Medio de cultivo Man Rogosa Sharpe (MRS), Merck Peruana
- Medio de cultivo Müller Hinton, Merck Peruana
- Medio agar base, Merck Peruana
- Escala 0.5 de Mac Farland

## **B. Preparación de la muestra, aislamiento de *Lactobacillus spp.* presentes en el 'tocosh' e identificación fenotípica**

### **1. Preparación de la muestra**

i.**Recolección:** Se realizó en el departamento de Huánuco, según los lugares de mayor producción y donde el 'tocosh' fue procesado según las características descritas por Rosales <sup>(15,16)</sup>; además, se contó con la anuencia del respectivo dueño.

ii.**Selección de la muestra:** Las muestras de 'tocosh' fueron seleccionadas por conveniencia, adoptándose el criterio de tomar una muestra de 'tocosh' proveniente de tres pozos diferentes a una distancia no mayor a 100 metros. De cada pozo se obtuvo 50 g de 'tocosh', de la parte media del pozo. Posteriormente fueron transportadas manteniéndolas a 10°C.

### **2. Aislamiento de *Lactobacillus spp.***

#### **i. Pre-enriquecimiento:**

Se eliminó la cáscara de la papa para luego pesar 25 g de la muestra de la papa entera fermentada ('tocosh'), mezclando cada muestra con 225 mL de caldo MRS Broth (Man Rogosa Sharpe), dilución 1/10, luego se colocó en el equipo homogenizador *Smasher* a una velocidad (paladas/min) de 560 paladas/60 segundos, posteriormente se realizaron diluciones seriadas por duplicado según se detalla en el anexo F.

#### **ii. Aislamiento de *Lactobacillus spp.***

Se utilizó 0,1 mL de las suspensiones anteriormente diluidas para cada una de tres placas de agar MRS a 37°C durante 24-48 horas, la técnica de siembra empleada fue agotamiento por estría, se utilizaron jarras de anaerobiosis con una atmósfera de 10% de CO<sub>2</sub>. Para la conservación de cada aislado se utilizó caldo MRS con 20% de glicerol a -20°C.

### 3. Identificación fenotípica

Seis colonias representativas por muestra fueron seleccionadas de cada placa, y se realizaron las siguientes pruebas:

#### **i. Identificación macroscópica**

Se consideró las características morfológicas de las colonias descritas por el manual de Bergey entre ellas: color blanco, borde entero, forma circular, convexas y aspecto cremoso.

#### **ii. Identificación microscópica:**

Se consideró aquellas células que presentaron coloración Gram positivas y forma de bacilos o cocobacilos.

#### **iii. Pruebas de bioquímica diferencial:**

Comprenden su capacidad fermentativa, la presencia de enzima citocromo oxidasa y catalasa; basándose en el manual de Berguey y los procedimientos indicados en el manual de Microbiología de Koneman, respectivamente. <sup>(20,45)</sup>

**Control positivo:** Se utilizó “Vivera”, probióticos de *Lactobacillus rhamnosus* GG 5X10<sup>9</sup> UFC, elaborado por laboratorios Probiotal S. A. Italia; comercializado por Merck Peruana R.S. N. ° DE-2114.

#### **iv. Purificación de las colonias:**

Una vez identificadas aquellas colonias que presentaron las características de lactobacilos se re-aislaron en agar MRS a pH 6,5.

### **C. Evaluación del efecto antagónico de *Lactobacillus spp.* presentes en el ‘tocosh’**

#### **Activación de bacterias patógenas**

Las cepas patógenas fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Salud; previamente se recibió capacitación para el manejo de dichos microorganismos lo cual se detalla en la tabla 1.

La procedencia de estas cepas fue de muestras referenciadas de diferentes establecimientos de salud con sensibilidad conocida e identificada y tipificada; se mantuvieron conservadas a -80° C y fueron

activadas siguiendo los procedimientos mencionados en el manual de microbiología del Instituto Nacional de Salud. <sup>(46)</sup>

## **1. Método modificado de difusión por Burkholder**

### **i. Preparación de placas Mueller Hinton**

Previamente se repartió en cada placa 28 mL de agar Mueller Hinton con un grosor de 4 mm, controlando la esterilidad del medio. El inóculo de la suspensión de bacterias enteropatógenas se obtuvo por el método directo a la concentración de 0.5, según la escala de Mac Farland, este fue estriado con un hisopo sobre la superficie del agar en tres direcciones dejando secar por cinco minutos.

### **ii. Preparación de cilindros de agar**

Circunscribiendo las colonias seleccionadas horada el medio agar MRS con ayuda de un sacabocado de 6 mm de diámetro previamente inoculadas con cepas *Lactobacillus spp.* a escala 2 de Mac Farland que fueron incubadas por 24 horas (*o/n*) en condiciones de microaerofilia. <sup>(47)</sup>

### **iii. Incorporación de cilindros de agar**

Se incorporaron los cilindros de agar antes mencionados sobre la superficie de las placas contenidas con medio Mueller Hinton inoculadas con las bacterias enteropatógenas, posteriormente se incubaron a 37°C por 18 horas, la lectura se realizó igual que el método de Kirby Bauer <sup>(48)</sup>.

## **2. Método modificado de difusión en pozos - Evaluación de metabolitos extracelulares**

### **i. Preparación del sobrenadante**

Cepas cultivadas en 20 mL de caldo MRS se incubaron por 24 horas a 37°C, en anaerobiosis; el sobrenadante libre de células (*cell free supernatants*-CFS) se obtuvo tras centrifugar a 10 000 rpm/10 min <sup>(27)</sup>, luego se separa del pellet a través de un filtro de jeringa cuyo poro fue de 0,22 µm.



El control de calidad del CFS se garantizó sembrando por estría en agar MRS a 37°C por 24 horas en anaerobiosis.

## ii. Ensayo de antagonismo

Se realizó el frotis de los microorganismos enteropatógenos sobre agar Müeller Hinton, posteriormente con la ayuda de un sacabocado estéril de 10 mm de alto y 6 mm de diámetro se formaron los pozos en los agares, vertiéndose en cada uno de ellos 100 µL del CFS, incubándose a 37°C por 18 h y posteriormente se evaluó la presencia de halos de inhibición, la lectura de las placas se realizó de igual forma que el método descrito en el *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), la prueba se realizó por triplicado. <sup>(48,49)</sup>

## 2.5. Proceso de recolección de datos

### 2.5.1. Autorización y coordinaciones previas para la recolección de datos

Luego de inspeccionar distintos pozos de producción en diversos departamentos, se obtuvo la autorización de uno de los productores de 'tocosh' de la provincia de Yarowilca, distrito de Obas, departamento de Huánuco, ya que este cumplía con las características descritas por Rosales H. <sup>(16)</sup>

A su vez se gestionó la aceptación del proyecto ante el comité de ética en investigación del Instituto Nacional de Salud, obteniéndose la aprobación.

### 2.5.2. Aplicación de instrumentos de recolección de datos

Los instrumentos fueron aplicados según las fases de investigación descritas en el anexo F, luego de seleccionar la muestra se realizó el aislamiento y purificación de *Lactobacillus spp.*; siempre y cuando hayan cumplido con las características descritas en el manual de Bergey.

Posteriormente se efectuó el ensayo antagónico por los dos métodos Burkholder y el de sobrenadante libre de células (CFS). Luego se evaluaron los resultados con el sistema SPSS versión 24.

## **2.6. Métodos de análisis estadístico**

Para los análisis estadísticos se utilizó, los registros obtenidos a partir de los instrumentos de investigación basados en la matriz de Operacionalización de variables, véase anexo B.

Luego se realizó un análisis descriptivo y comparación de las medias de los halos de inhibición para establecer diferencias significativas entre el efecto antagónico de los Lactobacilos y cada una de las bacterias enteropatógenas. Para el contraste de normalidad se utilizó el test de Levene para la prueba de homogeneidad de varianzas y la prueba *t* de student para comparar diferencias para dos promedios entre los dos métodos empleados: método de Burkholder y método del sobrenadante libre de células (CFS).

## **2.7. Aspectos bioéticos**

El proyecto de investigación fue presentado ante el comité de ética en investigación del Instituto Nacional de Salud para obtener los permisos de ejecución no sin antes haber aprobado el curso de ética en investigación realizado en el 2018.

Luego de la aprobación del proyecto, el estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Referencia Nacional de Enteropatógenos del Instituto Nacional de Salud ubicado en Cápac Yupanqui 1400 - Jesús María, Lima. Con código AGISNET **OT-0022-18** descrito en el anexo E.

### III. RESULTADOS

#### 3.1. Identificación fenotípica

##### 3.1.2. Resultados correspondientes a la identificación macroscópica

Durante el proceso de aislamiento se obtuvo 223 colonias compatibles con lactobacilos por las características macroscópicas, sin embargo estos se confirmaron con la prueba de identificación microscópica las cuales se detalla a continuación.

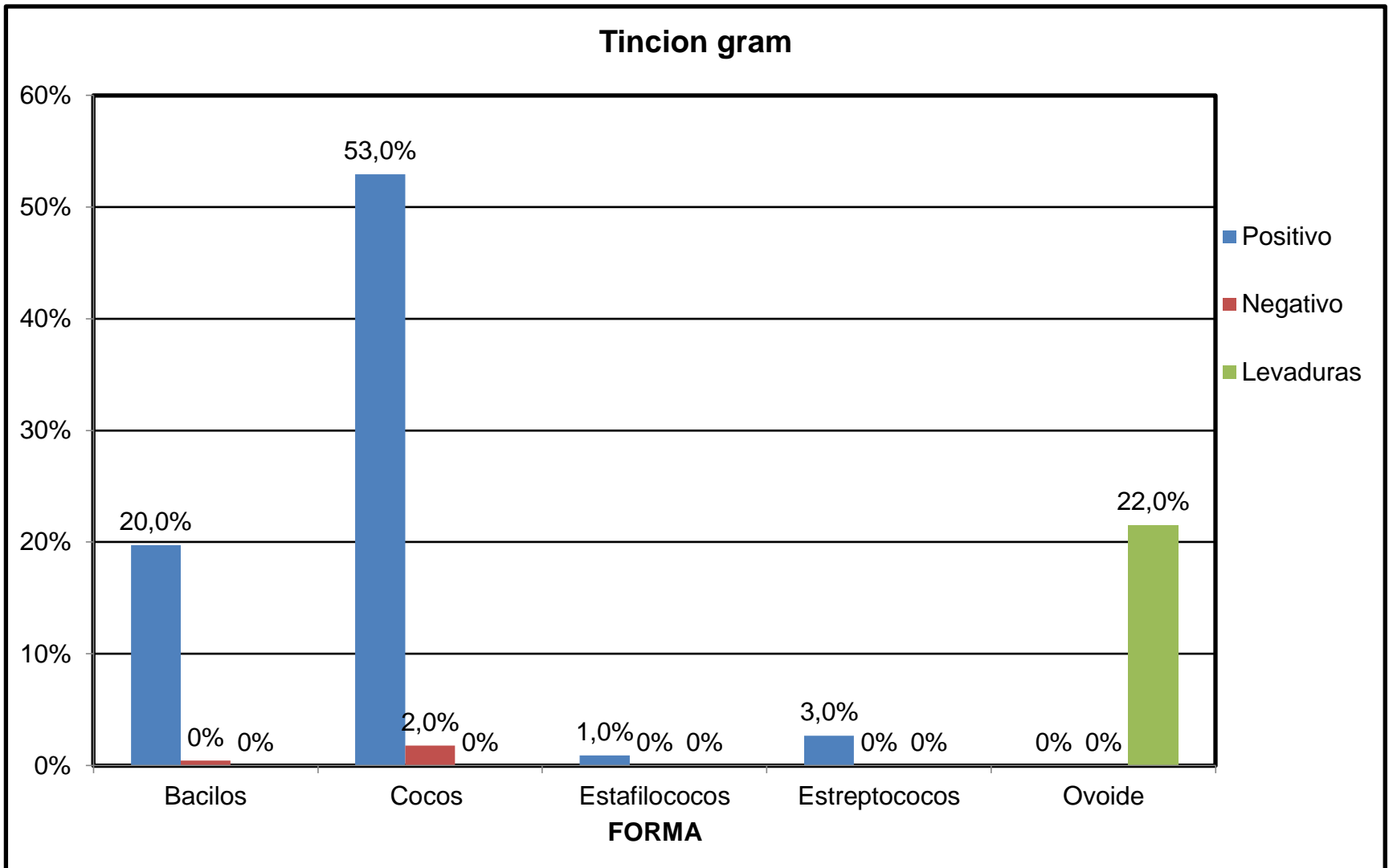
##### 3.1.2. Identificación microscópica

En el anexo 8, se observa tinción Gram compatible con lactobacilos

**Tabla 2. Resultados correspondientes a la identificación microscópica**

Forma	Tinción Gram		Levaduras	Total general
	Negativo	Positivo		
Bacilos	1	44		45
Cocos	4	118		122
Estafilococos		2		2
Estreptococos		6		6
Ovoide			48	48
<b>Total general</b>	<b>5</b>	<b>170</b>	<b>48</b>	<b>223</b>

En la tabla 2 y figura 4 se puede apreciar que un 20% corresponde a la morfología bacilos Gram positivos, posteriormente estas se purificaron y realizaron las pruebas mencionadas más adelante.



**Figura 4. Resultado según porcentaje de la identificación microscópica.**

### **3.1.3. Pruebas de bioquímica diferencial**

#### **1. Pruebas de catalasa y oxidasa**

Se realizaron las pruebas de catalasa y oxidasa a 44 colonias compatibles con la morfología característica, según los criterios descritos en el Manual de Bergey para identificación de *Lactobacillus*. Todas las muestras obtuvieron un resultado negativo.

#### **2. Prueba de movilidad, indol**

Ninguna de las muestras seleccionadas presento movilidad, sulfuro de hidrógeno e indol en medios semisólido Sulfuro Indol Movilidad (SIM) modificado a pH 6,5.

3.2. Evaluación del efecto antagónico de *Lactobacillus spp.* presentes en el 'tocosh'

3.2.1. Resultados correspondientes al efecto antagónico por el método modificado de difusión Burkholder

Tabla 3. Resultados del efecto antagónico de cepas de *Lactobacillus spp.* frente a enteropatógenos por el método de Burkholder

<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Vibrio cholerae</i> 1.457.10 INABA (mm)		<i>Salmonella typhi</i> 2.240-16 (mm)	
	18 h		18 h	
LAB4	10,33	±0,58	9,77	±0,25
LAB7	11,00	±0,00	9,37	±0,32
LAB17	10,00	±0,00	9,43	±0,40
LAB18	10,33	±0,58	10,27	±0,60
LAB19	11,00	±0,00	11,33	±0,58
LAB20	11,83	±0,29	12,23	±0,38
LAB22	10,00	±0,00	9,93	±0,12
LAB30	11,33	±1,15	11,73	±0,25
LAB33	15,83	±0,29	9,00	±0,00
LAB38	12,93	±0,12	9,93	±0,12
LAB42	13,00	±0,00	0,00	±0,00
LAB50	13,00	±0,00	12,00	±0,00
LAB53	12,00	±1,73	9,00	±0,00
LAB76	19,77	±0,25	8,90	±0,17
LAB83	19,20	±0,35	12,13	±0,49
LAB87	10,67	±0,58	8,57	±0,40
LAB92	12,67	±0,58	9,00	±0,00
LAB93	13,87	±0,23	9,00	±0,00
LAB95	11,00	±0,00	10,77	±0,25
LAB99	11,90	±0,17	11,60	±0,40
LAB101	11,87	±0,23	10,67	±0,42
LAB102	11,90	±0,17	8,70	±0,26
LAB110	11,00	±0,00	11,00	±0,00
LAB112	12,90	±0,17	11,00	±1,73
LAB113	11,00	±0,00	9,17	±0,59
LAB119	11,17	±0,29	9,10	±0,26
LAB120	10,20	±0,35	10,40	±0,61
LAB121	9,00	±0,00	9,43	±0,35
LAB122	10,67	±0,58	11,93	±0,12
LAB127	11,13	±0,23	10,93	±0,12
LAB128	11,33	±0,31	12,37	±0,55

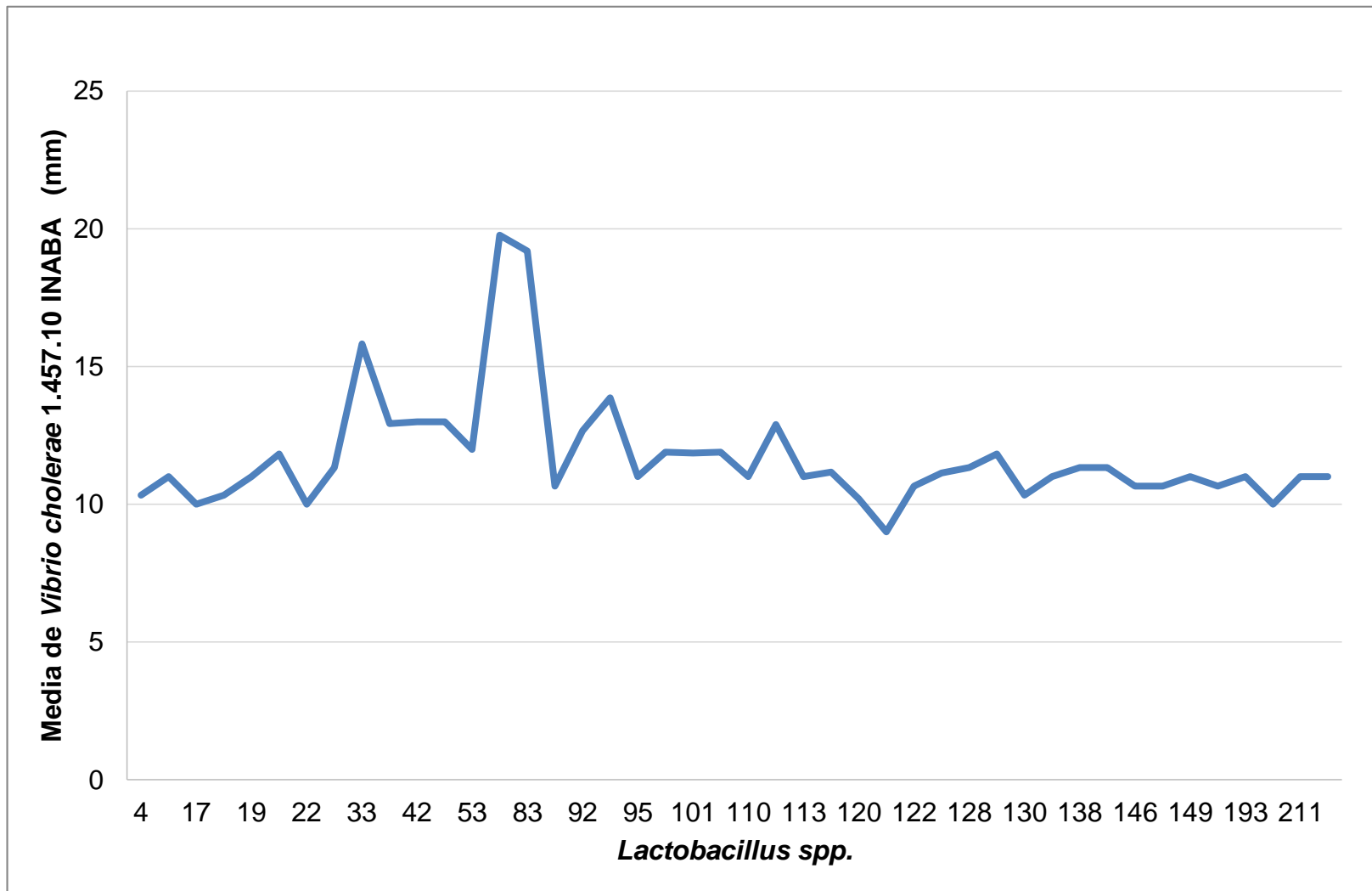
<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	<i>Vibrio cholerae</i> 1.457.10 INABA (mm)		<i>Salmonella typhi</i> 2.240-16 (mm)	
	18 h		18 h	
LAB129	11,83	±0,29	10,43	±0,40
LAB130	10,33	±0,58	10,20	±0,20
LAB137	11,00	±1,73	9,20	±0,20
LAB138	11,33	±1,15	10,00	±0,00
LAB140	11,33	±1,15	10,73	±0,31
LAB146	10,67	±2,31	12,93	±0,12
LAB147	10,67	±2,31	11,93	±0,12
LAB149	11,00	±1,73	9,00	±0,00
LAB184	10,67	±0,58	9,93	±0,12
LAB193	11,00	±0,00	10,00	±0,00
LAB198	10,00	±0,00	10,00	±0,00
LAB211	11,00	±0,00	12,00	±0,00
LAB223	11,00	±0,00	9,00	±0,00

**Leyenda:** Los valores presentados son medias de determinaciones de halos de inhibición por triplicado (n=3); (±) Indica desviaciones estándar de la media. Dentro de la misma columna difieren significativamente (p <0.005) por Prueba de Duncan.

**Nota:** Diámetros de halos de inhibición ≤ 6 mm, indican ausencia del efecto antagónico.

Diámetros de halos de inhibición > 6 mm, indican existencia del efecto antagónico.

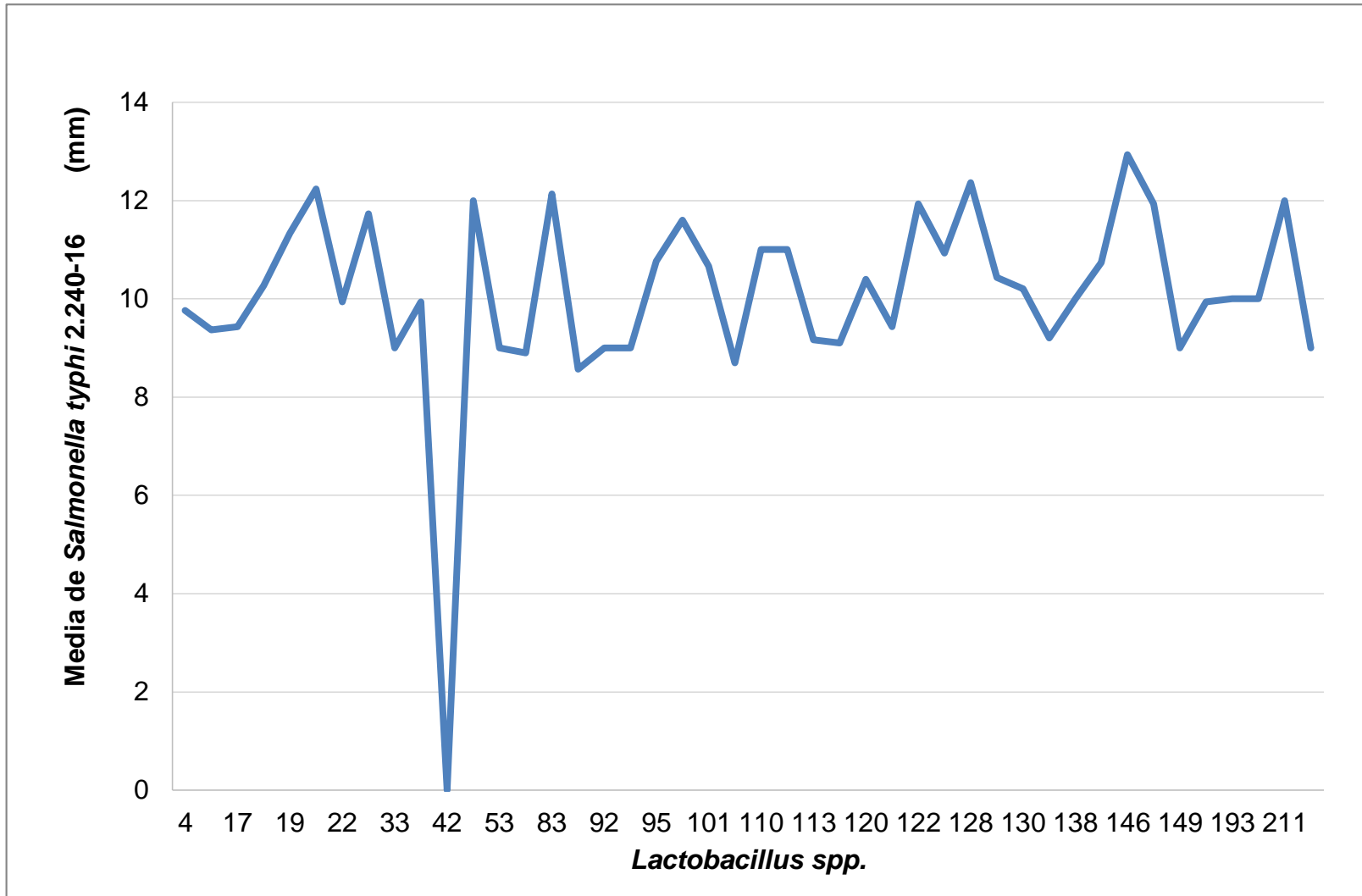
En la evaluación del efecto antagónico por el método de Burkholder de las 44 muestras compatibles con *Lactobacillus spp.*, en la tabla 3 y la figura 5 se aprecia que las muestras que obtuvieron mayor efecto antagónico frente a *Vibrio cholerae* fueron: LAB33 (15,83 mm), LAB76 (19,77 mm) y LAB83 (19,20 mm) mientras que para *Salmonella typhi* el mayor efecto antagónico lo obtuvieron las muestras LAB146 (12,93), LAB20 (12,23 mm), LAB83 (12,13) Y LAB211 (12 mm) tal como se distingue en la figura 6. Con respecto al efecto antagónico producido frente a *Shigella flexneri* y *Escherichia enteropatógena* no se observó la presencia de halos de inhibición.



**Figura 5. Medias de halos de inhibición expresadas en mm, efecto antagónico por método de Burkholder de *Lactobacillus* spp. frente a *Vibrio cholerae* 1.457.10 INABA.**



Figura 6. Medias de halos de inhibición expresados en mm, efecto antagónico por método de Burkholder



de *Lactobacillus* spp. frente a *Salmonella typhi* 2.240-16.

**Tabla 4. Resultados de la comparación del efecto antagónico de *Lactobacillus spp.* aisladas de 'tocosh'-*Solanum sp. in vitro* frente a bacterias enteropatógenas, por el método de Burkholder**

Enteropatógeno	N	zona de inhibición (mm)	
		Media	Desviación estándar
<i>Vibrio cholerae</i> 1.457.10 INABA	44	11,36	1,35
<i>Salmonella typhi</i> 2.240-16	44	9,86	1,83
<i>Shiguella flexneri</i> WHO SH-15.3	44	6,00	0,00
EPEC 2.734-18	44	6,00	0,00
<b>Total</b>	<b>176</b>		

EPEC: *Escherichia coli* enteropatógena.

La tabla 4 y figura 7 muestran una ventaja del efecto antagónico producido por *Lactobacillus spp.* sobre *Vibrio cholerae* obtenido mediante el método de Burkholder (11,36 mm), con una dispersión de 1,35 mm, presentando el mayor efecto. En cuanto al halo de inhibición promedio sobre el *Salmonella typhi* 2.240-16 fue de 9,86 mm; en el caso de *Shiguella flexneri* WHO SH-15.3 y EPEC 2.734-18, el valor promedio es de solo 6 mm, lo cual indica que no hay efecto antagónico.

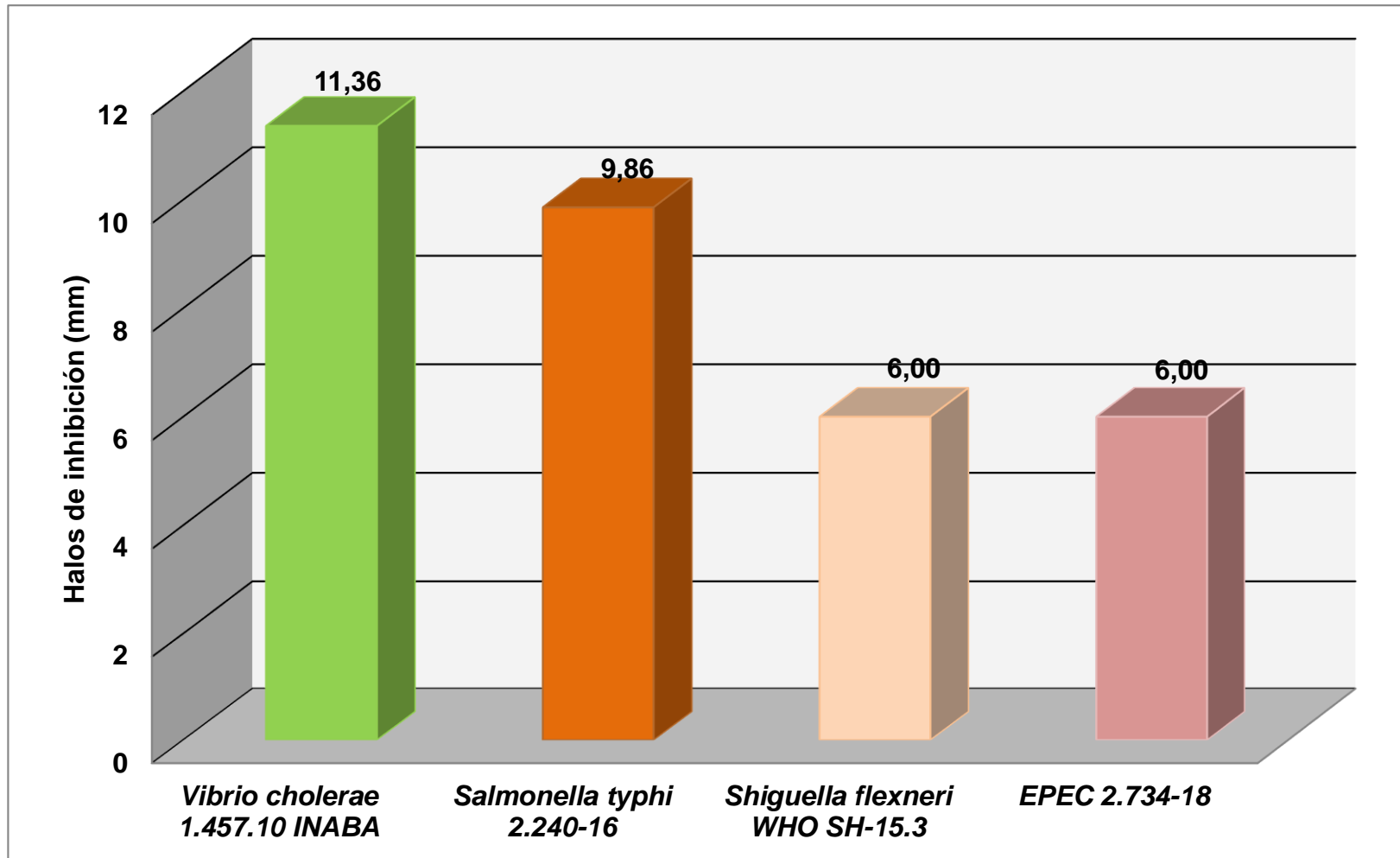


Figura 7. Efecto antagónico que presentan las bacterias del género *Lactobacillus spp.* aisladas de 'tocosh'-*Solanum sp.* frente a bacterias enteropatógenas; por el método de Burkholder, estadística por grupos.

**Tabla 5. Prueba de T de student del efecto antagónico de *Lactobacillus spp.* aisladas de 'tocosh'-*Solanum sp.* *in vitro* frente a bacterias enteropatógenas, por el método de Burkholder; halo de inhibición en mm**

		Prueba T de student						
Método	Valor de prueba = 6							
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias (mm)	95% de intervalo de confianza de la diferencia			
					Inferior	Superior		
<b>Método modificado de difusión Burkholder</b>	<i>Vibrio cholerae</i> 1.457.10 INABA	Halo de inhibición	26.41	43.00	0.000	5,36	4,95	5,77
	<i>Salmonella typhi</i> 2.240-16	Halo de inhibición	14.00	43.00		3,86	3,30	4,41

Para determinar si las diferencias eran estadísticamente significativas se realizó la prueba de T de student con el valor de prueba igual a 6 mm. En la tabla 5, se muestran los resultados de la prueba donde se aprecia que se encontraron diferencias de medias del halo de inhibición promedio de los lactobacilos sobre *Vibrio cholerae* 1.457.10 Inaba (5,36 mm) y *Salmonella typhi* 2.240-16 (3,86 mm) obtenido mediante el método modificado de difusión Burkholder, por lo que se puede concluir que existe un efecto Antagónico ( $p$  valor < 0.005).

**3.2.2. Resultados correspondientes al efecto antagónico por el método modificado de difusión en pozos - Evaluación de producción de metabolitos extracelulares**

**Tabla 6. Resultados del efecto antagónico de cepas de *Lactobacillus spp.* frente a enteropatógenos por el método modificado de difusión en pozos - evaluación de producción de metabolitos extracelulares**

<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Vibrio cholerae</i> 1.457.10 INABA (mm)		<i>Salmonella typhi</i> 2.240-16 (mm)	
	18 h		18 h	
LAB4	15,83	±1,04	11,00	±0,00
LAB7	14,67	±0,58	8,33	±0,58
LAB17	14,00	±1,73	10,33	±0,58
LAB18	14,00	±0,00	10,33	±0,58
LAB19	12,00	±1,00	11,00	±0,00
LAB20	15,00	±1,00	11,33	±0,58
LAB22	15,00	±0,00	11,00	±0,00
LAB30	11,33	±0,58	8,67	±0,58
LAB33	13,33	±0,58	12,00	±0,00
LAB38	12,00	±0,00	11,33	±2,08
LAB42	12,67	±0,58	6,00	±0,00
LAB50	13,00	±1,00	10,33	±0,58
LAB53	13,00	±1,73	9,33	±0,58
LAB76	13,67	±0,58	10,00	±0,00
LAB83	13,67	±0,58	10,00	±0,00
LAB87	13,00	±0,00	12,00	±0,00
LAB92	12,67	±1,15	11,00	±0,00
LAB93	12,67	±1,15	10,00	±0,00
LAB95	12,67	±0,58	12,00	±0,00
LAB99	13,67	±0,58	14,00	±0,00
LAB101	14,67	±0,58	11,00	±0,00
LAB102	13,00	±0,00	10,33	±0,58
LAB110	14,33	±0,58	12,00	±0,00
LAB112	14,33	±0,58	9,67	±1,53
LAB113	13,67	±1,15	11,33	±1,15
LAB119	14,00	±1,00	9,00	±1,73
LAB120	14,33	±0,58	10,83	±0,29
LAB121	15,00	±1,00	11,67	±1,15
LAB122	15,33	±0,58	9,33	±1,53
LAB127	14,00	±0,00	10,93	±0,12
LAB128	14,33	±1,53	11,97	±0,15
LAB129	12,50	±0,50	11,00	±1,00
LAB130	10,93	±0,12	11,17	±0,76
LAB137	11,67	±0,58	10,67	±0,58

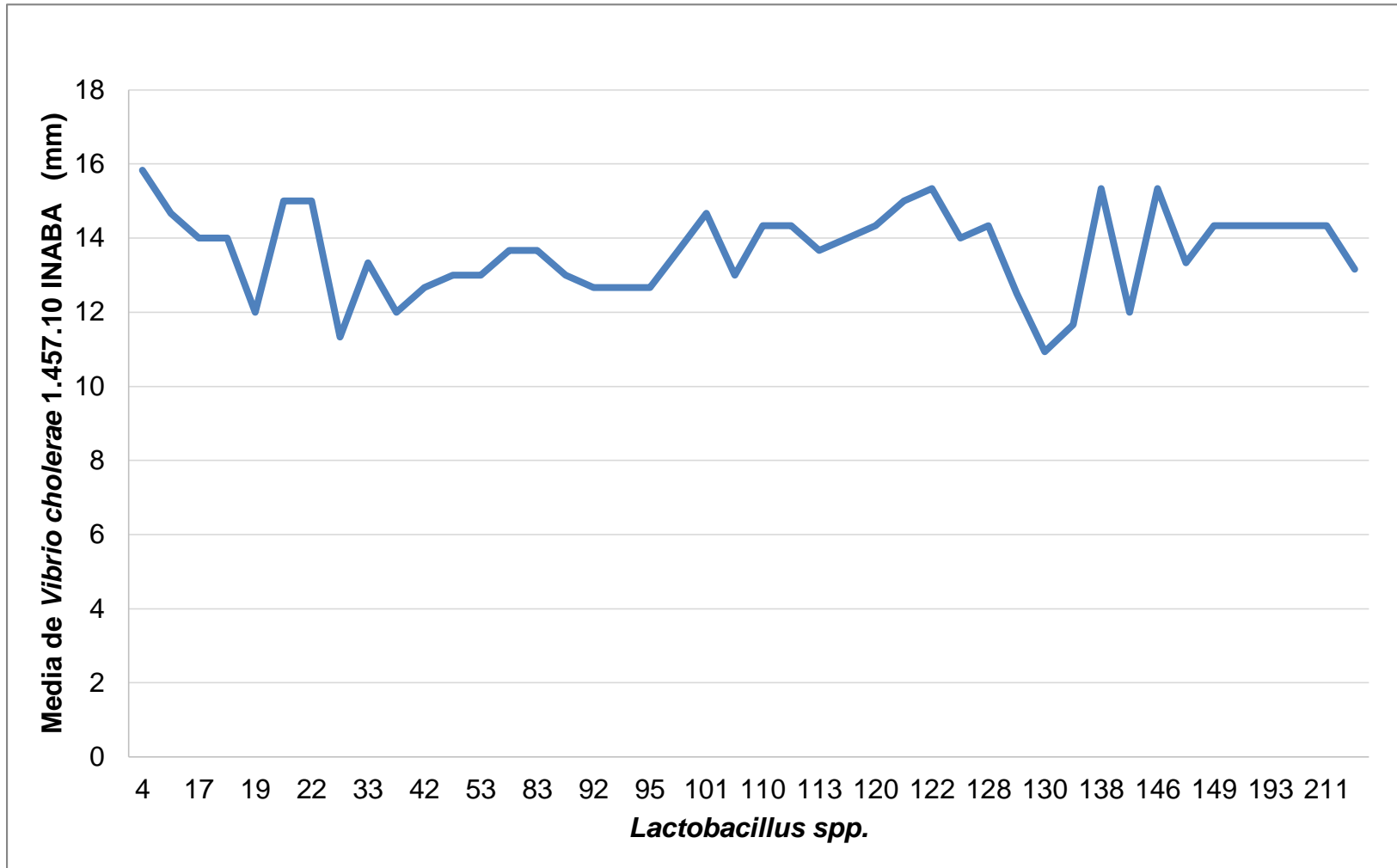
<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Vibrio cholerae</i> 1.457.10 INABA (mm)		<i>Salmonella typhi</i> 2.240-16 (mm)	
	18 h		18 h	
LAB138	15,33	±0,58	10,33	±0,58
LAB140	12,00	±0,00	14,00	±0,00
LAB146	15,33	±0,58	10,33	±0,58
LAB147	13,33	±0,58	8,50	±0,87
LAB149	14,33	±0,58	10,30	±0,61
LAB184	14,33	±0,58	10,67	±0,58
LAB193	14,33	±1,15	11,30	±0,61
LAB198	14,33	±0,58	10,00	±0,00
LAB211	14,33	±0,58	10,67	±0,58
LAB223	13,17	±1,04	11,33	±0,58

**Leyenda:** Los valores presentados corresponden a las medias de determinaciones de halos de inhibición por triplicado (n=3); (±) Indica desviaciones estándar de la media. Dentro de la misma columna difieren significativamente (p <0.005) por Prueba de Duncan.

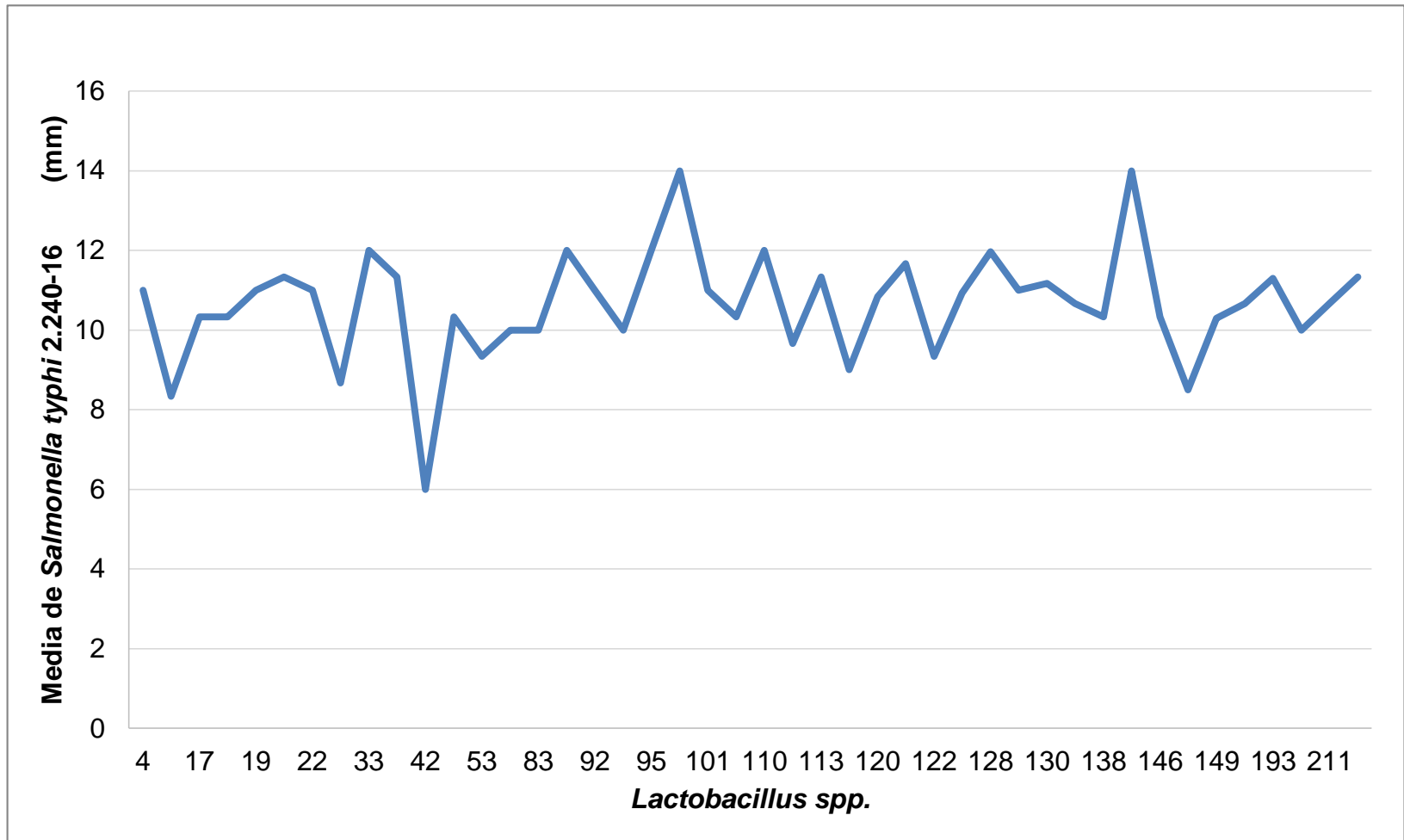
**Nota:** Diámetros de halos de inhibición ≤ 6 mm indica ausencia del efecto antagónico.

Diámetros de halos de inhibición > 6 mm indica existencia del efecto antagónico.

En la tabla 6 y figura 8 se aprecia que las muestras que obtuvieron mayor efecto antagónico frente a *Vibrio cholerae* fueron: LAB4 (15,83 mm), LAB138 (15,33 mm) y LAB146 (15,33 mm) mientras que para *Salmonella typhi* el mayor efecto antagónico lo obtuvieron las muestras LAB20 (12,23 mm), LAB83 (12,13), LAB140 (14,00 mm) y LAB211 (12 mm) tal como se observa en la figura 9. Con respecto al efecto antagónico producido frente a *Shigella flexneri* y *Escherichia enteropatogena* no se observó la presencia de halos de inhibición.



**Figura 8. Medias de halos de inhibición expresados en mm, efecto antagónico por método modificado de difusión en pozos - evaluación de producción de metabolitos extracelulares de *Lactobacillus spp.* frente a *Vibrio cholerae* 1.457.10 Inaba.**



**Figura 9. Medias de halos de inhibición expresados en mm, efecto antagónico por el método de Burkholder de *Lactobacillus* spp. frente a *Salmonella typhi* 2.240-16.**

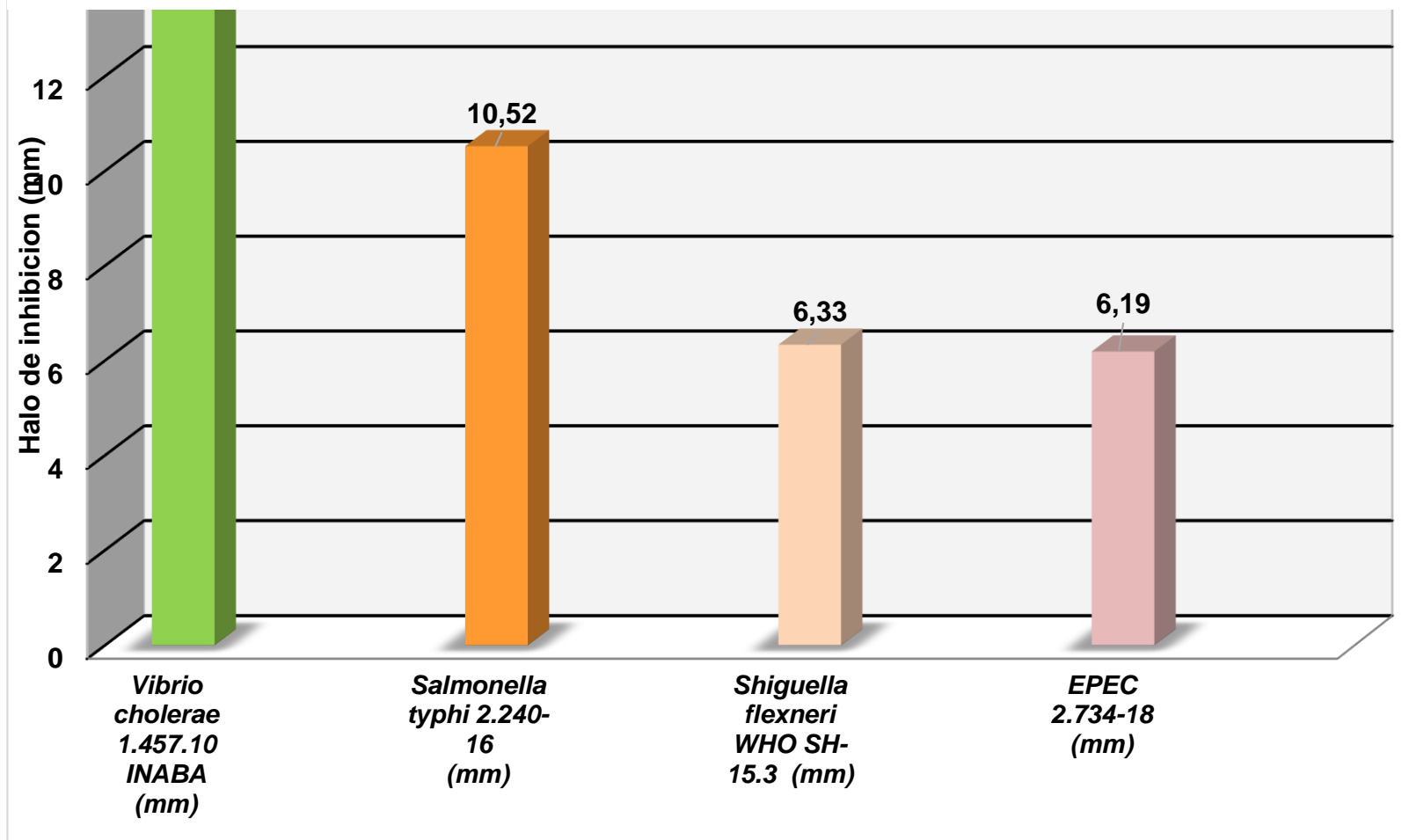


**Tabla 7. Resultados de la comparación del efecto antagónico de *Lactobacillus spp.* aisladas de ‘tocosh’-*Solanum sp. in vitro* frente a bacterias enteropatógenas, método del sobrenadante**

<b>Enteropatógeno</b>	<b>N</b>	<b>Media (mm)</b>	<b>Desviación estándar (mm)</b>
<i>Vibrio cholerae</i> 1.457.10 INABA	44	13,62	1,15
<i>Salmonella typhi</i> 2.240-16	44	10,52	1,37
<i>Shiguella flexneri</i> WHO SH-15.3	44	6,33	0,55
EPEC 2.734-18	44	6,19	0,41
Total	176		

La tabla 7 y figura 10 muestran una ventaja del efecto antagónico producido por *Lactobacillus spp.* sobre *Vibrio cholerae* obtenido mediante la evaluación de metabolitos extracelulares (13,62 mm), con una dispersión de 1,15 mm, presentando el mayor efecto. En el caso de *Shiguella flexneri* WHO SH-15.3 y EPEC 2.734-18, el valor promedio es de 6,19 mm a 6,33 mm; se observó un ligero halo de inhibición lo cual no es significativo.

Figura 11. Comparación del efecto antagónico de bacterias del género *Lactobacillus spp.* aisladas de 'tocosh'-*Solanum sp.* *in vitro*, frente a bacterias enteropatógenas, método del sobrenadante



**Tabla 8. Prueba de T de student del efecto antagónico de *Lactobacillus spp.* aisladas de 'tocosh'-*Solanum sp.* *in vitro* frente a bacterias enteropatógenas, por método del sobrenadante**

Prueba T de student								
Método		Valor de prueba = 6						
		t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias (mm)	95% de intervalo de confianza de la diferencia		
						Inferior	Superior	
<b>Método Sobrenadante libre de células</b>	<i>Vibrio cholerae</i> 1.457.10 INABA	Halo de inhibición	44.02	43.00	0.000	7,62	7,28	7,97
	<i>Salmonella typhi</i> 2.240-16	Halo de inhibición	21.89	43.00		4,52	4,11	4,94

Halo de inhibición esta expresado en milímetros (mm).

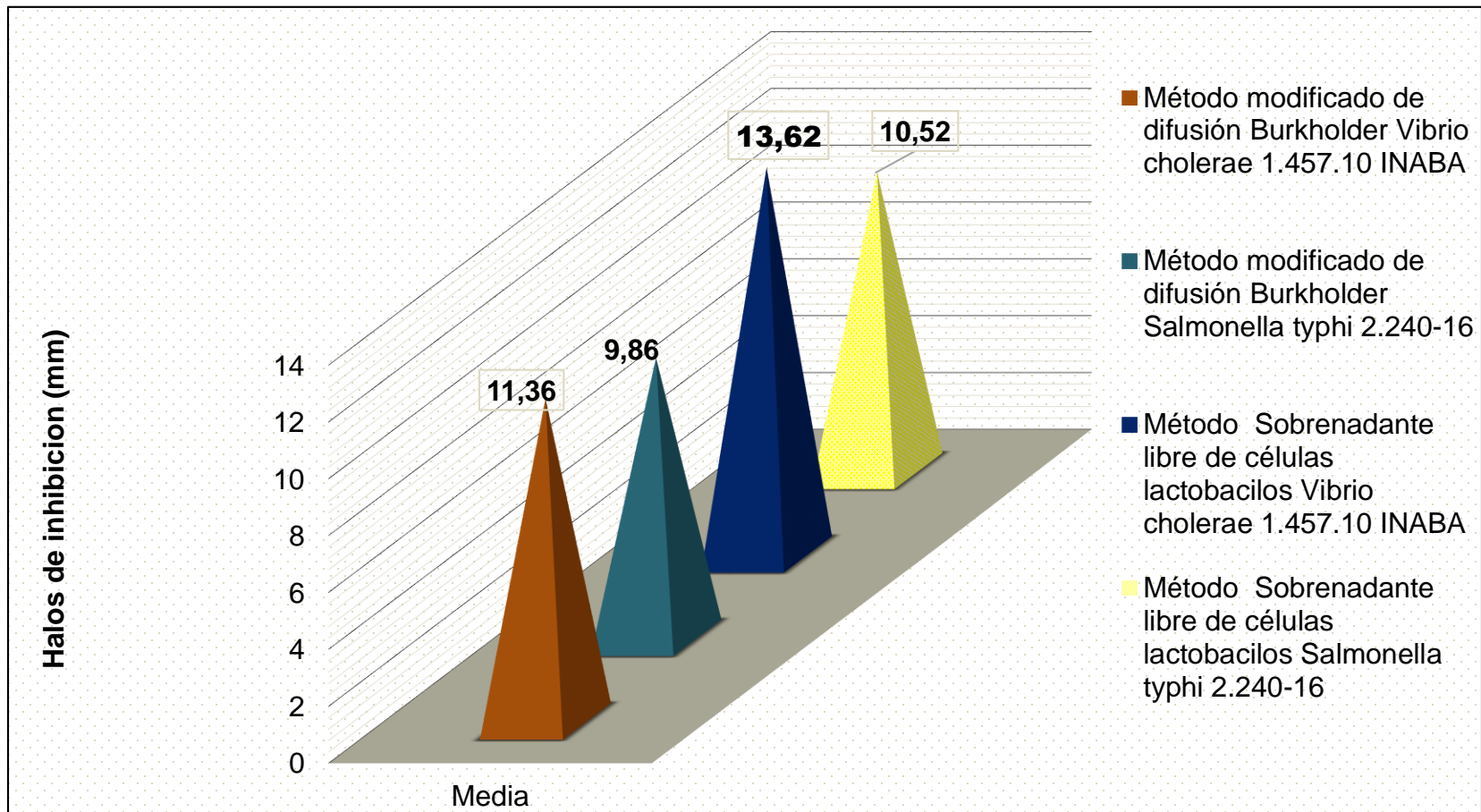
Para determinar si las diferencias eran estadísticamente significativas se realizó la prueba de T de student con el valor de prueba igual a 6 mm. En la tabla 8, se muestran los resultados de la prueba donde se aprecia que se encontraron diferencias de medias del halo de inhibición promedio de los lactobacilos sobre *Vibrio cholerae* 1.457.10 Inaba (7,62 mm) y *Salmonella typhi* 2.240-16 (4,52 mm) obtenido mediante el método modificado de difusión Burkholder, por lo que se puede concluir que existe un efecto Antagónico (p valor < 0.005).

**3.2.3. Evaluación del efecto antagónico producido por *Lactobacillus spp.* frente a bacterias enteropatógenas, comparación de métodos**

**Tabla 9. Prueba de *t* de *student* del efecto antagónico producido por *Lactobacillus spp.* aisladas de ‘tocosh’-*Solanum sp.* comparación del método modificado de difusión Burkholder y el método del sobrenadante libre de células**

Método	Prueba T de student				
	N	Media (mm)	t	gl	p
Método modificado de difusión Burkholder	88	10,61	-5.155	174	0.000
Método Sobrenadante libre de células	88	12,07	-5.155	171.271	
<b>Total</b>	<b>176</b>				

Para determinar si las diferencias eran estadísticamente significativas se realizó la prueba T de student descrito en la tabla 09 donde se muestra que la media de halos de inhibición por el método sobrenadante libre de células es mayor (12,07 mm) a comparación del método de difusión de Burkholder (10,61 mm), además se encontraron diferencias altamente significativas (p valor<0.005), con un nivel de confianza del 95%; por lo que se puede concluir que existe mayor inhibición del método sobrenadante libre de células que los mismos Lactobacilos sobre los enteropatógenos.



En la figura 11. Se muestra el resultado de la comparación de medias entre los dos métodos empleados así mismo, se analiza en comportamiento de Lactobacilos frente a cada una de las bacterias enteropatógenas ensayadas. Por lo que se demuestra que las BAL presentan mayor actividad frente a *Vibrio cholerae* (13,62 mm) por el método del sobrenadante libre de células a comparación con el método de Burkholder (11,36 mm).

## IV. DISCUSIÓN

### 4.1. Discusiones

Los probióticos actualmente se están convirtiendo en un coadyuvante en los tratamientos para solucionar uno de los problemas que afronta la salud pública, las EDAS. Por esta razón este estudio permite conocer una de las propiedades principales de estos probióticos (Lactobacilos aislados de 'tocosh') presentes en un alimento tradicional de nuestra serranía peruana.  
(50)

En tal sentido se ha evaluado el efecto antagónico que tienen los lactobacilos aislados a partir del 'tocosh', producido en el departamento de Huánuco. Se logró aislar 44 (20%) colonias compatibles con *Lactobacillus spp.* (Tabla 2) de un total de 223 aislamientos a partir del 'tocosh'; similar a lo reportado por la European comisión donde aislaron 23 colonias (12%) de un total de 152, de las cuales el 55% de ellas presentaron morfología bacilar y 45% eran cocos, sin embargo, nosotros obtuvimos un 20% de colonias correspondiente a morfología bacilar y 53% cocos (figura 4) debido a que, la población era mayor y además se encontraron otros tipos de morfologías.<sup>(12)</sup>

El ensayo de antagonismo se realizó por dos métodos para analizar el comportamiento de las bacterias lácticas frente a las patógenas. Al realizar los ensayos por el método de Burkholder (tabla 3), se observó que tres muestras presentaron picos altos de inhibición desde 15,83 a 19,77 mm frente a *Vibrio cholerae* mientras que para *Salmonella typhi* fueron cuatro muestras con mayores halos de inhibición los cuales se encontraron en el rango de 12 a 12,93 mm (figura 5 y 6) este método permite evaluar la interacción *in situ* entre los dos géneros. En el estudio se demuestra que el antagonismo se efectuó de manera diferente para cada uno de los patógenos en la tabla 4, *Vibrio cholerae* Inaba, presentó mayor efecto inhibitorio (11,36 mm) en comparación con las otras bacterias enteropatógenas a una

densidad celular de  $10^8$  células/mL. Bamidele T., obtuvo resultados similares con una densidad celular de  $35 \times 10^6$  bacterias/mL de *V. cholerae* 01 OGAWA el halo que resultó fue de 11,5 mm, lo que permite establecer que el método empleado refleja las condiciones adecuadas para comprobar la susceptibilidad de dicha bacteria.<sup>(39)</sup>

La cepa *Vibrio cholerae* serotipo Inaba con la cual se enfrentó, es sensible a antibióticos como sulfonamidas, quinolonas, nitro derivados, tetraciclinas y antibióticos peptídicos según las pruebas de sensibilidad realizadas en el Instituto Nacional de Salud, lo cual indica que proporcionaría bajas barreras de resistencia para que cepas de lactobacilos puedan inhibir su crecimiento, otro factor coadyuvante es que esta bacteria crece en ambientes alcalinos y no tolera valores de pH por debajo de ocho que son producidas por los metabolitos secundarios de Lactobacilos, disminuyendo así su viabilidad.<sup>(26)</sup>

El efecto antagónico frente a *Salmonella typhi*, una de las especies patógenas para el ser humano fue similar al de *Vibrio* pese a que compiten por el mismo nutriente (glucosa), el halo de inhibición promedio de 9,86 mm (tabla 4.), refleja que las BAL presentarían otros mecanismos de inhibición. Tejero et al., obtuvieron halos de inhibición entre 11 a 17 mm cuando enfrentaron a *Salmonella typhimurium* mediante el método de mancha de agar (método Burkholder), mientras que Jurado Gámez et. al., cuando comprobaron la actividad hallaron resultados menores a 2 mm frente al mismo patógeno, ello confirma que el efecto es diferente de acuerdo a la especie bacteriana, incluso del mismo género.<sup>(51,52)</sup> La existencia del efecto antagónico para ambas bacterias es demostrada en los valores de la T de student (tabla 5) 26.4 y 14.0 para *Vibrio* y *salmonella* respectivamente conduce a valores con diferencias estadísticamente significativos con un p valor < 0.005.

Los efectos mencionados anteriormente producidos por lactobacilos pueden deberse a la alteración del ecosistema en el que intervienen distintos factores

tales como: competencia por nutrientes, inhibición por diferencias de pH, producción de sustancias antibacterianas, peróxido de hidrógeno y ácido láctico; sin embargo, la acción del ácido láctico frente a bacterias Gram negativas aún no ha sido aclarada y se cree que tiene acción permeabilizante en la membrana externa de estas.

También fue importante evaluar la actividad de los metabolitos extracelulares de lactobacilos. En la tabla 6 y figura 8, se muestra alta actividad de los metabolitos extracelulares frente a *Vibrio cholerae* con halos de inhibición promedio de 13,62 mm (tabla 7); Lin T-H y Pan T-M, mostraron en sus análisis, halos de inhibición de 8 a 9 mm a una densidad celular de  $10^9$  células/mL de *Vibrio parahaemolyticus* con lecturas a las 24 horas, a comparación del presente estudio cuya densidad celular fue  $10^8$  células/mL y el tiempo de lectura según el CSLI fue a las 18 horas. Sin embargo, hubo limitaciones ya que no se comprobó si la acción es producida por efecto del descenso del pH u otras moléculas proteicas como bacteriocinas, las que podrían estar favoreciendo este fenómeno. <sup>(35)</sup>

Otro resultado observado fue la inhibición de las BAL frente a *Salmonella typhi* cuya media fue de 10,52 mm, como se muestra en la tabla 7 y figura 9. Tales resultados fueron semejantes a los encontrados por Gandevia *et. al.* y Tejero *et. al.* con el mismo método obtuvieron halos de inhibición menores a ocho mm <sup>(25,51)</sup>, en otro estudio evaluaron la actividad antagónica de bacteriocinas producidas por lactobacilos en interacción con *Salmonella typhi* con resultados negativos menores a seis mm. <sup>(36,39)</sup> La prueba T de Student (tabla 8) demostró que existieron diferencias significativas en los halos de inhibición para estos enteropatógenos por medio del método del sobrenadante.

Algunos estudios han encontrado cadenas de péptidos correspondientes a Gly-Tyr, Val-Tyr-Val, Met y Leu, parte de la secuencia de aminoácidos de bacteriocinas entre los componentes presentes en el CFS. <sup>(52)</sup> Se ha estudiado que la interacción electrostática de estos péptidos con sus dianas



biológicas (lípidos aniónicos), permiten que las BAL puedan formar poros e ingresar a la célula patógena disminuyendo el pH intracelular y provocando con esto fuga de fosfatos inorgánicos, desequilibrio iónico y pérdida de componentes principales como ARN y ADN. Si bien es cierto que la interacción hidrofílica de las BAL con la membrana plasmática de bacterias enteropatógenas no requiere necesariamente de receptores, podrían algunas de ellas haber adoptado mecanismos de eludir esta acción, es por ello que no se observa ningún efecto de las BAL frente a *Escherichia coli* enteropatógena, ni *Shiguella flexneri* cuyo perfil de sensibilidad es resistente a penicilinas y cefalosporinas de tercera generación; Chen *et. al.* informaron que solo cinco cepas de un total de 35 aislados tuvieron actividad antagonista frente a *Escherichia coli* resistente a carbapenémicos con zonas de inhibición mayores a 20 mm, así mismo en la interacción con cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, se observa también pequeños halos de inhibición por el método del sobrenadante. <sup>(53,54)</sup>

Cuando se realizó la comparación por ambos métodos se observaron diferencias significativas con la prueba *t* de Student para muestras independientes con un *p* valor < 0.05, tal como se describe en la tabla 9. Se determinó una diferencia de medias de 12,07 mm sobre el método del sobrenadante (figura 11), esto confirmaría que la presencia de los metabolitos extracelulares sea más potente para inhibir el crecimiento de enteropatógenos que la misma interacción *in situ*, ello se explica debido a que el volumen empleado para la extracción de sus metabolitos sea mayor a que las propias colonias se enfrenten en sí.

La ausencia de antagonismo frente a EPEC y *Shiguella flexneri* observados en los ensayos podrían ser las cantidades insuficientes de peróxido de hidrogeno formado para inhibir su crecimiento durante la difusión del agar así mismo, la dosis bajas de Lactobacilos empleadas sean insuficientes para llegar a antagonizarlos y liberar mayor cantidad de exopolisacaridos y biofilm.

(55)

En resumen, estos probióticos pueden prevenir y ayudar a contrarrestar infecciones intestinales causadas por bacterias enteropatógenas de forma tal que, esta investigación proporciona datos clínicos sobre uno de sus principales beneficios frente a un problema de salud. En consecuencia, no solo proporciona información indispensable para alguna formulación farmacológica sino también puede promover su comercialización en mayor producción este alimento fermentado y motivar así su consumo en su forma natural.

#### 4.2. Conclusiones

- Se evaluó el efecto antagónico *in vitro* de 44 cepas de *Lactobacillus spp.* aisladas de 'tocosh'-*Solanum sp* proveniente de Huánuco por el método Burkholder, evidenciándose el antagonismo frente a *Vibrio cholerae* 1.457.10 serotipo Inaba y *Salmonella typhi* y ausencia de antagonismo frente a *Shiguella flexneri* WHO SH-15.3 y *Escherichia coli* enteropatógena.
- Se evaluó el efecto antagónico *in vitro* de los metabolitos extracelulares de 44 cepas de *Lactobacillus spp.* aisladas de 'tocosh'-*Solanum sp* proveniente de Huánuco por el método del sobrenadante libre de células, evidenciándose antagonismo frente a *Vibrio cholerae* 1.457.10 serotipo Inaba y *Salmonella typhi*; ausencia de antagonismo frente a *Shiguella flexneri* WHO SH-15.3 y *Escherichia coli* enteropatógena.
- Se determinó que existen diferencias significativas *in vitro* entre el efecto antagónico probado el método de Burkholder frente a *Vibrio cholerae* 1.457.10 serotipo Inaba y *Salmonella typhi* (evidenciado por la diferencia de medias igual a 10,61 mm) en comparación con el método sobrenadante libre de células (CFS) probado frente a *Vibrio cholerae* Inaba y *Salmonella typhi* (evidenciado por la diferencia de medias igual a 12,07 mm).

#### 4.3. Recomendaciones

- Se recomienda analizar el efecto antagónico que presentan las bacterias del género *Lactobacillus spp.* aisladas de 'tocosh'-*Solanum sp. in vitro*, frente a otras bacterias enteropatógenas que presenten diferentes perfiles de sensibilidad.
- Se sugiere realizar el secuenciamiento del gen 16s ADNr para identificar las especies de Lactobacilos aislados de 'tocosh', que presentan esta actividad antagónica frente a enteropatógenos.
- Se sugiere también evaluar el efecto antagónico de bacteriocinas, provenientes de *Lactobacillus spp.* aisladas de 'tocosh' frente a bacterias enteropatógenas.

## CITAS Y REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. OMS. Enfermedades diarreicas. [Internet]. Ginebra. 2017 [citado el 20 de febrero de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>
2. Kotloff KL. The Burden and Etiology of Diarrheal Illness in Developing Countries. *Pediatric Clinics of North América*. [Internet]. USA. 2017; 64(4):799-814. [citado el 21 de febrero de 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2017.03.006>
3. Riveros M, Ochoa TJ. Enteropatógenos de importancia en salud pública. *Rev Perú Med Exp Salud Pública* [Internet]. 2 de abril de 2015 [citado el 2 de febrero de 2019]; 32 (1):157. Disponible en: <https://rpmesp.ins.gob.pe/index.php/rpmesp/article/view/1588/1566>
4. L. Ordoñez. Situación epidemiológica de las enfermedades diarreicas agudas (EDA) en el Perú, SE 43 – 2017; Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades – MINSA. Perú; 26 (43): 1408-1409
5. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2016 [Internet]. European Centre for Disease Prevention and Control. 2017 [citado el 15 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2016>
6. OMS. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Organización Mundial de la Salud. [Internet]. Ginebra. 2017 [citado el 21 de febrero de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>

7. Lucas M, Arnold A, Sommerfield A, Trevenen M, Braconnier L, Schilling A, et al. Antibiotic Allergy Labels in Children Are Associated with Adverse Clinical Outcomes. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* [Internet]. Australia. Marzo de 2019 [citado el 21 de junio de 2019];7(3):975-82. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2018.09.003>
8. Waldman R, Whitaker-Worth D, Grant-Kels JM. Cutaneous adverse drug reactions: Kids are not just little people. *Clinics in Dermatology*. Noviembre de 2017;35(6):566-82. Doi: 10.1016/j.clindermatol.2017.08.00
9. Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2017 [citado el 22 de junio de 2019];14(8):491–502. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
10. Di Cerbo A, Palmieri B, Aponte M, Morales-Medina JC, Iannitti T. Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli. [Internet]. *J Clin Pathol*. Italia. Marzo de 2016 [citado el 21 de junio de 2019]; 69(3):187-203. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1136/jclinpath-2015-202976>
11. Penha RA, Diaz SJ, Fernando FS, Chang YF, Andreatti RL, Berchieri Junior A. Immunomodulatory activity and control of *Salmonella* Enteritidis colonization in the intestinal tract of chickens by *Lactobacillus* based probiotic. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015 [citado el 20 de junio de 2019]; 167(1-2):64–9. Disponible en : <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.06.006>
12. Periodic Report. Summary of the final report -  $\mu$ -ANDES (Microbiota of Andean food: tradition for healthy products). European Commission [Internet]. 2014 [citado el 20 de junio de 2019] Report Summary Project reference: 247650

Funded under: FP7-PEOPLE. Disponible en:  
[https://cordis.europa.eu/result/rcn/169089\\_en.html](https://cordis.europa.eu/result/rcn/169089_en.html)

13. De Haan S, Rodriguez F. Chapter 1 - Potato Origin and Production. In: Singh J, Kaur L, editors. *Advances in Potato Chemistry and Technology (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2016 [citado el 20 de junio de 2019]. p. 1–32. Doi.org/10.1016/B978-0-12-800002-1.00001-7
14. Cristóbal R, Dioses B. Actividad antibacteriana y potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de chuño y tocosh de diferentes regiones del Perú. *Antibact Act Probiotic Potential Lact Acid Bact Isol From Chuño Tocosh Differ Reg Perú* [Internet]. 2016 [citado el 23 de junio de 2019]; 23: S150–1. Disponible en:  
<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=121239232&lang=es&site=ehost-live>
15. Tapia ME, Fries AM. *Guía de campo de los cultivos andinos*. FAO; Anpe-Perú. 2007. 221 p
16. Rosales HA. *Determinación de las características Físico Químicas y Evaluación de la Actividad Antimicrobiana del Tocosh de Maíz (Zea mays)* [Tesis Magister]. Lima: Universidad Nacional Agraria la Molina;1995
17. Ñaupari G, Arias G, Amarillo A. Estudio químico bromatológico y de la actividad antimicrobiana del tocosh. *Boletín de la Sociedad Química del Perú*.1993;59(2):87-92
18. Ramesh C. Ray, Didier Montet .*Microorganisms and fermentation of traditional foods*.International Center for Agricultural Research for Development. France. First edition.2015.

19. FAO/OMS. Informe de la Consulta de expertos sobre evaluación de las propiedades saludables y nutricionales de los probióticos en los alimentos. Roma.2016; 52. ISBN92-5-305513-8
20. Hammes WP, Hertel C. Lactobacillus. En: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria [Internet]. American Cancer Society; 2015 [citado el 20 junio de 2019]. p. 1-76. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118960608.gbm00604>
21. Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1 de Diciembre de 2008; 72(4):728-64.
22. Carmo MS, Santos C, Araújo MC, Girón JA, Fernandes ES, Monteiro-Neto V. Probiotics, mechanisms of action, and clinical perspectives for diarrhea management in children. *Food Funct. Brasil*. [Internet]. 2018 [citado el 22 de junio de 2019]; 9(10):5074-95. Disponible en: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/fo/c8fo00376a#!divAbstract>
23. Salvetti E, Torriani S, Felis GE. The Genus Lactobacillus: A Taxonomic Update. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2012; 4(4):217–26. DOI 10.1007/s12602-012-9117-8
24. Riley M. Molecular Mechanisms of Bacteriocin Evolution. *Annu. Rev. Genética*. 1998; [citado el 24 de setiembre de 2015]; 32: 255-78. Disponible en: <http://www.bio.umass.edu/biology/riley/sites/www.bio.umass.edu/biology.riley/files/1998c%20Molecular%20Mechanisms%20of%20Bacteriocin%20Evolution.pdf>
25. Gandevia HA, Rana ND, Desai BA. Screening, Production and Antibacterial Activity of Bacteriocin from Lactobacillus spp. *BMR Microbiology* [Internet]. 2017 Mar 15 [citado el 9 de Junio de 2019]; 3(1). Disponible en:

<http://advancejournals.org/bmr-microbiology/article/screening-production-and-antibacterial-activity-of-bacteriocin-from-lactobacillus-spp/>

26. Patrick Murray, Ken Rosenthal Michael Pfaller. Microbiología médica [Internet]. 8a edición. Vol. 1. España: Elsevier Inc.; 2017 [citado el 23 de junio de 2019]. 848 p. Disponible en: <https://www.elsevier.com/books/microbiologia-medica/murray/978-84-9113-076-5>
27. Gómez-Duarte OG. Acute diarrheal disease caused by enteropathogenic *Escherichia coli* in Colombia. Rev Chilena Infectol. [Internet]. Octubre de 2014. [citado el 25 de junio de 2019]; 31(5):577-86. Doi: 10.4067/S0716-10182014000500010. PubMed PMID: 25491457; PubMed Central PMCID: PMC4469391.
28. Santos FF, Richardson EJ, Bryant JA, Yamamoto D, Elias WP, Gomes TAT, et al. Draft Whole-Genome Sequences of 10 Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated in Brazil. Stewart FJ, editor. Microbiol Res Announc. [Internet]. 2018 [citado el 25 de junio de 2019]; 7(22): e01432-18. Doi: 10.1128/MRA.01432-18.
29. Farfán-García Ana, Ariza-Rojas Sandra, Vargas-Cárdenas Fabiola, Vargas-Remolina Lizeth. Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. Rev. chil. infectol. [Internet]. 2016 Ago [citado el 22 de junio de 2019]; 33(4):438-450. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182016000400009>.
30. K. Carroll; S. Morse; T. Mietzner; S. Miller. Jawetz Melnick Adelberg Microbiología Médica. Mcgraw Hill. Mcgraw-hill Interamericana Editores, S.A. de C.V; 2017. p. 852. ISBN 978-607-15-1370-0
31. Ferrari ML, Malardé V, Grassart A, Salavessa L, Nigro G, Descorps-Declere S, et al. Shigella promueve la alteración importante de la fisiología epitelial intestinal y la invasión tisular mediante el cierre del transporte intracelular del huésped. Proc Natl Acad Sci USA. [Internet]. 2019 [citado el 22 de junio de 2019];



201902922.

Disponible

en:

<https://www.pnas.org/content/early/2019/06/13/1902922116.long>

32. Silva C, Betancor L, García C, Astocondor L, Hinojosa N, Bisio J, et al. Characterization of Salmonella enterica isolates causing bacteremia in Lima, Peru, using multiple typing methods. PLoS One. 21 de diciembre de 2017 [citado el 22 de junio de 2019]; 12(12): e0189946-e0189946. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29267322>
33. Rasti ES, Brown AC. Cholera Toxin Encapsulated within Several Vibrio cholerae O1 Serotype Inaba Outer Membrane Vesicles Lacks a Functional B-Subunit. Toxins (Basel). 6 de abril de 2019 [citado el 22 de junio de 2019]; 11(4):207. Doi: 10.3390/toxins11040207
34. Gavilán-Chávez Ronnie, Martínez-Urtaza Jaime. Factores ambientales vinculados con la aparición y dispersión de las epidemias de Vibrio en América del Sur. Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública. 2011; 28(1):109-115. ISSN 1726-4634
35. Lin T-H, Pan T-M. Characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus plantarum* NTU 102. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 2019 Jun 1; 52(3):409–17. doi.org/10.1016/j.jmii.2017.08.003
36. Jiménez E, Yépez A, Pérez-Cataluña A, Ramos Vásquez E, Zúñiga Dávila D, Vignolo G, et al. Exploring diversity and biotechnological potential of lactic acid bacteria from tocosh - traditional Peruvian fermented potatoes - by high throughput sequencing (HTS) and culturing. LWT - Food Sci Technol [Internet]. Elsevier Ltd; 2018 [citado el 22 Junio 2019]; 87:567–74. Disponible en: doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.033
37. Yépez A, Luz C, Meca G, Vignolo G, Mañes J, Aznar R. Biopreservation potential of lactic acid bacteria from Andean fermented food of vegetal origin. Food Control. 2017; 78:393–400. DOI.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.009

38. Sánchez L, Omura M, Lucas A, Pérez T, Llanes M, Ferreira C de L. Cepas de *Lactobacillus spp.* con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos. Cuba.2015; 37(2):11. ISSN: 2224-4700
39. Bamidele TA, Adeniyi BA, Ayeni FA, Akinsinde KA. Identification, antagonistic activities against *Vibrio cholerae* 01 of lactic acid bacteria isolated from Nigerian grown salad vegetables [Internet]. Vol. 3. Nigeria: International Journal of Pharmaceutical Research And Bio-Science; 2014 [citado el 07 de enero de 2019]. 56–65 p. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/265377934\\_Identification\\_antagonistic\\_activities\\_against\\_Vibrio\\_cholerae\\_01\\_of\\_lactic\\_acid\\_bacteria\\_isolated\\_from\\_Nigerian\\_grown\\_salad\\_vegetables](https://www.researchgate.net/publication/265377934_Identification_antagonistic_activities_against_Vibrio_cholerae_01_of_lactic_acid_bacteria_isolated_from_Nigerian_grown_salad_vegetables)
40. Avila Carmen, Nori. Efecto inhibitorio de *Lactobacillus sp.* sobre el crecimiento de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, [Tesis de grado] Piura, Perú, 2018. Universidad Nacional de Piura / UNP [Internet]. 2019 [citado el 18 de enero 2020]; Disponible en: <http://repositorio.unp.edu.pe/handle/UNP/1956>
41. Enciso Ylla, S. Actividad antibacteriana del extracto de *Solanum tuberosum* “TOCOSH” y clorhexidina al 0.12% sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 in vitro [Tesis de grado]. Universidad Nacional Federico Villarreal [Internet]. 2019 [citado el 28 de Enero 2020]; Disponible en: <http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/3949>
42. Nina Flores Yulitza-J. Estudio in Vitro del Efecto Antibacteriano de un Queso Artesanal con Cepas Probióticas: *Saccharomyces Boulardii*, *Lactobacillus Casei*, *Lactobacillus Acidophilus*; sobre el Crecimiento del *Candida Albicans*, en los Laboratorios de la UCSM, Arequipa 2016 [Tesis de grado]. Arequipa: Facultad de Odontología, Universidad Católica de Santa María; 2019. Disponible en: <https://tesis.ucsm.edu.pe:80/repositorio/handle/UCSM/9047>

43. Aguilar G, Villalobos E. Efecto antibacteriano de tocosh fresco de *Zea mays* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Escherichia coli* [Tesis de grado]. Chimbote: Facultad de Medicina, Escuela de Farmacia y Bioquímica, Universidad San Pedro; 2018. Disponible en: <http://repositorio.usanpedro.edu.pe//handle/USANPEDRO/9284>
44. Rodríguez Carrasco J, García-Godos Alcázar P. Capacidad probiótica de bacterias lácticas aisladas de chicha de molle. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 2017; 83(4):391–402. ISSN 1810-634X.
45. Winn Allen, Koneman E. Bacilos Gram positivos anaerobios facultativos. Koneman, Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas en color. 7a. ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 2017. p. 934-936. ISBN:9788416781669
46. Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos para la determinación de susceptibilidad antibiótica en patógenos de importancia hospitalaria. Perú. 2012 [citado el 25 de junio de 2019]; 1–30. Disponible en : <http://simposiovirologia.ins.gov.co/tramites-y-servicios/programas-de-calidad/determinacin%20de%20%20susceptibilidad%20%20antimicrobiana/MANUAL%20DE%20PROCEDIMIENTOS%20%20DETERMI%20SUSCEPTIBILIDAD%20PATOGENOS%20IMPACTO%20HOSPITALARIO.pdf>
47. Burkholder P., Pfister R. et. al. Production of a Pyrrole Antibiotic by a Marine Bacterium New York. 25 March 1966. [Citado el 10 de setiembre del 2015]. 14-4. New York.
48. Lucke F, Schillinger U. Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* Isolated from Meat. 1989 [citado el 10 de mayo de 2018]; 55(8):1901–6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC202976/pdf/aem00101-0055.pdf>
49. Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI]. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017 [Internet]. Wayne, USA: CLSI supplement M100. 27th ed. ISBN 1-56238-805-3. [citado el 07 de julio de 2019]. Disponible en: <http://file.qums.ac.ir/repository/mmrc/clsi%202017.pdf>

50. Rahmani P, Moradzadeh A, Farahmand F. Giving probiotics to your children for gastrointestinal problems: In the light of scientific findings [Internet]. Vol. 10. Iran: Pharma Nutrition; 2019 [citado el 07 de julio de 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213434419300891>
51. Tejero-Sariena S, Barlow J, Costabile A, Gibson GR, Rowland I. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe* [Internet]. Elsevier Ltd.; 2012 [citado el 10 mayo de 2019]; 18(5):530–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.08.004>
52. Jurado-Gómez H, Jarrín-Jarrín V. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus lactis* y determinación del efecto probiótico en cepas patógenas. *Biosalud*. 2015; 14(2):49–62. DOI: 10.17151/biosa.2015.14.2.5
53. Chen C-C, Lai C-C, Huang H-L, Huang W-Y, Toh H-S, Weng T-C, et al. Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Species Against Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Front Microbiol*. PubMed [Internet]. 2019 [citado el 9 de junio 2019]; 10:789. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31057508>.
54. Davoodabadi A, Soltan Dallal MM, Rahimi Foroushani A, Douraghi M, Sharifi Yazdi M, Amin Harati F. Antibacterial activity of *Lactobacillus* spp. isolated from the feces of healthy infants against enteropathogenic bacteria. *Anaerobe* [Internet]. 2015 [citado el 24 de agosto de 2019]; 34:53–8. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996415300159>
55. Vuotto C, Longo F, Donelli G. Probiotics to counteract biofilm-associated infections: promising and conflicting data. *International Journal of Oral Science* [Internet]. 2014 Setiembre 26 [citado el 24 de agosto de 2019]; 6:189–194. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/ijos201452.pdf>

## **ANEXOS**

## Anexo A. Matriz de consistencia

**Título: Evaluación el efecto antagónico de *Lactobacillus spp.* aislados de 'tocosh' - *Solanum sp.* proveniente de Huánuco, frente a bacterias enteropatógenas.**

Planteamiento de Problema	Objetivos	Hipótesis	Justificación	Variable	Tipo de Variables	Técnicas, instrumentos de recolección de datos
<p><b>Problema General:</b> ¿Los <i>Lactobacillus spp.</i> aislados de 'tocosh' - <i>Solanum sp.</i> proveniente de Huánuco tendrán efecto antagónico frente a bacterias enteropatógenas?</p> <p><b>Problemas específicos</b> ¿Los <i>Lactobacillus spp.</i> tendrán efecto antagónico <i>in vitro</i> frente a bacterias enteropatógenas mediante el método de Burkholder?</p>	<p><b>Objetivo General:</b> Evaluar el efecto antagónico <i>in vitro</i> de <i>Lactobacillus spp.</i> aislados de 'tocosh' - <i>Solanum sp.</i> proveniente de Huánuco, frente a bacterias enteropatógenas</p> <p><b>Objetivos específicos:</b> 1. Evaluar el efecto antagónico <i>in vitro</i> que presentan las bacterias del género <i>Lactobacillus spp.</i> aisladas de 'tocosh'-<i>Solanum sp.</i> proveniente de Huánuco frente a bacterias enteropatógenas por el método de Burkholder. 2. Evaluar el efecto antagónico <i>in vitro</i> de los metabolitos extracelulares producidos por las bacterias del género <i>Lactobacillus spp.</i></p>	<p><b>Hipótesis General:</b> Los <i>Lactobacillus spp.</i> aislados de 'tocosh'-<i>Solanum sp.</i> proveniente de Huánuco presenta efecto antagónico frente a bacterias enteropatógenas.</p> <p><b>Hipótesis específicas:</b> 1. Los Lactobacilos tienen efecto antagónico <i>in vitro</i> frente a bacterias enteropatógenas mediante el método de Burkholder.</p>	<p><b>Valor teórico</b> Contribuirá proporcionando nuevas evidencias científicas sobre la capacidad antagónica de <i>Lactobacillus spp.</i> aislados del 'tocosh', frente a bacterias enteropatógenas.</p> <p><b>Valor metodológico</b> Proporciona un nuevo modelo de metodología a emplear para demostrar el antagonismo de lactobacilos frente a enteropatógenos cuyos resultados han sido recolectados con instrumentos validados</p>	<p><b>Variable Independiente</b> <i>Lactobacillus spp.</i> aislados de 'tocosh' - <i>Solanum sp.</i> proveniente de Huánuco</p> <p><b>Variable Dependiente</b> Efecto antagónico frente a bacterias enteropatógenas.</p>	<p>Cualitativa nominal</p> <p>Cuantitativa continua</p>	<p><b>Diseño:</b> No experimental, Transeccional, analítico.</p> <p><b>Población:</b> 223 aislados de tocosh a partir de tres pozos de fermentación de la provincia de Yarowilca, distrito de Obas.</p> <p><b>Muestra:</b> 44 cepas de <i>Lactobacillus spp.</i></p> <p><b>Instrumento de recolección de datos:</b> Formatos elaborados en Excel.</p>


<p>¿Los metabolitos extracelulares producidos por las bacterias del género <i>Lactobacillus spp.</i> tendrán efecto antagónico frente a bacterias enteropatógenas?</p> <p>¿Existirán diferencias entre el efecto antagónico mediado por el método de Burkholder y los metabolitos extracelulares?</p>	<p>aisladas de 'tocosh'-<i>Solanum sp.</i> proveniente de Huánuco frente a bacterias enteropatógenas por el método del sobrenadante libre de células (CFS).</p> <p>3. Determinar las diferencias existentes <i>in vitro</i> entre el efecto antagónico probado por el método de Burkholder y el efecto antagónico probado por el método sobrenadante libre de células.</p>	<p>2. Los metabolitos extracelulares producidos por las bacterias del género <i>Lactobacillus spp.</i> tienen efecto antagónico <i>in vitro</i> frente a bacterias enteropatógenas.</p> <p>3. Existen diferencias entre el efecto antagónico <i>in vitro</i> mediado por el método de Burkholder y los metabolitos extracelulares</p>	<p>obteniendo resultados confiables que fueron procesados con el software SPSS versión 24.</p> <p><b>Valor práctico:</b> Permitirá contar con base para difundir el conocimiento de las propiedades antibióticas y así promover su consumo por la población desde su fuente natural que no utiliza este alimento fermentado. Asimismo, incentivará la realización de estudios en instituciones orientadas a la producción investigativa que promuevan al 'tocosh' como una nueva fuente de probióticos, que ayuden en la prevención de posibles enfermedades diarreicas.</p>			<p><b>Técnica:</b> Método modificado de difusión por Burkholder.</p> <p>Método modificado de difusión en pozos -</p> <p><b>Procesamiento de Datos:</b> Medidas de tendencia central las cuales fueron evaluados con el sistema SPSS versión 24.</p>
---	--	---	--	--	--	---

## Anexo B. Operacionalización de variables

VARIABLE	DIMENSION	INDICADOR	VALORES		CRITERIOS DE MEDICION	ESCALA DE MEDICION DE VARIABLE	INSTRUMENTOS
<b>Independiente:</b>  <i>Lactobacillus spp.</i> aislados de 'tocosh' - <i>Solanum sp.</i> proveniente de Huánuco	<b>MORFOLOGIA</b>	Características macroscópicas	Forma Tamaño Borde Elevación Textura Color	Según características típicas mm	Diámetro de colonias en mm	Cuantitativa Continua	Colonias aisladas de 'tocosh'
		Características microscópicas	Forma	Según características típicas	Gram positivo	Cualitativa nominal	Colonias aisladas de 'tocosh'
			Agrupación Color		Gram negativo		
	<b>BIOQUIMICA DIFERENCIAL</b>	Tipo de enzima	Prueba de Citocromo Oxidasa	Cambio de coloración tiras impregnadas	Oxidasa positivo Oxidasa Negativo	Cualitativa nominal	Reactivos
			Prueba de Catalasa		Degradación del peróxido de hidrogeno (formación de burbujas)	Catalasa positivo Catalasa Negativo	
		Tipo de fermentación	Producción de CO <sub>2</sub>	Según características típicas	Heterofermentativo Homofermentativo	Cualitativa nominal	
<b>Dependiente:</b>  Efecto antagónico frente a bacterias enteropatógenas	Interacción <i>in situ</i>	Cambios de PH, segregación de ácidos y peróxido de hidrogeno	Halo de inhibición	Milímetros	Tiene efecto Antagónico: > 6 mm	Cuantitativa Continua	Medida de halos de inhibición según EL CLSI
	Metabolitos extracelulares	Segregación de ácidos, peróxido de hidrogeno, otros antimicrobianos			No tiene efecto antagónico  < 6 mm		



## Anexo C. Instrumentos de recolección de datos

  			
<b>INSTRUMENTOS DE INVESTIGACION</b>			
<b>TITULO DE LA INVESTIGACION : Efecto Antagónico in vitro de <i>Lactobacillus spp.</i> aislados de Tocosh-<i>Solanum sp.</i> , provenientes de Huánuco y Junín frente a bacterias enteropatógenas</b>			
<b>OPERACIONES PRELIMINARES</b>			
<b>ANALISTA</b>			
<b>FECHA DE ANÁLISIS</b>		<b>HORA DE INICIO:</b>	
<b>HORA DE ANÁLISIS</b>		<b>HORA DE TERMINO:</b>	
<b>NORMA TÉCNICA</b>		<b>CODIGO :</b>	
<b>MUESTRA : TOCOSH</b>			
<b>RECIPIENTE</b>	<b>MEDIO DE TRANSPORTE</b>	<b>TEMPERATURA DE</b>	<b>FECHA</b>
<b>CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS</b>			
<b>OLOR</b>	<b>COLOR</b>	<b>SABOR</b>	<b>ASPECTO</b>
<b>CARACTERISTICAS FISICAS</b>			
<b>PH</b>	<b>ACIDO</b>	<b>BÁSICO</b>	<b>TEMPERATURA</b>
<b> AISLAMIENTO</b>			
<b>PRE-ENRIQUECIMIENTO</b>		<b>FECHA :</b>	
<b>MEDIO DE CULTIVO</b>	<b>TIEMPO DE INCUBACION</b>	<b>TEMPERATURA</b>	<b>PH</b>
<b>SIEMBRA Y AISLAMIENTO DE COLONIAS</b>		<b>FECHA:</b>	
<b>RECUENTO</b>			
<b>MEDIO DE CULTIVO</b>	<b>TIEMPO DE INCUBACION</b>	<b>TEMPERATURA</b>	<b>PH</b>

### Anexo C. Instrumentos de recolección de datos. Continua

VARIABLE INDEPENDIENTE							
I. <i>Lactobacillus sp.</i> aislados de 'tocosh'- <i>Solanum sp.</i> proveniente de Huánuco							
I.1.MORFOLOGIA							
1.1.1. CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS							
			TIPO DE COLONIA				
CODIGO DE MUESTRA	MEDIO DE CUTIVO	I.1.1.a FORMA	I.1.1.b TAMAÑO	I.1.1.c BORDE	I.1.1.d ELEVACION	I.1.1.e TEXTURA	I.1.1.f COLOR
1.1.2. CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS							
I.1.2.A FORMA		I.1.2.B. AGRUPACIÓN	I.1.2.C COLOR		CLASIFICACION DE BACTERIA		
					GRAM POSITIVO	GRAM NEGATIVO	
I.2. BIOQUIMICA DIFERENCIAL							
NECESIDAD DE OXIGENO				ANAEROBIO			
I.2.1 TIPO DE ENZIMA							
I.2.2.A. PRUEBA DE CITOCROMO OXIDASA							
Oxidasa				Positivo ( )		Negativo ( )	
I.2.2.B. PRUEBA DE CATALASA							
Catalasa				Positivo ( )		Negativo ( )	
CONCLUSIONES							

**Anexo C. Instrumentos de recolección de datos. Continua**

VARIABLE DEPENDIENTE					
EFECTO ANTAGONICO DE <i>Lactobacillus spp.</i> FRENTE A BACTERIAS ENTEROPATOGENAS					
INTERACCION <i>IN SITU</i>					
METODO: MÉTODO MODIFICADO DE DIFUSIÓN BURKHOLDER					
MEDIO DE CULTIVO					
TIEMPO DE INCUBACION					
TEMPERATURA					
LACTOBACILOS	ENTEROPATOGENOS				EFECTO ANTAGONICO
	Halos de inhibición (mm)				
CODIGO DE MUESTRA	<i>Vibrio cholerae</i> 1.457.10 INABA	<i>Salmonella typhi</i> 2.240-16	<i>Shiguelia flexneri</i> WHO SH-15.3	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena 2.734-18	
OBSERVACIONES	Efecto antagónico	Si: > 6 mm		No: < 6 mm	

**Anexo C. Instrumentos de recolección de datos. Continua**

VARIABLE DEPENDIENTE					
EFECTO ANTAGONICO DE <i>Lactobacillus spp.</i> FRENTE A BACTERIAS ENTEROPATOGENAS					
A. EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN DE METABOLITOS					
B. METODO: MODIFICADO DE DIFUSIÓN EN POZOS					
MEDIO DE CULTIVO					
TIEMPO DE INCUBACION					
TEMPERATURA					
LACTOBACILOS	ENTEROPATOGENOS				
	Halos de inhibición (mm)				
CODIGO DE MUESTRA	<i>Vibrio cholerae</i> 1.457.10 INABA	<i>Salmonella typhi</i> 2.240-16	<i>Shiguelia flexneri</i> WHO SH-15.3	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena 2.734-18	EFEECTO ANTAGONICO
OBSERVACIONES	Efecto antagónico	Sí: > 6 mm		No: < 6 mm	

**Anexo D. Instrumento de validación**

**TITULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**Efecto antagónico *in vitro* de *Lactobacillus spp.* aislados de Tocosh-*Solanum sp.*, proveniente de Huánuco frente a bacterias enteropatógenas.**

**OBJETIVO:** Evaluar el efecto antagónico de *Lactobacillus spp.* aislados de ‘tocosh’ - *Solanum sp.* proveniente de Huánuco frente a bacterias enteropatógenas.

**APELLIDOS Y NOMBRES DEL EVALUADOR:**

.....  
.....  
.....

**GRADO ACADÉMICO DEL EVALUADOR:**

.....  
....

**VALORACIÓN:**

Muy Alto	Alto	Medio	Bajo	Muy Bajo

OBSERVACIONES:.....  
.....  
.....  
.....  
.....

\_\_\_\_\_  
**FIRMA DEL EVALUADOR**

## Anexo E. Dictamen de informe de comité de ética

SECTOR SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD



Nº. 481-2018-OGITT/INS

### RESOLUCIÓN DIRECTORAL

Lima, 31 DIC. 2018

Visto, el expediente N° 0019431-18 y Nota Informativa N° 235-2018-OEI-OGITT-OPE/INS, de la Oficina Ejecutiva de Investigación, de la Oficina General de Investigación y Transferencia Tecnológica del Instituto Nacional de Salud, por el cual solicita aprobación de proyecto de investigación;

#### CONSIDERANDO:

Que, el Manual de Organización y Funciones aprobado por RJ N° 267-2003-J-OPD/INS establece que la Oficina General de Investigación y Transferencia Tecnológica (OGITT), órgano asesor de la Alta Dirección, tiene como función el promover el desarrollo y ejecución de la investigación y la tecnología apropiada en salud y de su transferencia en el sector salud a la comunidad;

Que, según se desprende de la Nota Informativa del visto, conteniendo la opinión favorable del Comité Institucional de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Salud (INS), se ha emitido conformidad al protocolo de tesis de Investigación titulado: "EFECTO ANTAGÓNICO IN VITRO DE LACTOBACILLUS spp. AISLADOS DE TOCOSH-SOLANUM sp. PROVENIENTE DE HUÁNUCO Y JUNÍN, FRENTE A BACTERIAS ENTEROPATÓGENAS", versión 1, Código: OT-0022-18;

Que, de conformidad con las atribuciones establecidas en el punto 6.2.2.4 de la Directiva N° 045-INS/OGITT-V.01 "Directiva para la Gestión de Proyectos de Investigación en Salud en el Instituto Nacional de Salud" aprobada por Resolución Jefatural N° 133-2016-J-OPE/INS; así como lo establecido en el punto 5.3.8 en concordancia con el punto 5.3.6 del Procedimiento Técnico Planificación de Proyectos de Investigación PRT-INS-003 Ed.1, aprobado por Resolución Jefatural N° 195-2016-J-OPE/INS;

Con el visto bueno del Director Ejecutivo de la Oficina Ejecutiva de Investigación de la OGITT del INS;

#### SE RESUELVE:

Artículo 1°.- APROBAR el protocolo de tesis de Investigación "EFECTO ANTAGÓNICO IN VITRO DE LACTOBACILLUS spp. AISLADOS DE TOCOSH-SOLANUM sp. PROVENIENTE DE HUÁNUCO Y JUNÍN, FRENTE A BACTERIAS ENTEROPATÓGENAS", versión 1, de fecha 20/11/2018, Código: OT-0022-18; detallada en el anexo No.1 adjunto, que forma parte integrante de la presente Resolución por los fundamentos expuestos en la parte considerativa de la presente Resolución.



C. M. MANUEL S.

## Anexo E. Dictamen de informe de comité de ética. Continua


Artículo 2°.- REGISTRAR el protocolo de tesis de Investigación "EFECTO ANTAGÓNICO IN VITRO DE LACTOBACILLUS spp. AISLADOS DE TOCOSH-SOLANUM sp. PROVENIENTE DE HUÁNUCO Y JUNÍN, FRENTE A BACTERIAS ENTEROPATÓGENAS", versión 1, de fecha 20/11/2018, Código: OT-0022-18; en la base de datos de la Oficina de Investigación de la OGITT.

Artículo 3°.- El Director General del Centro Nacional de Salud Pública es responsable del seguimiento y evaluación del desarrollo del proyecto aprobado en la presente Resolución.

Artículo 4°.- NOTIFICAR la presente resolución al Centro Nacional de Salud Pública, al Comité Institucional de Ética en Investigación, así como a los órganos y oficinas involucradas en el presente proceso de aprobación.

Regístrese y comuníquese,



  
.....  
Med. NORA ESPÍRITU SALAZAR  
Directora General  
Oficina General de Investigación y Transferencia Tecnológica  
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

## Anexo F. Evidencias de trabajo de campo

### 1. Descripción taxonómica de la papa

 	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS</b> Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO <b>MUSEO DE HISTORIA NATURAL</b>	
---	--	---

---

*“Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad”*

**CONSTANCIA N° 012-A-USM-2019**

LA JEFA (e ) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta completa) recibida de **Ivette Evelyn Gutierrez Rodriguez**, estudiante de la Universidad Norbert Wiener, ha sido estudiada y clasificada como: ***Solanum tuberosum* L.**, tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUBCLASE: ASTERIDAE**

**ORDEN: SOLANALES**

**FAMILIA: SOLANACEAE**

**GENERO: *Solanum***

**ESPECIE: *Solanum tuberosum* L**

Nombre Vulgar: “papa rosada”  
Determinado por: Mag. Asunción A. Cano Echevarría

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines que estime pertinente.

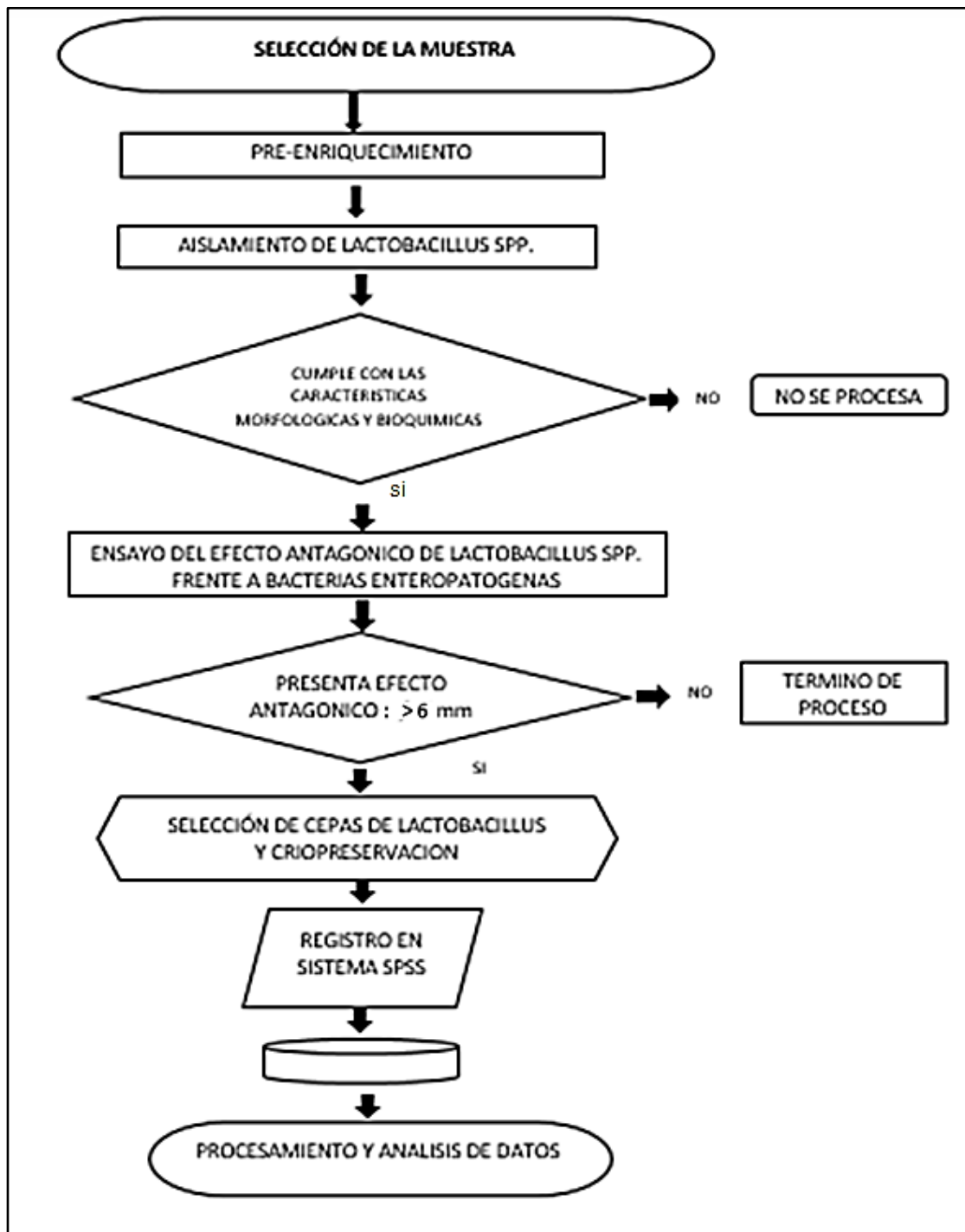
Lima, 23 enero de 2019

JAC/ddb

  
  
**Dra. JOAQUINA ALBAN CASTILLO**  
JEFA (e ) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)



## 2. Flujo de las fases de ejecución



### 3. Lugar de ubicación de los pozos de producción



Mapa de ubicación del lugar de extracción de las muestras de 'tocosh'

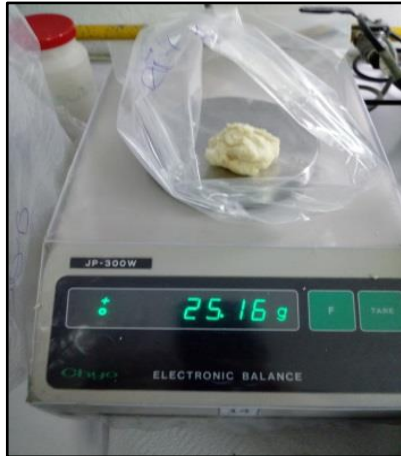


Pozo de producción



Tocosh fresco de papa Yungay

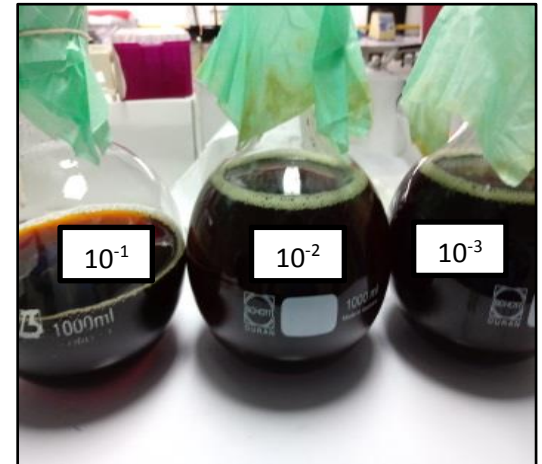
#### 4. Selección de la muestra y pre-enriquecimiento



Pesado de las muestras



Trituración

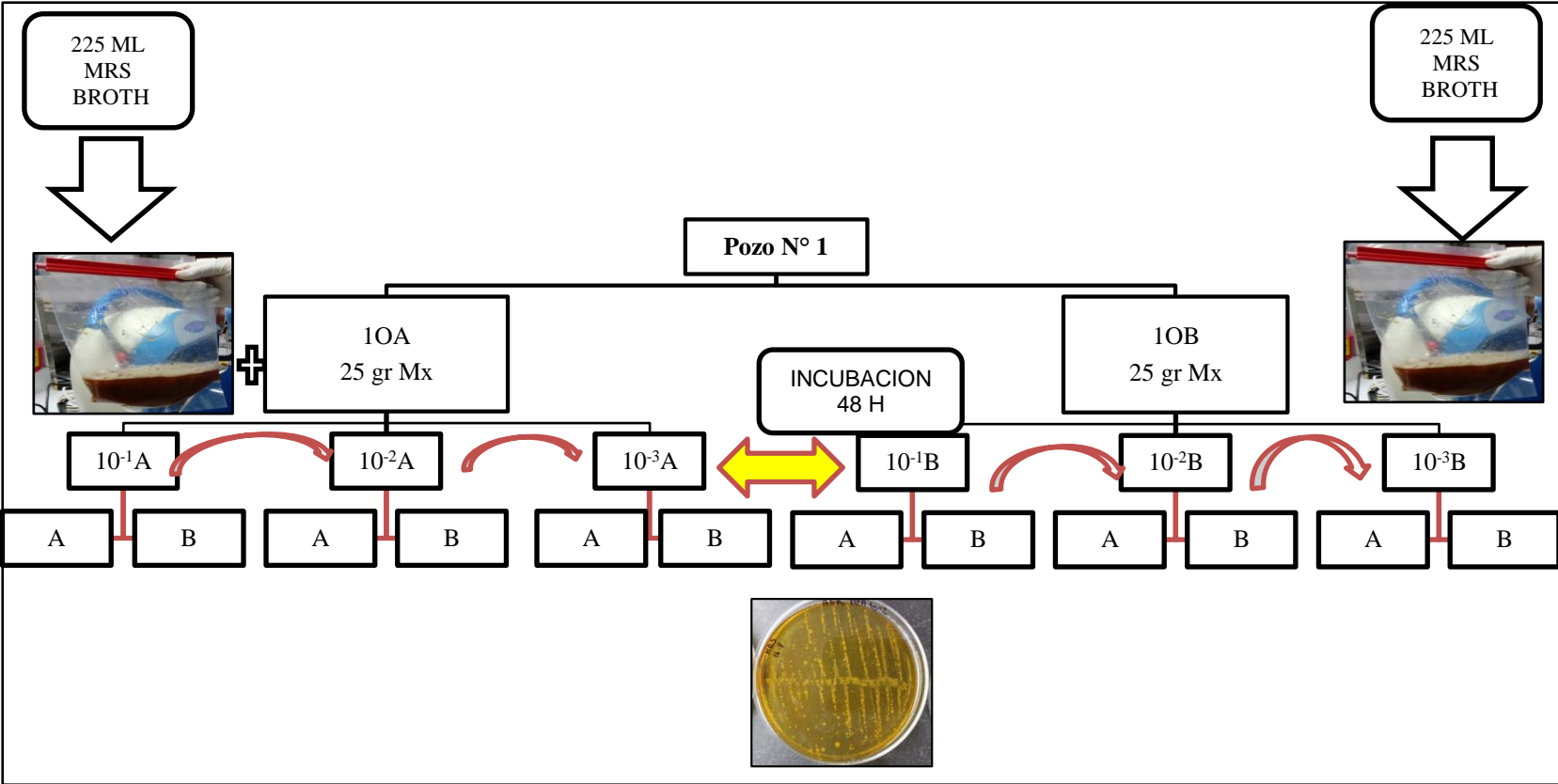


Diluciones seriadas  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$



Caldo MRS broth para incubación en anaerobiosis en un volumen de 20 ml

5. Protocolo utilizado para aislamiento de *Lactobacillus* spp.





6. Figura aspecto macroscópico de *Lactobacillus spp.*

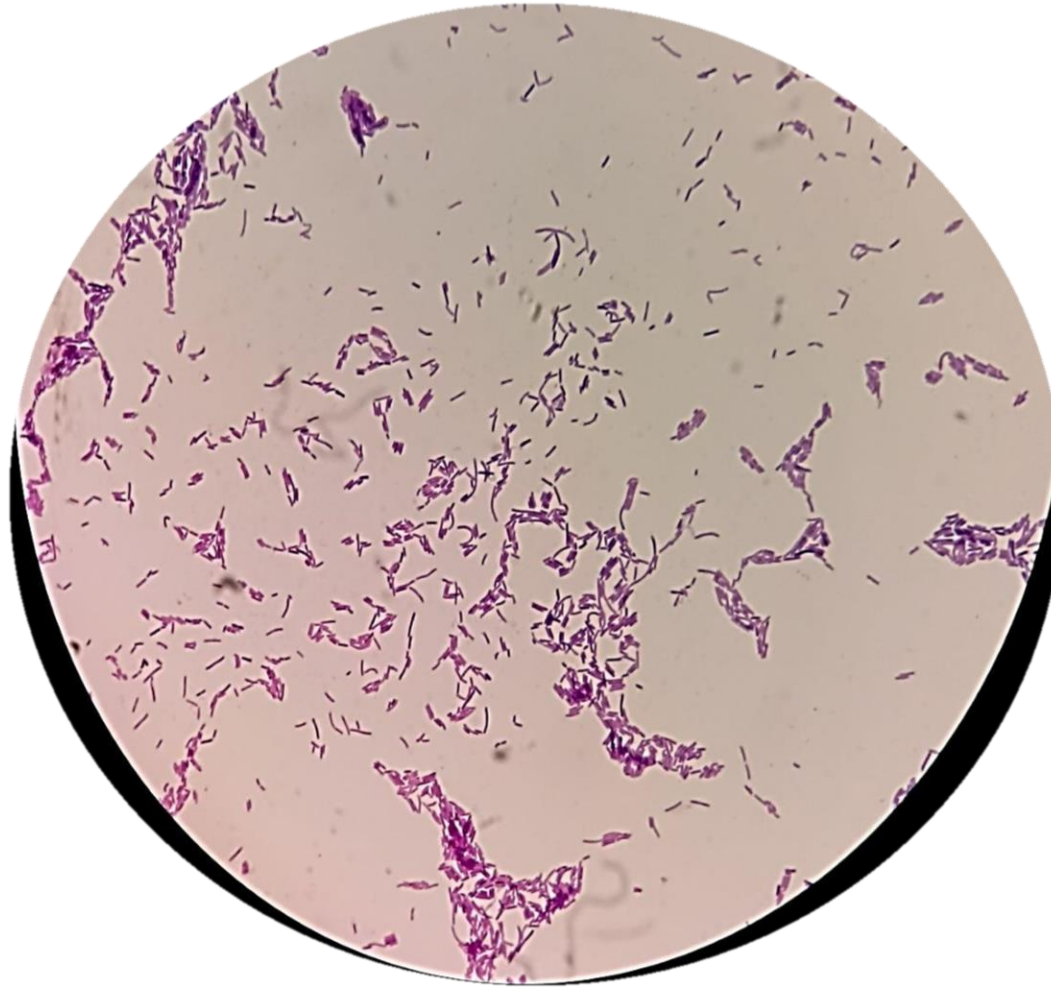


137, 138, 140,146:Crecimiento de *Lactobacillus spp.* Purificado en medio agar Man Rogosa Sharpe a escala de 2 Macfarland



Observación macroscópica de colonias purificadas de *Lactobacillus spp.* en medio Man Rogosa Sharpe.

**7. Figura aspecto microscópico de *Lactobacillus* spp.**



**En la figura se aprecia bacilos Gram positivos en coloración Gram a partir de colonias purificadas aisladas de Tocosh.**

## 8. Prueba bioquímica de la enzima citocromo oxidasa



Se observa la ausencia de la enzima citocromo oxidasa en todas las muestras. Control positivo: *Vibrio cholerae*. Control negativo: *Lactobacillus rhamnosus*-Marca comercial Vivera.



## 9. Prueba bioquímica de la catalasa



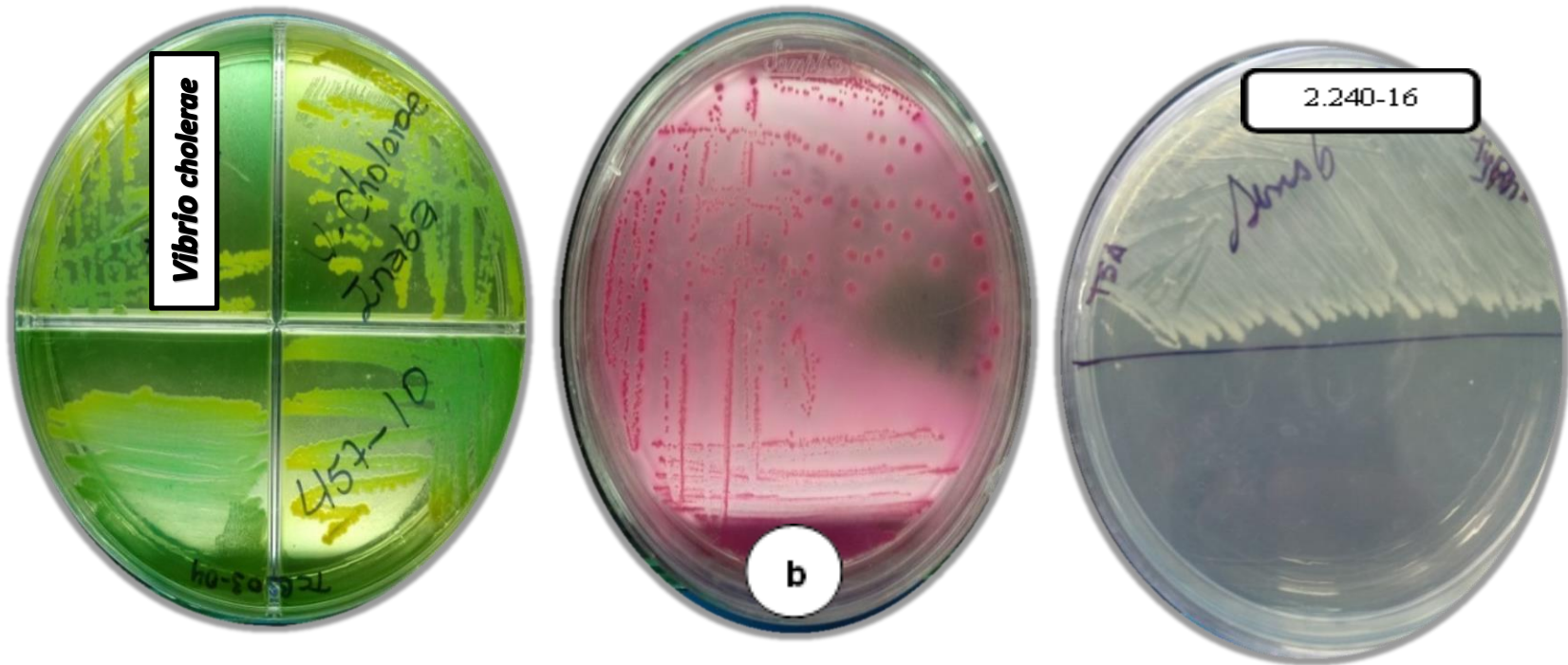
Prueba de la catalasa, control positivo: *Vibrio cholerae*, se observa la formación de burbujas, control negativo: agua estéril. No se aprecia la presencia de la enzima en todas las muestras.



Fermentación de carbohidratos control positivo: *Lactobacillus rhamnosus*



10. Cepas tipificadas de enteropatógenos utilizadas para la prueba de antagonismo

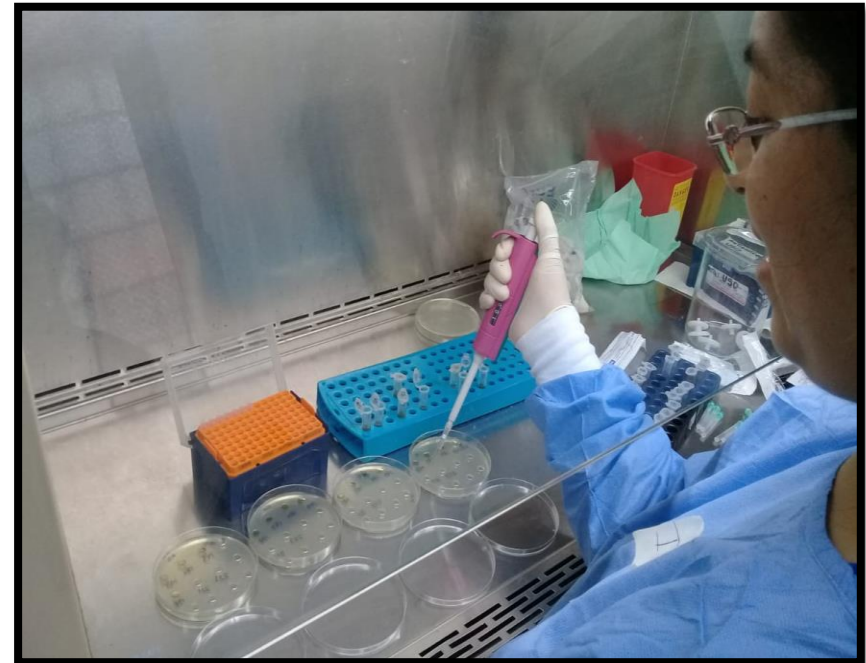


- a. *Vibrio cholerae* 1.457.10 Inaba en agar TCBS
- b. *Escherichia coli* enteropatógena en agar MacConkey
- c. *Salmonella typhi* 2.240-16

## 11. Ensayo del efecto antagónico por el método de sobrenadante libre de células



- a. Control del sobrenadante libre de células esterilizado por filtración de membrana 0.22  $\mu\text{m}$ , no se observó crecimiento en medio MRS a las 48 horas en condiciones de  $\text{CO}_2$ .
- b. Crecimiento bacteriano en cultivo del caldo MRS en anaerobiosis a las 48 horas antes del filtrado por membrana.



Inoculación del sobrenadante en placa con agar Müller Hinton

12. Pruebas de la evaluación del efecto antagónico de *Lactobacillus spp.* frente a bacterias enteropatógenas mediante el método de Burkholder.



Halos de inhibición formados por *Lactobacillus spp.* frente a *Vibrio cholerae* Inaba 1.457.10. en agar Müller Hinton



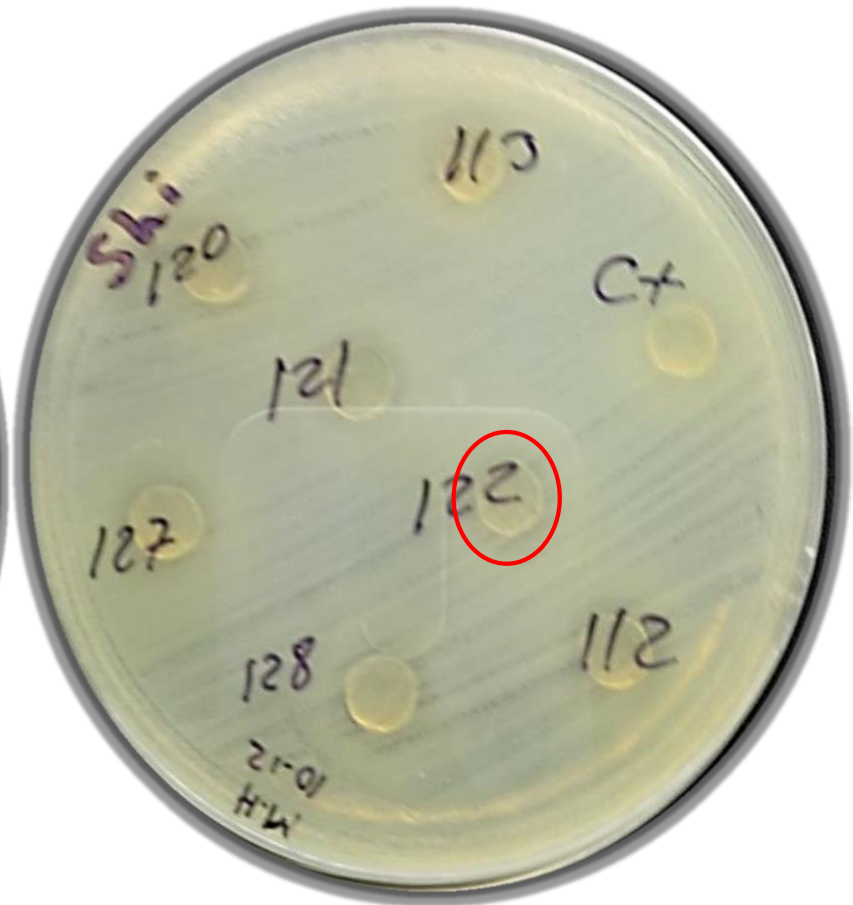
Halos de inhibición formados por *Lactobacillus spp.* frente a *Salmonella typhi* en agar Müller Hinton



13. Pruebas de la evaluación del efecto antagónico de *Lactobacillus spp.* frente a bacterias enteropatógenas mediante el método de Burkholder. Continuación



Ausencia de halos de inhibición formados por *Lactobacillus spp.* frente a *Escherichia coli* enteropatógena en agar Müeller Hinton.



Ausencia de halos de inhibición formados por *Lactobacillus spp.* frente a *Shigella flexneri* en agar Müeller Hinton.

14. Pruebas de la evaluación del efecto antagónico de *Lactobacillus spp.* frente a bacterias enteropatógenas mediante el método de sobrenadante libre de células

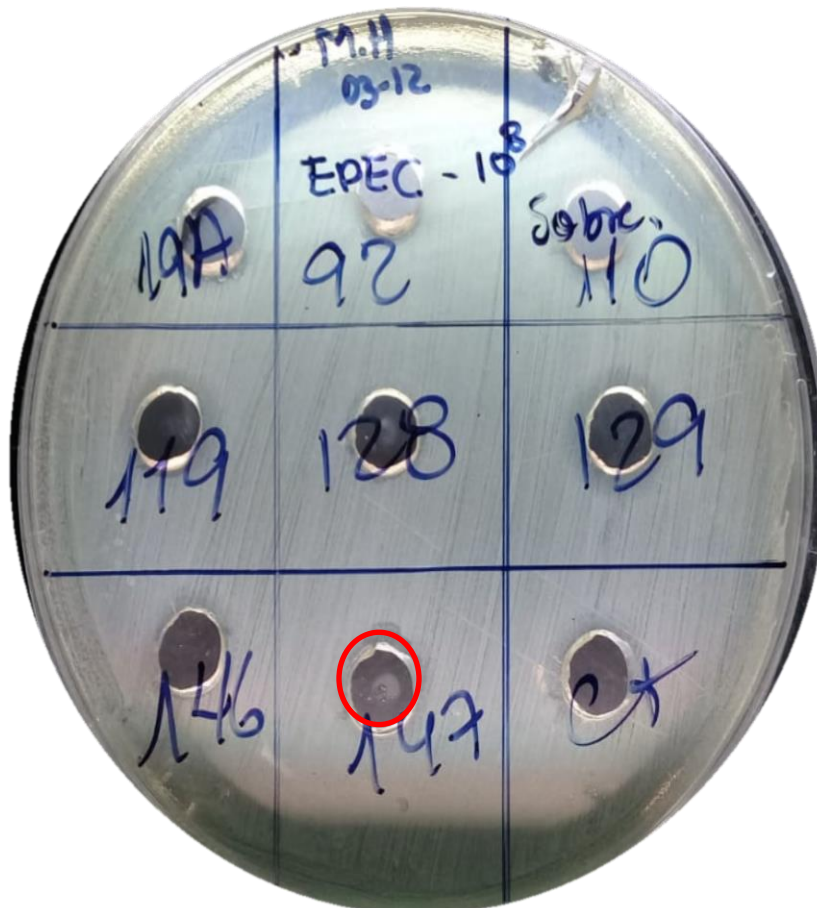


Halos de inhibición formados por *Lactobacillus spp.* frente a *Vibrio cholerae Inaba* 1.457.10. en agar Müeller Hinton



Halos de inhibición formados por *Lactobacillus spp.* frente a *Salmonella typhi* en agar Müeller Hinton

15. Pruebas de la evaluación del efecto antagónico de *Lactobacillus spp.* frente a bacterias enteropatógenas mediante el método de sobrenadante libre de células. Continuación



Halos de inhibición formados por *Lactobacillus spp.* frente a *Escherichia coli* enteropatógena en agar Müller Hinton



Ausencia de halos de inhibición formados por *Lactobacillus spp.* frente a *Shigella flexneri* en agar Müller Hinton



16. Figura del procedimiento de lectura de halos de inhibición del efecto antagónico producido por *Lactobacillus spp.* frente a bacterias enteropatógenas



17. Equipos utilizados en las diferentes fases de la investigación

<b>Órgano</b>	Centro Nacional de Salud Pública			<b>Encargado de laboratorio</b>	Lic. Willy Quino			
<b>Unidad Orgánica</b>	Dirección Ejecutiva de Enfermedades Transmisibles			<b>Fecha de llenado</b>	20/07/18			
<b>Laboratorio</b>	Enteropatógenos							
<b>Bien de capital</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Modelo</b>	<b>Número de serie</b>	<b>Fecha de adquisición</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Condición</b>	<b>Fecha de último mantenimiento</b>	<b>Proveedor de mantenimiento</b>
CONGELADORA VERTICAL	FRIGIDAIRE	MFU17M3GW1	WB94611442	SF	1	En uso	2017	ACS refrigeración
REFRIGERADORA	KENMORE		101155057	SF	1	En uso	2017	ACS refrigeración
ESTUFA 37 °C	VWR SCIENTIFIC	2020	703392	SF	1	En uso	2017	TUMIMED
BALANZA	CHYO	JP-300W	48049	SF	1	En uso	2016	TUMIMED
PH METRO	METTLER TOLEDO		1229235017	2017	1	En uso	SF	TUMIMED
AGITADOR CALENTADOR	BARNSTEAD	SP46920-26	640910365479	SF	1	En uso	2016	TUMIMED
AUTOCLAVE DE MESA	TUTTNAUER	2545M	2708423	SF	1	En uso	2017	TUMIMED
MICROCENTRIFUGA	EPPENDORF	5415C	5415B46885	SF	1	En uso	2016	TUMIMED
CABINA DE FLUJO LAMINAR	LABCONCO	CLASS II	181233	SF	1	En uso	2017	TUMIMED
FUENTE DE PODER	BIORAD		041BR53302	2008	1	En uso	2016	TUMIMED
ESPECTROFOTOMETRO	DENOVIX	DS-11FX+	S01036	2017	1	En uso	SF	TUMIMED
HOMOGENEIZADOR SMASHER	BIOMÉRIEUX		532266890008	2017	1	En uso	2017	TUMIMED
CPU	LENOVO	A1NW00	MJ03NUQ2	2016	1	En uso	SF	TUMIMED



MONITOR	LENOVO	T224pD	V9-02KMM5	2016	1	En uso	SF	TUMIMED
---------	--------	--------	-----------	------	---	--------	----	---------

