REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

"OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO PARA BIFIDOBACTERIAS, CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE ADN POR qPCR DE *Bifidobacterium longum y Bifidobacterium infantis* Y DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIVIRAL SOBRE COXSACKIEVIRUS (CVB4)."

Tesis presentada por la Bachiller:

BEGAZO ZEGARRA, YADIRA BLANCA

Para optar el Título Profesional de:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

Asesor: Jaime D. Cárdenas García, PhD.

Arequipa-Perú

2017

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

RESUMEN

Las bifidobacterias son microorganismos Gram-positivos, anaerobios estrictos, no móviles y a menudo presentan ramificaciones. Las bifidobacterias tienen un papel muy importante sobre el sistema inmunológico y son usadas con frecuencia como probióticos.

Se prepararon diferentes cultivos para bifidobacterias, dentro de ellos tenemos tres medios importantes: medio Columbia, medio MIL, medio MRS, con el fin de seleccionar cepas potencialmente protectores de las infecciones virales por contacto directo, partículas virales o células. Las cepas utilizadas, no se han estudiado anteriormente: *Bifidobacterium longum* subsp. l*ongum, Bifidobacterium longum* subsp. i*nfantis.* Por tal razón, es necesario desarrollar un medio de cultivo satisfactorio para la posterior producción de moléculas.

Las bifidobacterias tienen un crecimiento óptimo a temperaturas de entre 37 °C y 41 °C, mientras que el pH óptimo para el crecimiento es de entre 6 y 7, la enzima clave en el metabolismo de las hexosas es la fructosa 6-fosfato fosfocetolasa que transforma la fructosa 6-fosfato en acetil-fosfato y eritrosa-4-fosfato; los productos finales son el ácido acético y ácido láctico.Por tanto, es necesario tener en cuenta las especificidades del entorno de desarrollo de las bifidobacterias y de esta manera poder cuantificar las suspensiones bacterianas por cultivo y por qPCR. Una vez cuantificado el ADN bacteriano, determinaremos la actividad antiviral de las cepas de bifidobacterias sobre Coxackievirus (CVB4).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Para determinar la eficacia antiviral de las bifidobacterias se investigaron tres condiciones:

- Pre-incubación de las bacterias con células HEP-2.
- Pre-incubación de las bacterias con virus Coxsackievirus B4 (CVB4).
- La co-incubación con bacterias, células HEP-2 y CVB4.

Una vez realizada la determinación antiviral bajo las tres condiciones antes mencionadas, se evaluó el efecto citopatológico (ECP) de las bifidobacterias sobre las células HEP–2, de esta manera podremos determinar la capacidad citoprotectora de las bifidobacterias sobre Coxsackievirus (CVB4) y el efecto inmunomodulador. También se realizó el análisis bioinformático de las bifidobacterias con el fin de encontrar el gen dentro de su ambiente genético, en sitios públicos con genomas antes descritos y poder comparar la variabilidad genética con otros microrganismo.

Palabras clave: Bifidobacterium, qPCR, Coxsackievirus, HEP-2.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ABSTRACT

Bifidobacteria are Gram-positive organisms, anaerobes, non-mobile and often have ramifications. Bifidobacteria have a very important role on the immune system and are often used as probiotics.

Columbia, MIL and MRS medium where used in order to select potentially protective viral infections strains by direct contact, viral particles or cells: different crops bifidobacteria within them have three important media were prepared. The strains used, have not been studied previously: *Bifidobacterium longum* subsp. *longum, Bifidobacterium longum* subsp. *infantis.* For this reason it is necessary to develop a satisfactory means of culture for subsequent production of molecules.

Bifidobacteria have optimum growth at temperatures between 37 °C and 41 °C, while the optimum pH for growth is between 6 and 7, the main enzyme in the metabolism of hexoses is fructose 6-phosphate phosphocétolase phosphoketolase that converts fructose 6-phosphate into acetyl-phosphate and erythrose-4-phosphate; end products are acetic acid and lactic acid.

Therefore, it is necessary to take into account the specificities of the development environment of the bifidobacteria and thus to be able to quantify the bacterial suspensions by culture and by qPCR. Once the bacterial DNA is quantified, we will determine the antiviral activity of the strains of bifidobacteria on Coxackievirus (CVB4).To determine the antiviral efficacy of bifidobacteria three conditions are investigated:

- Pre-incubation of bacteria with HEP-2 cells.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

- Pre-incubation of bacteria with Coxsackievirus B4 (CVB4).
- The co-incubation with bacteria, HEP-2 cells and virus CVB4.

Once the antiviral determination was determined under the above three conditions the cytopathology effect (ECP) of bifidobacteria on HEP-2 cells was evaluated, so we can determine cytoprotective capacity of bifidobacteria on Coxsackievirus (CVB4) and the immunomodulator effect.

Bioinformatic analysis of bifidobacteria was also performed in order to find the gene in its genetic environment, in public websites with the genomes described above and to compare genetic variability with other microorganism.

Keywords: Bifidobacterium, qPCR, Coxsackievirus, HEP-2.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

CFPL: Colección de la Facultad de Farmacia de Lille.

PRSF: Colección Prosafe.

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

G (N°): Generación (N°).

BLAST: Herramienta básica de búsqueda de alineación local.

NCBI: Centro Nacional de Información sobre Biotecnología.

ND: No Detectado.

HEP-2: Carcinoma epidermoide humano cepa 2.

ECP: Efecto Citopatológico.

rpm: Revoluciones por minuto.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a personas muy especiales en mi vida, que son el motivo y la razón de todo mi esfuerzo y logros obtenidos, ya que desde siempre han estado a mi lado para apoyarme y no dejarme caer y si lo hice, estuvieron para darme su mano y salir adelante juntos.

Papá Nicolás y Mamá Sonia, gracias por todo su esfuerzo y dedicación para darnos lo mejor en cada momento, no hay palabras de agradecimiento por todo lo que ustedes hacen por nosotras, cada paso, cada logro es para ustedes, porque siempre están en el momento indicado para darme aliento y fuerza para seguir adelante, y sé que yo también estaré para ustedes apoyándolos, los amo papitos.

Papá Ernesto y Mamá Blanca, no son mis padres biológicos pero sé que soy una hija para los dos, ustedes son y serán mi motivación más grande, gracias por su infinito amor, compresión y apoyo. Estaré siempre para ustedes, como ustedes para mí, no tengo palabras para explicar el inmenso amor que tengo por ustedes, los amo papitos.

Brigitte, mi pequeña hermana, gracias por tus consejos, tu apoyo, sin ti nada sería igual, eres mi mejor amiga, y mi inspiración para ser siempre un ejemplo tuyo. Te amo hermana mía y estaré para ti siempre que lo necesites. Siempre acompañadas de un ángel S.

Diego, mi amor, gracias por tu apoyo incondicional, por estar en los momentos más difíciles y demostrarme que el amor es más fuerte que la distancia y las dificultades que pueden haber no derrumban un amor verdadero. Te amo.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y a la Virgen María que me dan la fortaleza necesaria para salir adelante, luchar sin rendirme y por aparecer en mi camino como ángeles que siempre cuidan de mí, y me dan la fuerza y las ganas de vivir cada día al máximo bajo una frase que la tengo presente en mi día a día "Ser más para servir mejor". – P. Arrupe.

Doy gracias a los docentes de mi facultad que fueron parte importante de mi formación como profesional y como persona, gracias por todos los conocimientos brindados a lo largo de mi carrera y gracias a todas aquellas personas que estuvieron a mi lado dándome el apoyo necesario.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....ii
ABSTRACT.....iv
DEDICATORIA.....vii
AGRADECIMIENTOS.....viii
INDICE DESARROLLADO.....1
INDICE DE FIGURAS.....4
INDICE DE TABLAS.....6
INTRODUCCION.....7
HIPÓTESIS.....9
OBJETIVOS.....10
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO.....11
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS.....38
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....53
CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS.....72
REFERENCIAS.....75
ANEXOS.....81

INDICE DESARROLLADO

I. MARCO TEÓRICO.....12
1. BIFIDOBACTERIAS.....12
1.1 Introducción.....12
1.2 Ecosistema TGI.....13
1.3 Morfología y Condiciones.....14
1.4 Especies.....15
1.5 Metabolismo.....16
1.6 Probióticos y Prebióticos.....18
1.6.1 Probióticos.....18
1.6.2 Prebióticos.....19
1.7 Efectos sobre la salud.....20

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2. CULTIVO 23
2.1 Introducción 23
2.2 Tipos de Cultivo 24
2.3 Temperatura y pH 25
2.3.1 Temperatura 25
2.3.2 pH 25
3. CUANTIFICACIÓN 26
3.1 Introducción 26
3.2 PCR 26
3.3 PCR Cuantitativa 26
4. COXSACKIEVIRUS 29
4.1 Introducción 29
4.2 Epidemiología 31
4.3 Enfermedades 33
4.4 Diagnóstico 35
4.5 Prevención 35
4.6 Tratamiento 36
5. PROBIÓTICOS Y EL SISTEMA INMUNITARIO 36
6. LÍNEA CELULAR HEP–2 37

II. MATERIALES Y MÉTODOS 39
1. MATERIALES 39
1.1 MATERIAL BIOLÓGICO 39
1.2 MATERIALES Y REACTIVOS 40
1.2.1 Equipos utilizados 40
1.2.2 Reactivos 41
1.3 LUGAR DE INVESTIGACIÓN 41
2. METODOLOGÍA 41
2.1 Optimización del cultivo bacteriano 41
2.2 Medición de pH 46
2.3 Influencia del poder tampón 46
2.4 Extracción de ADN bacteriano 48

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2.5 Preparación de las muestras para realizar la Cuantificación Absoluta de los Genes xilulosa-5-fosfato/fructosa-6-fosfato fosfocetolasa por la técnica molecular qPCR.....49
2.6 Análisis de la actividad antiviral.....50
2.7 Análisis Bioinformático de secuencias de bifidobacterias.....51

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 54
1. Conteo de bifidobacterias.....54
2. Medición de pH.....58
3. Medición del poder tampón 59
3.1 Resultados del tampón con Acetato de Amonio 59
3.2 Resultados del tampón con Lactalbúmina.....60
4. Extracción de ADN bacteriano 61
5. Cuantificación de ADN bacteriano por la técnica de qPCR 63
6. Efecto de *Bifidobacterium longun – infantis* sobre Coxsackievirus 67
7. Análisis Bioinformático de secuencias de bifidobacterias.....69

IV. CONCLUSIONES 73

SUGERENCIAS 74

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1. Bifidobacterium.

Figura I.2. Diagrama simplificado que muestra los compartimentos del sistema digestivo del hombre y la microflora.

Figura I.3. Estrucutura de la envoltura celular de bacterias Gram-positivas.

Figura I.4. Metabolismo de bifidobacterias.

Figura I.5. Los principales efectos benéficos atribuídos a las bifidobacterias.

Figura I.6. Principios de PCR en tiempo real.

Figura I.7. Fases de PCR en tiempo real.

Figura I.8. Poliovirus Tipo 1.

Figura I.9. Deformidad en Extremidad Pierna Derecha por Poliovirus.

Figura I.10. Órganos afectados por Coxsackievirus.

Figura II.1. Cabina de flujo laminar para PCR.

Figura II.2. Proceso de cultivo de las cepas en diferentes medios.

Figura II.3. Dilución y conteo de bifidobacterias.

Figura II.4. Proceso de extracción de ADN.

Figura III.1. Curva de crecimiento bacteriano de la cepa CFPL02169.

Figura III.2. Curva de crecimiento bacteriano de la cepa CFPL02073.

Figura III.3. Poder tampón con Acetato de Amonio.

Figura III.4. Poder tampón con Lactalbúmina.

Figura III.5. Evaluación de la integridad del ADN bacteriano por Electroforesis.

Figura III.6. Elaboración de estándares qPCR.

Figura III.7. Gráfico de regresión lineal de los estándares.

Figura III.8. Ciclos de qPCR CBi0703.

Figura III.9. Ciclos de qPCR CFPL 02169.

Figura III.10. Ciclos de qPCR CFPL 02073.

Figura III.11. Tolerancia de células HEP-2 a bifidobacterias en ausencia de infección viral.

Figura III.12. Preincubación de bacterias y células antes de la infección viral.

Figura III.13.Preincubación de bacterias/virus antes de la infección de células HEP-2.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Figura III.14. Alineación de las secuencias de las cepas CBi0703 y Streptococcus mutans.

Figura III.15. BLAST realizado entre CFPL 02169 – CBi0703.

Figura III.16. BLAST realizado entre CFPL 02073 – CBi0703.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1. Distribución de diferentes especies de Bifidobacterium en el TGI del ser humano en relación a la edad (Ballongne,1993).

Tabla I.2. Género Enterovirus.

Tabla I.3. Enfermedades causadas por Coxsackievirus del Grupo A.

Tabla I.4. Enfermedades causadas por Coxsackievirus del Grupo B.

Tabla II.1. Cepas utilizadas.

Tabla II.2. Lista de las pruebas.

Tabla II.3. Composición mix para la qPCR.

Tabla II.4. Ciclaje para la qPCR.

Tabla III.1. Número de colonias a Tiempo cero, 18 horas y 24 horas.

Tabla III.2 Número de colonias expresadas en UFC/ml.

Tabla III.3 Número de colonias expresadas en log UFC/ml.

Tabla III.4 Medición de pH cepa CFPL 02169.

Tabla III.5 Medición de pH cepa CFPL 02073.

Tabla III.6. Medición de D.O y extracción de ADN bacteriano.

Tabla III.7 Cuantificación de ADN por qPCR.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

INTRODUCCIÓN.

El tracto gastrointestinal humano (TGI) está colonizado por una amplia y variada comunidad de microorganismos que son fundamentales para sus funciones. Estos microorganismos han evolucionado, ocupan regiones y nichos específicos en el tracto gastrointestinal. Tener una microflora equilibrada es preciso para la digestión normal y para mantener la homeostasis del ecosistema intestinal [1]. Sin embargo, se sabe poco acerca de los mecanismos específicos de la interacción huésped-microorganismo que desempeñan papeles importantes en la fisiología del tracto gastrointestinal. La composición de la microflora en humanos varía con la edad, la dieta, y la ubicación [2, 3]. Existen 32 especies de bifidobacterias; unas pocas han sido aisladas de la vagina humana y de la cavidad oral, pero la gran mayoría son del TGI de mamíferos [4].

Los microorganismos probióticos que han sido seleccionados en alimentación humana están representados primordialmente por bacterias lácticas, especialmente las que pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* [5]. Actualmente, estos dos géneros bacterianos son bastante utilizados en la fabricación de productos lácteos fermentados. La apreciación de las propiedades profilácticas y terapéuticas de los probióticos está motivando el aumento del consumo de productos lácteos fermentados, incluyendo el yogurt [6]. Por ejemplo, en Estados Unidos, casi el 60% de los yogures contienen cultivos probióticos como *Lactobacillus acidophilus* y/o *Bifidobacterium*. El consumo de yogurt en el país norteamericano aumentó de 0,5 a 2 kg/persona/año. En Europa, el mercado de los probióticos para el consumo humano se ha estimado en aproximadamente 12,9 millones dólares en el año 2003, este mercado está creciendo en un 14% anual. [7]

Estas valoraciones han llevado a un uso generalizado de las bifidobacterias como componentes alimenticios que promueven la salud. Estudios recientes, mostraron que el consumo de alimentos ricos en probióticos produjeron varios efectos positivos en el organismo, como la mejora de los mecanismos de la respuesta inmune, restablecer

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

el equilibrio microbiano en el colon, el tratamiento de ciertas infecciones urogenital e intestinales, lo que reduce los riesgos de alergia, cáncer, úlceras. [8]

El poliovirus es el subtipo de los enterovirus, que es el agente productor de la poliomielitis, y este género incluye a otros virus patógenos de animales y humanos. El subgrupo de Coxsackievirus está dividido en dos grupos A y B, que son capaces de producir diferentes enfermedades. El nombre del virus proviene del pueblo de Coxsackie que está localizado en el estado de Nueva York en donde se aisló, por primera vez, el virus de dos niños con parálisis en 1948. Los virus del grupo A provocan enfermedades como la herpangina, enfermedad de la mano, el pie y la boca y conjuntivitis hemorrágica aguda. Los del grupo B causan la pleurodinia (garra del diablo), asimismo de miocarditis, pericarditis y meningoencefalitis. [9]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

HIPÓTESIS.

Dado que las bifidobacterias son ampliamente utilizadas para consumo humano y está demostrado que tienen efectos sobre el sistema inmunológico, es probable que presente efectos antivirales.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

OBJETIVOS.

1. Lograr la optimización del cultivo para Bifidobacterias.

2. Desarrollar un medio ambiente adecuado para la producción de Bifidobacterias.

3. Cuantificar el ADN de las Bifidobacterias por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa. (qPCR)

4. Verificar la actividad antiviral de las bifidobacterias sobre Coxsackievirus (CVB4).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

I. MARCO TEÓRICO

1. BIFIDOBACTERIAS

1.1 Introducción

Las bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium* fueron descritas por primera vez por Tessier en el año 1900, el cual aisló de las heces de un niño nutrido con leche materna, una bacteria anaeróbia que presentaba morfología bífida y la llamó *Bacillus bifidus*. En general, estas bacterias muestran un polimorfismo celular (bifurcada o ramificada) dependiendo de las medios de cultivo [10]. Varias especies de bifidobacterias poseen diferentes propiedades funcionales que pueden colonizar el intestino del hombre de forma simultánea [11].

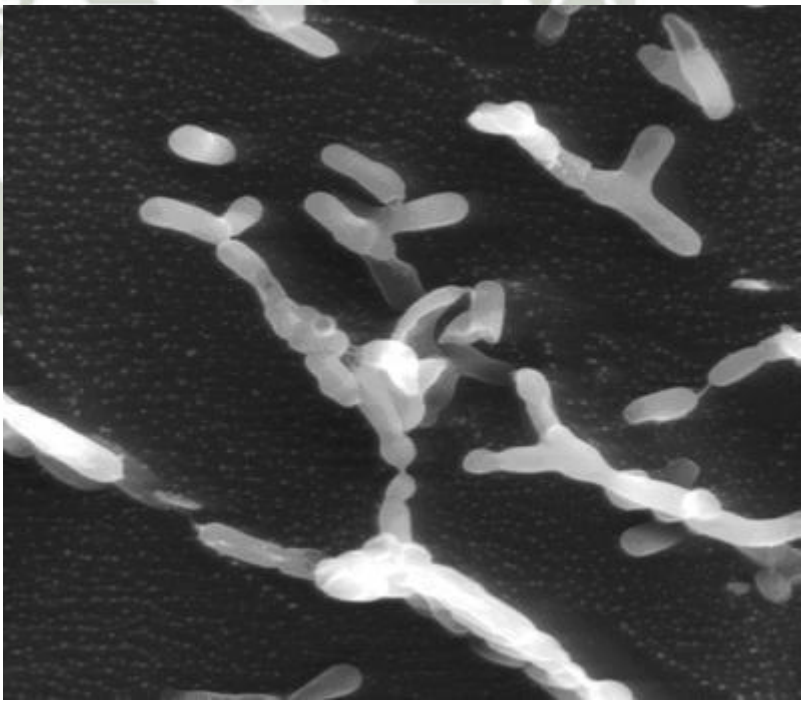


Figura I.1. *Bifidobacterium.*

Fuente: *Gut Health and Food Safety Blog.* [12]

El hombre, así como los animales viven continuamente en combinación con una población de microorganismos vivos y complejos dentro del tracto

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

gastrointestinal. Uno de los principales beneficios de estos microorganismos es la defensa y mejora de la resistencia a enfermedades infecciosas del organismo sobre huésped [13].

Los efectos inmunomoduladores generalmente se asocian con la utilización de cepas probióticas. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que algunos probióticos no viables (bacterias muertas) también son competentes para ejercer efectos sobre el sistema inmunológico.

Existen estudios que han demostrado que ciertos microoganismos tienen propiedades inmunomoduladoras. Se han mencionado en la literatura: *Lactobacillus casei, L. rhamnosus GG, L. acidophilus, L. delbrueckii subsp. bulgaricus, Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus thermophilus* que poseen propiedades inmunorreguladores [14].

1.2 Ecosistema TGI (Tracto gastrointestinal)

El TGI es un ecosistema complejo que está abierto a diferentes microorganismos exógenos. Se estima que hay entre 200-300 m^2 de superficie total mucosa, lo cual representa la mayor superficie del cuerpo que está en contacto con el medio ambiente [15]. El tracto gastrointestinal está formado por el epitelio gastrointestinal que posee una alianza estable con el sistema inmunológico. Estos componentes están unidos de forma permanente y se mueven juntos para asegurar una función y una actividad normal del ecosistema. Si alguno de los componentes del ecosistema falla, la alianza está deteriorada y, por tanto, diversas patologías gastrointestinales se pueden instalar [16].

Las interacciones que hay entre microorganismos y el ser humano pueden ser de tres tipos: simbiosis, comensalismo y patogenicidad [17]. El ser humano está protegido por medio de barreras físicas y químicas contra la microflora intestinal patógena formadas por el epitelio gastrointestinal [18].

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

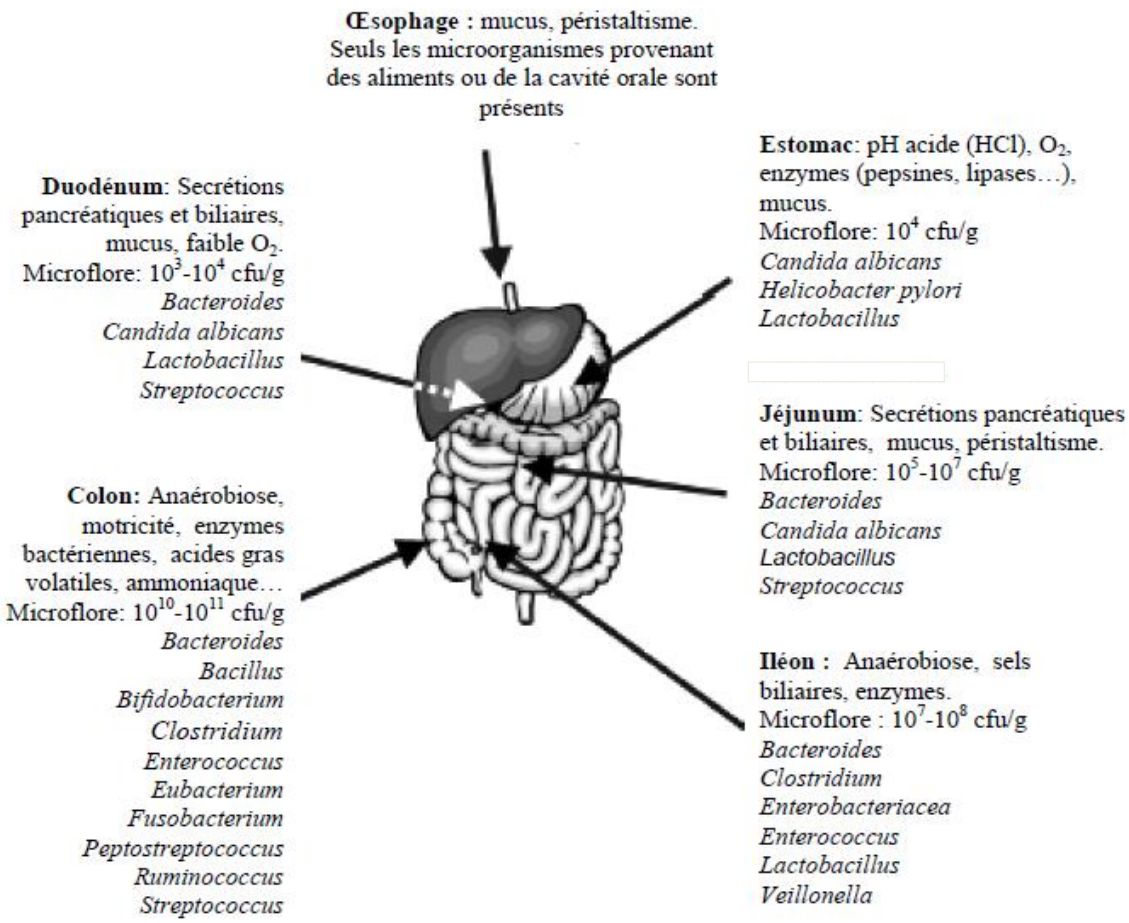


Figura I.2. Diagrama simplificado que muestra los compartimentos del sistema digestivo del hombre y la microflora.

Fuente: *Ouwehand & Vesterlund (2003)*[19].

1.3 Morfología y Condiciones

Las bifidobacterias son bacilos anaerobios estrictos (excepto algunas especies que pueden tolerar el oxígeno), Gram-positivos, no esporulados, no producen gas, son catalasas negativas (Excepto *B. Indicum* y *B. asteroides*) y con propiedades sacarolíticas. Sus nichos ecológicos son: el intestino del hombre y de animales, la cavidad oral y las aguas residuales [20]. Son de morfología variable según el medio de cultivo en el que se desarrollen, la forma característica es de un bastón con dos extremidades, en las que se puede observar dos ramas forma de "Y".

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

La temperatura de crecimiento de bifidobacterias en el ser humano o animal varía, respectivamente, de 36 °C a 38 °C y 41 °C a 43 °C [21]. Algunas especies son conservadas con condiciones más específicas en el ser humano, otras se encuentran en animales y en el medio ambiente.

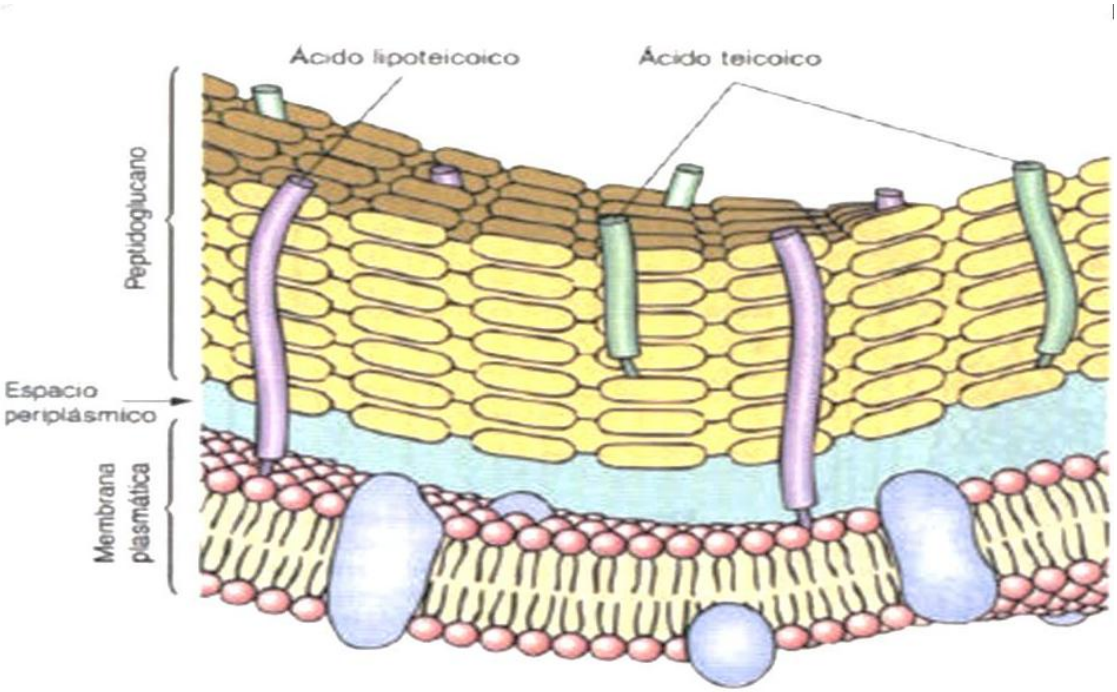


Figura I.3. Estrucutura de la envoltura celular de bacterias Gram-positivas.

Fuente: *Universidad Privada San Juan Bautista.* [22]

1.4 Especies

Las cepas de *Bifidobacterium* que se encuentran en los seres humanos incluyen: *B. catenulatum, B. adolescentis, B. longum, B. infantis, B. breve* [23]. Mientras que las que se encuentran en animales incluyen bifidobacterias como: *B. suis, B. thermophilum, B. animalis, B. pseudolongum* [24]. La variación y distribución de bifidobacterias en el TGI humano varía según la edad, así como se muestra en la Tabla I.1.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Tabla I.1. Distribución de diferentes especies de *Bifidobacterium* en el TGI del ser humano en relación a la edad.

Población	Especies menores	Especies mayores
Bebés alimentados de leche materna.		*B. longum* *B. infantis* *B. breve*
Bebés alimentados con biberón.	*B. bifidum*	*B. adolescentis*
Niños y adolescentes.		*B. infantis* *B. breve* *B. bifidium* *B. longum*
Adultos.	*B. bifidum*	*B. adolescentis*
Adultos mayores.		*B. adolescentis* *B. longum*

Fuente: *Ballongne,1993*. [25]

1.5 Metabolismo

Las bifidobacterias, desde un punto de vista fisiológico, se caracterizan por la actividad enzimática que poseen y que les permite utilizar una amplia variedad de azúcares, tales como: lactosa, galactosa, rafinosa, sacarosa, amilopectina, amilosa, xilano, etc. [10] y producir ácido láctico y ácido acético [26]. Las bifidobacterias presentan una característica que les permite diferenciarse de los lactobacilos, se trata de la producción de una enzima característica como es la fructosa 6-fosfato fosfocetolasa involucrada en la ruta metabólica de la D-fructosa-6-fosfato [27]. Esta enzima caracteriza principalmente a las bifidobacterias humanas, mientras que en animales se diferencia por los sustratos xilulosa-5-fosfato y fructosa 6-fosfato fosfocetolasa [28]. Otra enzima importante en la fermentación de azúcares fue identificada como β-galactosidasa, que cataliza las reacciones de hidrólisis y transgalactosilación [29]. Los métodos clásicos de identificación

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

de bifidobacterias que están basados en las propiedades fenotípicas y bioquímicas como la morfología celular, la fermentación de azúcares; no tienen una clasificación definitiva, debido a las imprecisiones observadas en los resultados del análisis. El desarrollo de nuevas técnicas basadas en la biología molecular ha permitido la identificación de la secuenciación del gen de ARN ribosomal (rRNA), principalmente el gen 16S rRNA, que permite identificar muchas especies que pertenecen al género *Bifidobacterium*. Esta secuenciación indica una similitud (identidad) de más del 93% a las secuencias de 16S rADN [30].

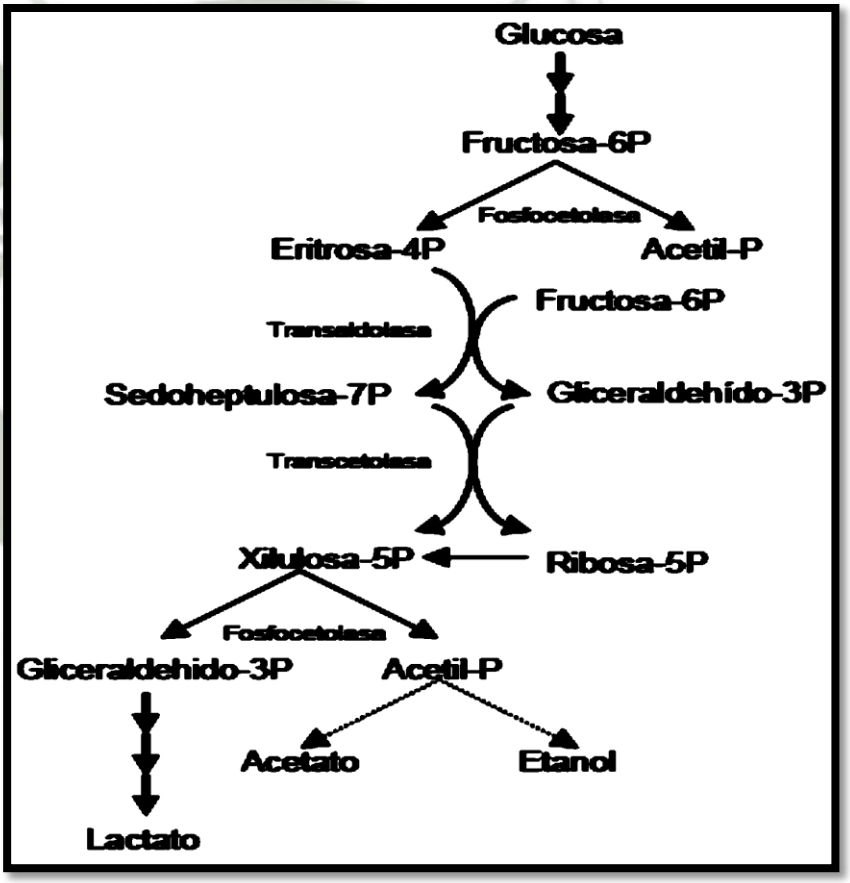


Figura I.4. Metabolismo de bifidobacterias.

Fuente: *Elaboración propia.*

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

1.6 Probióticos y Prebióticos

1.6.1 Probióticos

En el año 1907, Metchnikoff, desarrolla el concepto de "probióticos", quién a través de diferentes trabajos encontró en los campesinos búlgaros, grandes consumidores de leche, campesinos longevos y saludables. Por tal razón, Metchnikoff propuso la inclusión de bacterias vivas en alimentos (en especial bacterias productoras de ácido láctico) y de esta manera reducir trastornos intestinales, mejorar la salud y por lo tanto aumentar la esperanza de vida [31]. El término probiótico proviene de dos palabras griegas "pros" y "bios" que significa "a favor de la vida", con significado contrario a antibiótico "contra la vida". Este término fue introducido por primera vez por Lilly y Stillwell en el año 1965 para poder describir sustancias que son producidas por un microorganismo y que tienen la capacidad de estimular el crecimiento de otros microorganismos. Desde entonces, la mayoría de definiciones de probióticos se han dado en función de los efectos que ejercen sobre la salud. Según Parker, en el año 1974, los "probióticos" son microorganismos que ayudan a mantener el equilibrio de la flora intestinal. Esta definición abarca los microorganismos y metabolitos microbianos producidos, incluyendo a los antibióticos; este concepto fue modificado por Fuller en el año 1989 quien redefine a los probióticos como preparados microbianos vivos utilizados como aditivo alimentario y que tienen un efecto beneficioso sobre el huésped, mejorando la digestión y la higiene intestinal. Por último, de acuerdo con la definición adoptada por el grupo de trabajo formado por la Organización de las Naciones Unidas (ONU) para la agricultura y la alimentación y la Organización Mundial de la Salud (OMS) según el informe de la FAO/OMS en el 2002, los probióticos son microorganismos vivos administrados en cantidades adecuadas y son beneficiosos para la salud del huésped. Para ser considerado como probiótico debe tener las siguientes características:

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- Habitar de manera natural en el intestino.
- Tener la capacidad de colonizar el ambiente intestinal, persistir y multiplicarse.
- Ser capaz de adherirse a las células intestinales y reducir la adherencia de los microorganismos patógenos.
- Poseer un metabolismo activo y producir sustancias que inhiben a los patógenos como ácidos, H_2O_2 y bacteriocinas.
- No ser invasivo, cancerígeno y patógeno.
- Ser capaz de actuar como co-agregado para formar una flora normal equilibrada.
- Sobrevivir a los distintos procesos de producción tecnológicos.
- Mantener su sostenibilidad en el alimento y durante el tránsito intestinal [32].

En todas las definiciones antes mencionadas, el concepto de sostenibilidad aparece como un criterio de selección para los probióticos. Sin embargo, esta idea sigue siendo controvertida debido a que estudios recientes han demostrado que incluso las cepas no sostenibles, no viables de probióticos son capaces de ejercer algunos efectos positivos en la salud, incluyendo la estimulación de ciertas funciones inmunes [33].

1.6.2 Prebióticos

Hay componentes de la microflora intestinal, especialmente las bifidobacterias, son capaces de fermentar sustancias no digeribles como hidratos de carbono en el colon, debido a su importante poder sacarolítico [34]. Esta propiedad amplía el crecimiento y la actividad de microorganismos específicos en el TGI por influir de manera positiva en la salud del huésped. Los beneficios generados en el huésped por estas interacciones ayudaron a un nuevo concepto de “prebióticos” [35].

El concepto de prebióticos se desarrolló siguiendo el trabajo de Gibson en el año 1995, quien ha demostrado una estimulación selectiva del incremento de bifidobacterias en las personas que ingirieron inulina y oligofructosa.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Por lo tanto, los prebióticos fueron definidos como ingredientes alimentarios no digeribles, que poseen efectos benéficos en el huésped mediante la estimulación selectiva en el colon y la actividad de una o un número limitado de bacterias capaces de mejorar la salud del huésped. Los prebióticos han de ser no digeribles para poder utilizarlos como sustratos de bacterias específicas, esencialmente de bifidobacterias y lactobacilos, que son activos y mejoran la salud del huésped. Las fibras alimentarias tales como: polisacáridos, almidón, inulina, pectina, goma guar y los oligosacáridos no digeribles son fermentados por bacterias intestinales que tienen la capacidad de producir ácidos grasos de cadena corta como el ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico, que luego son utilizados por los tejidos del huésped como sustratos de energía o como factores de regulación celular [36]. Por ejemplo, el butirato no sólo se utiliza por las células del colon epitelial para obtener la energía, sino que también desempeña un papel importante en la regulación de los procesos celulares de proliferación y diferenciación [37].

Un ingrediente alimentario para ser considerado como prebiótico, debe reunir las siguientes características:

- No debe ser hidrolizado y absorbido en el tracto gastrointestinal.
- Ser selectivo para un número determinado de bacterias endógenas.
- Modificar la microflora intestinal mejorando su composición.
- Inducir efectos intestinales y sistémicos beneficiosos para la salud del huésped [38].

1.7 Efectos sobre la salud

Las bifidobacterias se utilizan como tratamiento con los llamados “probióticos”, lo contrario de los antibióticos.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

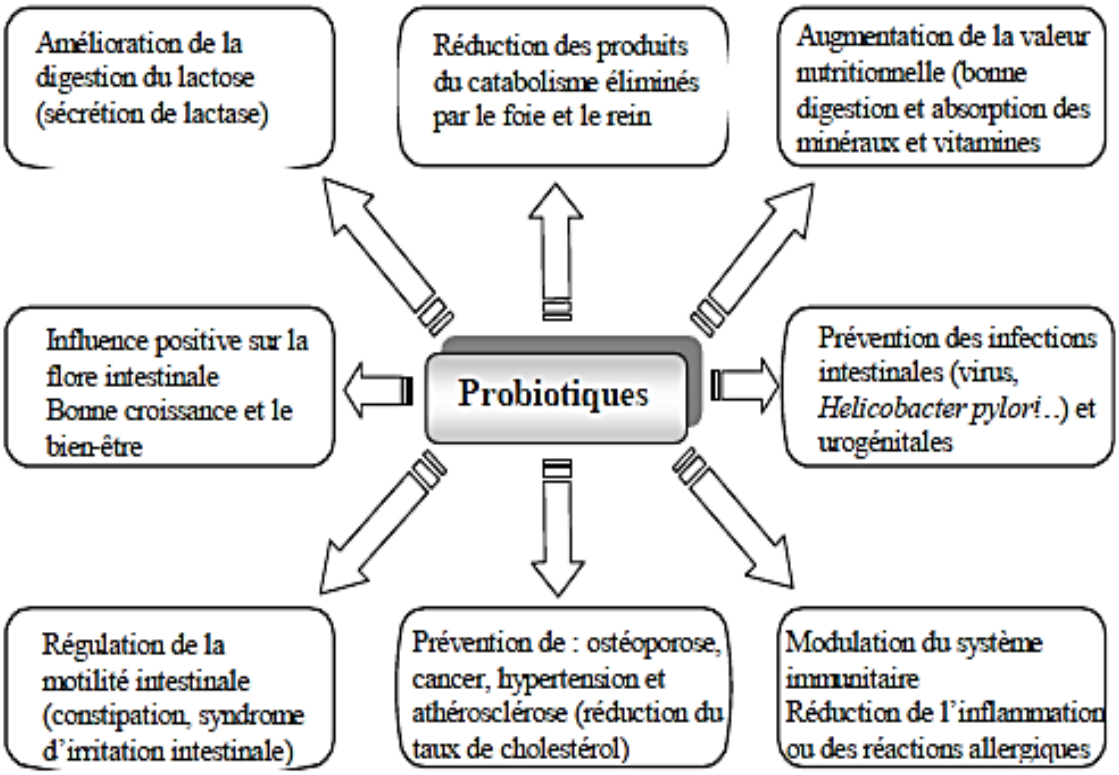


Figura I.5. Los principales efectos benéficos atribuídos a las bifidobacterias.

Fuente: *Mercenier et al. 2002* [6]**.**

Es importante indicar que la validez científica de estos efectos beneficiosos es variable. Para algunos efectos, la evidencia científica está acompañada por estudios clínicos y permitirá asignar determinadas propiedades saludables a los probióticos. Pero en otros casos, las investigaciones aún están en una etapa hipotética.

A continuación desarrollaremos algunos efectos de los probióticos en el organismo:

a) Los probióticos y las infecciones gastrointestinales: estudios clínicos demostraron que las infecciones del TGI provocadas por *Helicobacter pylori*, diarrea el viajero, diarrea por rotavirus, diarrea por antibióticos como la diarrea causada por *Clostridium difficile*, pueden ser equilibradas con el

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

uso adecuado de probióticos. Por ejemplo Wang et al. [39]. reportaron que el consumo regular de yogurt con *Lactobacillus acidophilus* o de *Bifidobacterium lactis* provoca una supresión eficaz de la infección causada *H. pylori.*

b) Los probióticos y la intolerancia a la lactosa: se indicó de que el consumo de leche o yogurt enriquecido con probióticos favorece la absorción de lactosa en pacientes con deficiencia de la enzima lactasa y reduce los síntomas digestivos debido a intolerancia a la lactosa.

c) Probióticos y el colesterol: estudios preliminares han demostrado que el consumo de yogurt o leche fermentada que contiene probióticos disminuye los niveles de colesterol en la sangre, y por lo tanto reducen los riesgos de la enfermedad cardíaca coronaria.

d) Los probióticos y la prevención de cáncer de colon: en relación con algunos estudios, las bacterias probióticas tienen la propiedad de inhibir el proceso que conlleva a la formación de cáncer de colon en seres humanos. De hecho, Matsumoto y Benno en el año 2004 indicaron que el yogurt que contiene *Bifidobacterium lactis* reduce la mutagenicidad en el intestino de los voluntarios en comparación con un placebo.

e) Los probióticos y enfermedades inflamatorias del intestino: procesos inflamatorios implicados en la patología del intestino humano tales como la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, son controlados con el uso de probióticos.

f) Los probióticos y la permeabilidad intestinal: la alteración de la permeabilidad intestinal (función de barrera) causada por infecciones, toxinas u otro factor, promueve la transferencia de antígenos aberrantes a través del intestino causando respuestas inmunes inapropiadas (reacciones inflamatorias o autoinmunes) [40]. En últimas investigaciones se

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

demostraron que el consumo de los probióticos estabiliza la función de la barrera del epitelio intestinal.

g) Los probióticos y la motilidad intestinal: la motilidad intestinal tiene un papel muy importante para reducir el crecimiento de microorganismos patógenos en el intestino. Los probióticos logran tener efectos reales sobre la motilidad intestinal, como reducir el tiempo de tránsito de los microorganismos patógenos [41]. Un estudio indicó que la ingestión de leche fermentada con *Bifidobacterium animalis* causa una reducción del tiempo de tránsito del contenido gastrointestinal en voluntarios. Mientras Verdu et al. informaron que el efecto del probiótico sobre la motilidad del intestino se trata de una atenuación de la hipercontractilidad post-infección del músculo. Ellos sugirieron que los probióticos pueden ser usados en el tratamiento del síndrome del intestino irritable.

En otros casos, se necesitan estudios científicos hipotéticos y más profundos para confirmar o anular estos efectos benéficos. Esto es específicamente cierto para los efectos de probióticos en el sistema inmune y para los cuales hay muy poca evidencia científica y se han realizado estudios clínicos para confirmar estas afirmaciones [42].

2. CULTIVO

2.1 Introducción

La mayoría de los aspectos nutricionales están relacionados al requerimiento de nitrógeno, vitaminas, factores de crecimiento y elementos metálicos por bifidobacterias. El rol importante de los factores bifidogenéticos fue revisado por Modler en el año 1997. La proliferación de bifidobacterias en el TGI inferior de los bebés, poco después del nacimiento, es estimulada por la glicoproteína componente de la kappa-caseína que está presente en el calostro y, en menor grado, en la leche humana. Según la edad, la ingesta de factores dietéticos bifidogenéticos cambia la especie y el número de

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

bifidobacterias que habitan en el TGI. Se encontró que la lactulosa también era un factor eficaz de crecimiento de *Bifidobacterium*, utilizada también como ingrediente funcional para la regulación intestinal.

Las bifidobacterias pueden utilizar una amplia gama de fuentes de carbono, tales como oligofructosa, inulina, y rafinosa, que son identificados como compuestos bifidogenéticos promotores del crecimiento [43]. Esto se fundamenta en la información de la secuencia de *Bifidobacterium longum* NCC2705, cuyo cromosoma codifica una gran variedad de genes de utilización de hidratos de carbono [44]. Sin embargo, poco se sabe acerca de los mecanismos de transporte de azúcar, la utilización y la regulación de las bifidobacterias. Un gen de sacarosa permeasa a partir de *Bifidobacterium lactis* fue encontrado como parte de un operón que es inducido por la sacarosa y rafinosa que está sujeto a represión de glucosa [45].

El aislamiento de un gen de fructosa quinasa, que también está reprimido por la glucosa, se ha relacionado con la utilización de fructosa en *Bifidobacterium longum* [46]. Se ha demostrado que *Bifidobacterium longum* NCC2705 preferentemente utiliza la lactosa sobre la glucosa cuando se cultiva en presencia de azúcares. Además, se muestra que el transporte de glucosa es regulado por la lactosa.

2.2 Tipos de Cultivo

Los medios de cultivo para el crecimiento de bifidobacterias han sido clasificados en no selectivos y selectivos:

- No selectivos: medio rico como el Agar Columbia suplementado con clorhidrato de cisteína (0,3 g/l) y glucosa (0,5 g/l) o Agar Iwata.

- Selectivos: existen dos tipos de selección por la búsqueda de *Bifidobacterium.*

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

1) Ácido: por ejemplo, medio Columbia acidificado por el ácido propiónico. Estos medios muestran el inconveniente de permitir el cultivo de lactobacilos y de enterococos, o de *Clostridium.* Es preciso controlar las colonias posteriormente del cultivo por medio de la coloración Gram. Por otro lado, algunas cepas de *Bifidobacterium* pueden no ser cultivadas.

2) Antibióticos: los antibióticos se utilizan como agentes selectivos para la investigación de *Bifidobacterium* en el agua. Para otras investigaciones, la kanamicina puede ser utilizada a la dosis de 75 µg/ml. Pero algunas cepas de *Bifidobacterium* son parcialmente inhibidas.

Los medios deben estar vertidos en placas Petri al momento de su utilización y ser conservados en cámaras anaerobias. [47]

2.3 Temperatura y pH

2.3.1 Temperatura

Se ha demostrado que las bifidobacterias tienen un crecimiento óptimo en temperaturas comprendidas entre 37°C y 41°C, con un desarrollo mínimo a 25-28°C; en un medio anaerobio estricto [48].

2.3.2 pH

Es importante considerar el pH para el desarrollo óptimo de las bifidobacterias, teniendo un óptimo crecimiento con pH comprendido entre 6 y 7, sin crecimiento por debajo de 4,5-5,0. Esto nos facilita la monitorización indirecta de la producción de ácidos por parte de las bifidobacterias, lo cual provoca el descenso del pH [49].

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

3. CUANTIFICACIÓN

3.1 Introducción

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tiene como base la amplificación exponencial de una fracción específica de ADN, utilizando esta fracción como molde para crear millones de copias de ADN. La PCR a tiempo real presenta diferencias con la PCR convencional, la primera nos permite monitorizar en cada ciclo la aparición del producto de ADN de la reacción mediante el uso de fluoróforos. Una vez realizada la copia del ADN molde se libera fluorescencia, siendo proporcional a la cantidad de ADN generado. [50]

3.2 PCR

PCR son las siglas en ingles de Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*).Esta técnica logra que una pequeña fracción de ADN se multiplique en millones de copias y de esta manera sea más fácil su detección. Esta técnica ha permitido realizar estudios genéticos en diversas áreas científicas. Por ejemplo, se emplea en biología molecular, para identificar cadenas genéticas de plantas, animales o microorganismos. En la medicina se usa primordialmente para identificar microorganismos agresores que se encuentran en nuestro organismo. [51]

3.3 PCR cuantitativa

Uno de los primeros métodos de PCR cuantitativa (qPCR), es la PCR cuantitativa competitiva. Este método consiste en la coamplificación de la plantilla del ADN diana y cantidades definidas de un patrón de ADN interno, conocido como competidor, que portan los mismos sitios de unión del cebador. De manera que, conociendo la cantidad de competidor inicial y que la eficacia de la amplificación es la igual en los ADN competidor y diana, la proporción de los dos productos de la PCR, es específica a la

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

proporción de los ADN diana y competidor que están en la mezcla antes de la amplificación.

La PCR en tiempo real es un método para la cuantificación del ADN, ésta tecnica se acopla a la emisión de una señal fluorescente, proporcional a la cantidad de PCR producido (amplicón) sintetizado en cada ciclo. La intensidad de la señal es proporcional a la cantidad de producto generado de PCR en cada ciclo sucesivo de la reacción.

La especificidad de la PCR en tiempo real va a depender de las sustancias utilizadas para producir y monitorizar la reacción de amplificación y del equipo utilizado para monitorizar la señal. Se han desarrollado diversas sustancias: colorantes de intercalación (bromuro de etidio, SYBR Green I) y sondas de hibridación (sondas TaqMan, sondas FRET, balizas moleculares, Scorpions y sondas TaqMan Minor Groove Binder). [52]

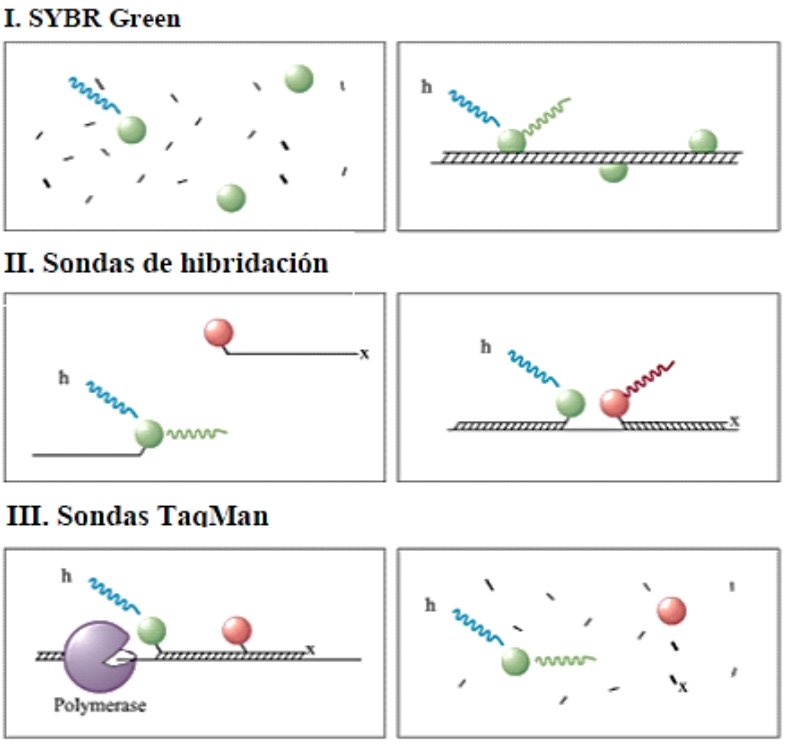


Figura I.6. Principios de PCR en tiempo real.

Fuente: *JCR EUROPEAN COMMISSION*. [52, 53]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

El sistema de PCR a tiempo real aporta mayor sensibilidad y robustez, de esta manera se puede cuantificar la cantidad inicial de ADN diana presente en la muestra.

La fluorescencia leída por el termociclador se encuentra en el eje de las ordenadas y el número de ciclos en el eje de las abscisas. La curva de amplificación está formada por tres fases:

- Primera fase: Producción de fluorescencia por debajo del nivel de detección del termociclador (ADN producto).
- Segunda fase: Aumento exponencial de fluorescencia, el valor de fluorescencia umbral está representado por una línea horizontal (línea Threshold o Umbral).
- Tercera fase (plateau): Fin de la reacción y estabilización de la emisión de fluorescencia [50].

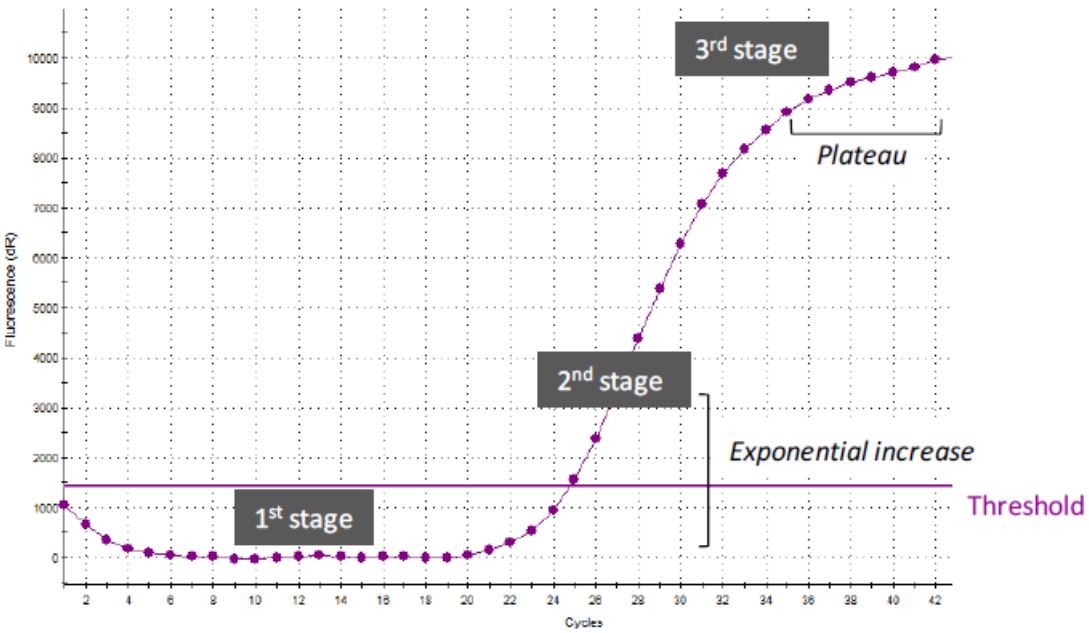


Figura I.7. Fases de PCR en tiempo real.

Fuente: *Guía de Interpretación de resultados PCR*. [50]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

4. COXSACKIEVIRUS

4.1 Introducción

La familia de los Picornaviridae, que se denominan con este nombre ya que se tratan de virus pequeños de RNA, incluye al género de los enterovirus. Los enterovirus (EV) tienen una cápside no encapsulada, incluyen 230 miembros y están distribuidos en diferentes géneros. Toman este nombre porque la gran mayoría habitan y se replican a nivel del TGI. Se conocen alrededor de 64 serotipos y también incluye a subgrupos que están representados en la siguiente tabla.

Tabla I.2. Género Enterovirus.

SUBGRUPOS DEL GENERO **ENTEROVIRUS**	**SEROTIPOS**
Poliovirus (PV)	3 TIPOS • P1, P2 y P3
Enterovirus de humanos A (HEV-A) Coxsackievirus A (CV-A) Enterovirus humano 71	12 TIPOS • CV-A2 al CV-A8, CV-A10, CV-A12, CV-A14, CV-A16 • EV 71
Enterovirus de humanos B (HEV-B) Coxsackievirus B (CV-B) Coxsackievirus del grupo A (CV-A) Echovirus (E) Enterovirus (EV)	36 TIPOS • CV-B1 al CV-B6 • CV-A9 • 28 tipos: E1-E7, E9, E11-E21, E24-E27, E29-E33 • EV 69
Enterovirus de humanos C (HEV-C) Coxsackievirus A (CV-A)	11 TIPOS • CV-A1, CV-A11, CV-A13, CV-A15, CV-A17 al CV-A22, CV-A24
Enterovirus de humanos D (HEV-D) Enterovirus (EV)	2 TIPOS • EV68, EV70
Enterovirus de bovino (BEV) Enterovirus de porcino (PEV-A) Enterovirus de porcino (PEV-B) Serotipos que no han sido asignados Enterovirus de simios (SEV) Enterovirus de simios (SEV) Enterovirus de simios (SEV)	• BEV-1, BEV-2 • PEV-8 • PEV-9, PEV-10 20 TIPOS • SEV-1 al 18 • SEV-N125 • SEV-N203

Fuente: *Universidad Autónoma de México.* [9]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

El poliovirus es el subtipo de los enterovirus, que es el agente productor de la poliomielitis, y este género encierra a otros virus patógenos tanto de animales como humanos. El subgrupo de Coxsackievirus está dividido en dos grupos A y B, que son capaces de producir diferentes enfermedades.

El dato más antiguo de esta enfermedad se encuentra en una estela egipcia de alrededor de 1300 A.C. en la que se ve a un sacerdote con una deformidad en la pierna, característica típica de poliomielitis. En el año 1909 se trasmitió la enfermedad por medio de la médula espinal de un caso de poliomielitis desarrollado en monos y en el año 1949 se cultiva el virus en células de primates, con estos datos fue posible demostrar la etiología viral de la poliomielitis.

El nombre del virus proviene del pueblo de Coxsackie que está localizado en el estado de Nueva York en donde se aisló, por primera vez, el virus de dos niños con parálisis en 1948. Los virus del grupo A provocan enfermedades como la herpangina, enfermedad de la mano, el pie y la boca y conjuntivitis hemorrágica aguda. Los del grupo B originan la pleurodinia (garra del diablo), además de pericarditis, miocarditis y meningoencefalitis. En la actualidad se conocen alrededor de 30 tipos antigénicos y dentro de las enfermedades que causan están la meningitis aséptica, cuadros febriles con/sin exantema y catarro común [9].

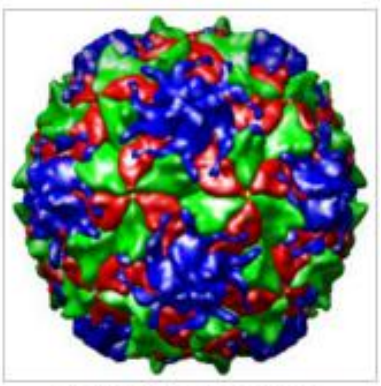


Figura I.8. Poliovirus Tipo 1.

Fuente: *Universidad Autónoma de México.* [9]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

4.2 Epidemiología

La epidemiología de la mayoría de enterovirus humanos es muy similar, varían según el clima, por ejemplo, en lugares donde presentan un clima templado, predominan en las estaciones de otoño y verano; sin embargo, en climas tropicales están presentes todo el año. La seroepidemiología de las infecciones que son provocadas por enterovirus, demuestra un aumento notable de la transmisión sobretodo en edades tempranas de poblaciones con bajo nivel socioeconómico. El hacinamiento y la falta de higiene aumentan el riesgo de la transmisión de estos agentes (vía fecal-oral). La transmisión que se da a través del agua puede presentarse como una extensión de la vía fecal-oral, donde el vector es el agua en lugar de las manos. La epidemiología clínica de estas infecciones provocadas por EV indica que la transmisión por vía respiratoria de estos virus no es tan relevante como la transmisión fecal-oral [54].

Ante la aparición de nuevos casos de Poliomielitis en el año 2010 en Kazakstán y Tayikistán, la OMS (Organización Mundial de la Salud) dio una Alerta Epidemiológica.

Una de cada 200 infecciones, es responsable de producir parálisis irreversible (generalmente se manifiesta en las piernas), entre un 5% y 10% causan la muerte por parálisis de músculos respiratorios.

Los casos de poliomielitis han disminuido claramente en un 99%, de los 350 000 casos evaluados en el año 1988 a 74 notificados en el año 2015. En la actualidad, esta enfermedad sigue siendo endémica en dos países, Pakistán y Afganistán, en comparación con los 125 países endémicos que se tenían registrados. Por cada niño infectado, todos los niños de la región, país; tienen el riesgo de contraer la poliomielitis. En la mayoría de países, los esfuerzos han incrementado con el fin de hacer frente a otras infecciones, gracias a la creación de sistemas eficaces de vigilancia e inmunización [55].

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA



Figura I.9. Deformidad en Extremidad Pierna Derecha por Poliovirus.

Fuente: *Universidad Autónoma de México.* [9]

En el año 2003, fue detectado el primer caso de poliomielitis en el Perú por el virus derivado de la vacuna, se notificó en el departamento de Moquegua y correspondía a una lactante inmunodeficiente, que presentaba Agammaglobulinemia congénita. El virus de este caso de poliomielitis fue aislado y tuvo una mutación de 1,2%, se ejecutaron acciones de vacunación y de vigilancia epidemiológica; no existiendo ningún caso secundario. En el año 2010, fue identificado un caso de poliomielitis en el Instituto Nacional de Salud del Niño (Lima – Perú), se trató de una lactante que presentaba hipogammaglobulinemia, el instituto de FIOCRUZ – Brasil aisló el virus en las muestras de heces del niño y se encontró que era un virus similar a la vacuna y no un derivado de la vacuna. En el año 2011 han sido notificados e investigados 81 casos de Parálisis Flácida Aguda (PFA), de los cuales tres casos fueron considerados por la Comisión Nacional Revisora de PFA como Poliomielitis Aguda Paralitica, se realizó el aislamiento del virus en el Instituto FIOCRUZ en Brasil [56].

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

4.3 Enfermedades

Los poliovirus, como el Coxsackievirus, infectan ciertos tipos de células nerviosas y durante la multiplicación de las mismas, pueden destruirlas afectando esencialmente a las células de las astas anteriores de la médula espinal; ante la presencia de casos graves también se ve afectada la sustancia gris, los cuernos posteriores y dorsales de la médula espinal. Las lesiones se localizan a nivel del hipotálamo y del tálamo.

Los órganos que están más afectados en el cerebro son: la formación reticular, núcleo vestibular, vermis cerebelar y el núcleo cerebelar profundo. La inflamación que ocurre en las células nerviosas es de forma secundaria. También se presentan cambios patológicos en el sistema nervioso como la hiperplasia y lesiones inflamatorias de ganglios linfáticos y de las placas de Peyer así como la de otros ganglios linfáticos que se encuentran en el intestino [9].

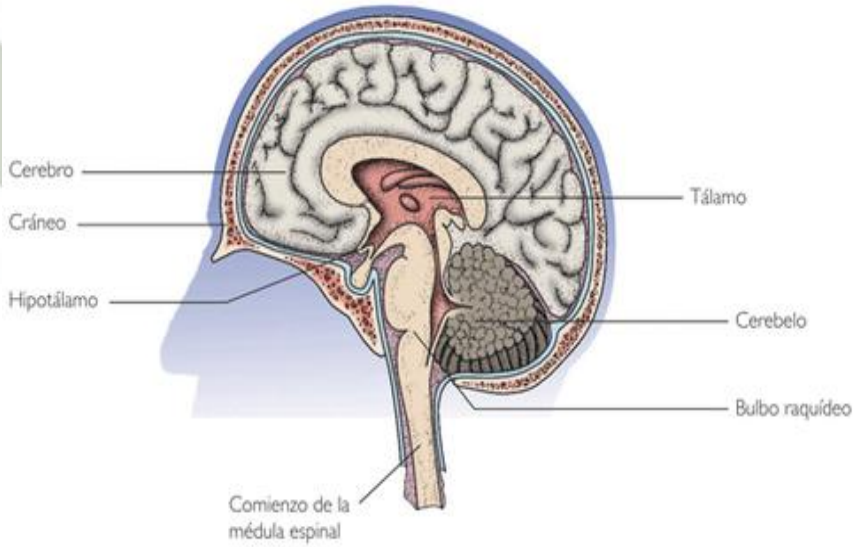


Figura I.10. Órganos afectados por Coxsackievirus.

Fuente: *Universidad Autónoma de México.* [9]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Tabla I.3. Enfermedades causadas por Coxsackievirus del Grupo A.

Enfermedades Grupo A
Herpangina
Faringitis aguda linfática
Meningitis aséptica
Diarrea infantil
Conjuntivitis aguda hemorrágica
Neumonía infantil
Resfriado común
Parálisis
Exantema
Enfermedad de mano-pie-boca

Fuente: *Universidad Autónoma de México.* [9]

Tabla I.4. Enfermedades causadas por Coxsackievirus del Grupo B.

Enfermedades Grupo B
Pleurodinia
Meningitis aséptica
Parálisis
Infección sistémica severa, meningoencefalitis y miocarditis
Pericarditis, miocarditis
Enfermedad en vías respiratorias superiores y neumonía
Enfermedad febril indiferenciada

Fuente: *Universidad Autónoma de México.* [9]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

4.4 Diagnóstico

El diagnóstico de laboratorio incluye exámenes de sangre rutinarios, donde puede haber glóbulos blancos elevados. Se realizan también los siguientes exámenes:

- Examen de líquido cefalorraquídeo.
- Lavado de garganta.
- Exámenes de sangre.
- El virus de la poliomielitis de rastro digital.

Una vez que el virus ha sido aislado, es probado por un examen especial llamado mapeo de oligonucleótidos (huella) o secuenciación genómica [57].

4.5 Prevención

La poliomielitis es una enfermedad que no tiene cura, pero que se puede prevenir mediante la administración de la vacuna antipoliomielítica por más de una vez. La vacuna puede conferir una protección de por vida [55].

Debido a la carencia de tratamientos específicos de infecciones por enterovirus (EV), los esfuerzos van dirigidos a la prevención. Se debe prestar atención al lavado de manos e higiene de niños y personas infectadas, así como sus familiares. En el caso de pacientes hospitalizados, observar el mismo cuidado con el personal de salud. En la actualidad, se utilizan a nivel mundial 2 tipos de vacunas:

1. Vacuna antipoliomielítica oral con virus vivos atenuados, desarrollada por Sabin, que combina los 3 tipos de poliovirus 1, 2 y 3.

2. Vacuna antipoliomielítica inactiva, desarrollada por Salk. Es una suspensión acuosa de las cepas 1, 2 y 3 de poliovirus inactivados en formalina [54].

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

En nuestro país se está culminando un barrido nacional contra la poliomielitis y el sarampión, ambas enfermedades han sido eliminadas, y estas medidas son parte de las acciones periódicas que deben realizarse para poder conservar los logros alcanzados [56].

4.6 Tratamiento

En la actualidad, no existe una terapia específica para combatir las infecciones por enterovirus. Se están realizando los últimos ensayos clínicos en humanos de una droga específica llamada anti-EV (pleconaril) que actúa bloqueando la liberación de ARN viral de la célula [54].

5. PROBIÓTICOS Y EL SISTEMA INMUNITARIO

Los probióticos tienen un papel crucial en la prevención y en la terapia de estas enfermedades al asegurar la maduración del sistema inmune en los niños y la modulación de la respuesta inmune en la edad adulta.

El sistema inmune responde a dos mecanismos:

- Inmunidad no específica (natural o innata).
- Inmunidad específica (adquirida o adaptativa).

Las células del sistema inmune no específico (innato), permite la iniciación de la respuesta inmune del huésped y la orientación del sistema inmune específico (adaptativo). Las células que son encargadas de la inmunidad están representadas por los linfocitos y células accesorias, como los macrófagos, células presentadoras de antígeno y células epiteliales (en algunos casos). Los linfocitos se encuentran en el sistema linfoide que está constituido por órganos primarios: timo y la médula ósea y secundarios: bazo y los ganglios linfáticos. El bazo provoca una respuesta contra los antígenos de la sangre, mientras que los nódulos linfáticos actúan contra los antígenos derivados de la linfa.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

La respuesta del sistema inmune implica tres procesos importantes: el reconocimiento de la partícula extraña, destrucción y la regulación de la respuesta inmune utilizando células especializadas y mediadoras (citocinas). La respuesta inmune no específica se lleva a cabo por los fagocitos (monocitos/macrófagos y neutrófilos) que reconocen, neutralizan y destruyen a los microorganismos patógenos. La respuesta específica es causada por los linfocitos B que secretan anticuerpos y linfocitos T productores de citocinas [59, 60, 61].

6. LÍNEA CELULAR HEP–2

Las células HEP–2, ejercen este nombre por el acrónimo de “Human Epidermoide 2”, esta línea celular son un tipo de células de cultivo neoplásicas que se utilizan para la realización de investigaciones científicas y como sustrato de varios tests de anticuerpos antinucleares. Las células HEP–2 son ampliamente utilizadas en los laboratorios de investigación y tienen un rol central en casos en los que se tiene sospecha de una enfermedad autoinmune. Los cultivos celulares de HEP-2 permite la determinación de varios anticuerpos paralelamente, teniendo alta sensibilidad. Las células deben desempeñar ciertas características: los núcleos celulares deben tener gran tamaño y ser de forma regular, la distribución no debe ser densa ni tampoco muy dispersa, deben tener entre 70 y 100 células por campo, debe poseer células en diferentes fases del ciclo celular, debe poseer fluorescencia de fondo mínima [62].

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se cultivaron cuatro cepas cuya lista está presentada en la tabla II.1. Estas cepas son de diferente origen: bebés griegos (Aténas), franceses (Lille) o cepa de referencia (DSMZ 20088: *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)*, aislada de las heces infantiles alemanas. Los códigos son atribuidos a dos cepas: el primero, PRSF corresponde a la colección de cepas recolectadas a nivel europeo en el contexto de la investigación sobre la seguridad de las cepas (Prosafe), la segunda corresponde al código de origen. Las cepas son conservadas a congelación -20°C en medio Rosenow (BioRad) (Anexo I).

Tabla II.1. Cepas utilizadas.

Cepa	Código	Origen
Bifidobacterium longum subsp.*longum*	PRSF_B084 CFPL 02169	Heces infantiles griegas (Aténas)
Bifidobacterium longum subsp. *infantis*	PRSF_B028 CFPL 02073	Heces infantiles francesas (Lille)
Bifidobacterium infantis	DSMZ 20088^{T}	Heces infantiles alemanas
Bifidobacterium longum	CFPL 117	Heces infantiles francesas (Lille)

Fuente: *Elaboración propia.*

- **CFPL :** *Collection de la Faculté de Pharmacie de Lille.*
- **PRSF:** Colección *Prosafe.*
- **DSMZ:** *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.*

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

1.2 MATERIALES Y REACTIVOS

1.2.1 Equipos Utilizados

Para la realización de este trabajo de investigación se utilizó una cámara anaeróbia a 37°C (La - Calhène), microscopio electrónico (Nikon Eclipse E600), centrífuga (Jouan – MR 22), PH-metro 526 (MultiCal), cabina de flujo laminar para PCR (AirClean 600 PCR workstation), equipo de qPCR (Thermocycleur Mastercycler realplex², Eppendorf), espectrofotómetro (Thermo Scientific multiskan EX).



Figura II.1. Cabina de flujo laminar para PCR.

Fuente: *Laboratorio BIFINOVE Lille – Francia.*

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

1.2.2 Reactivos

Medio Rosenow cisteína (BioRad), medio Columbia (Difco), medio MRS (Becton Dickinson), medio MIL y medio Mixto (Facultad de Farmacia - Lille), solución Ringer, Mix *SYBR Green* qPCR, cebadores descritos en la publicación de V.Cleusix y al. (2010), kit de Tejidos NucleoSpin ® (Macherey Nagel, Francia), línea celular de células HEP–2.

1.3 LUGAR DE INVESTIGACIÓN

La investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología y Virología de la Facultad de Farmacia, en la Universidad de Lille 2 Droite et Santé, también se realizaron investigaciones en el laboratorio de BIFINOVE, Lille – Francia.

2. METODOLOGÍA

2.1 Optimización del cultivo bacteriano

Los tubos de caldo Rosenow parafinado son descongelados a temperatura ambiente. Se le atribuye el número G0 (generación cero).

Después de la descongelación, utilizando una pipeta estéril, 1 ml de medio de cultivo se transfiere estérilmente a un tubo de caldo de Rosenow (que representa la generación G1). El caldo se regeneró previamente en un baño de agua hirviendo (baño de agua a 100 °C) durante 20 minutos y se enfrió durante 10 minutos. La temperatura debe estar por debajo de 45 °C para permitir el cultivo de bifidobacterias. Los tubos con caldo Rosenow que fueron sembrados se incubaron a 37 °C durante 48 horas en una cámara anaeróbica. El cultivo de las bifidobacterias se reconoce por el viraje de color rosa del caldo (disminución del pH debido a la producción de ácidos acético y láctico). Ambas cepas DSMZ 20088^{T} y CFPL 117 no fueron cultivadas fácilmente en medio Rosenow. Por lo contrario, las cepas CFPL 02169 y CPFL 02073 crecieron fácilmente en medio Rosenow.

Sin embargo, otras bacterias, incluyendo lactobacilos pueden inducir un color rosa por la producción de ácido. La pureza de las cepas se confirmó

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

mediante el cultivo en agar Columbia (Difco) (Anexo II) suplementado con glucosa (5,0 g/L) y clorhidrato de cisteína (0,3 g/L). Después de la incubación anaeróbica a 37 °C, las colonias se tiñeron con tinción de Gram. La lectura permite confirmar la presencia de bacilos de forma irregular más corta que las observadas con los lactobacilos.

El objetivo es adaptar las cepas en el medio de cultivo adecuado para la producción de bifidobacterias. Pero este medio de cultivo (Columbia) se compone de lactosa mientras que el medio Rosenow se compone de glucosa. En un primer momento, se trató de adaptar las cepas en el medio sin cerebro o mármol (Rosenow) para inducir la tolerancia a los productos ácidos. En un segundo paso, se verificó que las cepas se adapten en presencia de lactosa y glucosa.

- Adaptación de medio Columbia y MRS:

Las dos cepas CFPL 02169 y CFPL 02073 son sembradas en caldo Columbia (Difco) suplementado con glucosa (5,0 g/L) y clorhidrato de cisteína (0,3 g/L), El caldo se regeneró previamente en un baño de agua hirviendo (baño a 100 °C) durante 20 minutos y se enfrió durante 10 minutos. La temperatura debe estar por debajo de 41 °C para permitir el cultivo de bifidobacterias. Los tubos y placas en medio Columbia que fueron sembrados se incubaron a 37 °C durante 48 horas en una cámara anaeróbica. Se realizó el mismo procedimiento para el cultivo en medio MRS.

La pureza de las cepas se confirmó mediante cultivo en agar Columbia (Difco) suplementado con glucosa (5,0 g/L) y clorhidrato de cisteína (0,3 g/L). Después de la incubación anaeróbica a 37 °C, las colonias se tiñeron con tinción de Gram. La lectura permite confirmar la presencia de bacilos de forma irregular más corta que la observada con los lactobacilos.

Las Placas Petri se leen después de 48 horas de crecimiento. Se observa la aparición de colonias de color crema, redondas con un diámetro de 2 mm. La lectura al microscopio después de la coloración Gram, nos permite

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

constatar la presencia de forma bífida. Repetiremos el cultivo en caldo Columbia (hasta G11) y MRS (hasta G3) (Anexo III).

Con los resultados obtenidos se obtendrá una curva comparativa de crecimiento bacteriano.

- Adaptación a los medios MIXTO y MIL

A raíz de la adaptación al medio Columbia, se trató de adaptar la cepas en medio MIXTO (glucosa + lactosa) (Anexo IV) y MIL (sólo lactosa) (Anexo V). Las siembras se realizan a partir del medio Columbia generación G11. El medio MIXTO sembrado (G1) se incubó a 37 °C en la cámara anaerobia (Anexo VI) durante 24 horas y luego se cultivaron a partir del medio MIXTO G1 cuatro veces en medio MIL (G1 - G4). Durante la incubación, en determinados momentos una parte de los medios sembrados en placas Petri fueron contados, para tener una referencia del número de bifidobacterias. (Anexo VII)

- Conteo de colonias:

Para ello, se ha creado una serie de diluciones de Ringer (Anexo VIII) (primera generación (G2–G5 MRS/G9 Col.) diluido a ¼ y suplementado con clorhidrato de cisteína (0,3 g/L) de solución de Ringer, siempre se regenera durante 20 minutos en agua hirviendo y se enfría antes de su uso. Se enumera a partir de diluciones decimales: 10^{-1}, $10^{-2,}$ 10^{-3}, 10^{-4}, y 10^{-5} (tubos) y 10^{-1}, $10^{-2}10^{-3}$, 10^{-4},10^{-5} y 10^{-6} (Placas Petri).

Las placas y tubos de ambas cepas son puestos en estufa anaerobia a 37°C, tomando en cuenta tiempo “cero”, “18h”, “24h” para poder obtener la curva de crecimiento bacteriano. Se considera sólo las diluciones 10^{-3}, 10^{-4}, y 10^{-5}, obtenemos un promedio, aplicamos la regla $30<N<300$ y realizamos el cálculo de logaritmo.

Con los resultados obtenidos se obtendrá una curva comparativa de crecimiento bacteriano.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Esta curva se realizó con ambas cepas CFPL 02169 y CFPL 02073; consideramos para la dilución la G2 del medio MRS y G6 del medio Columbia

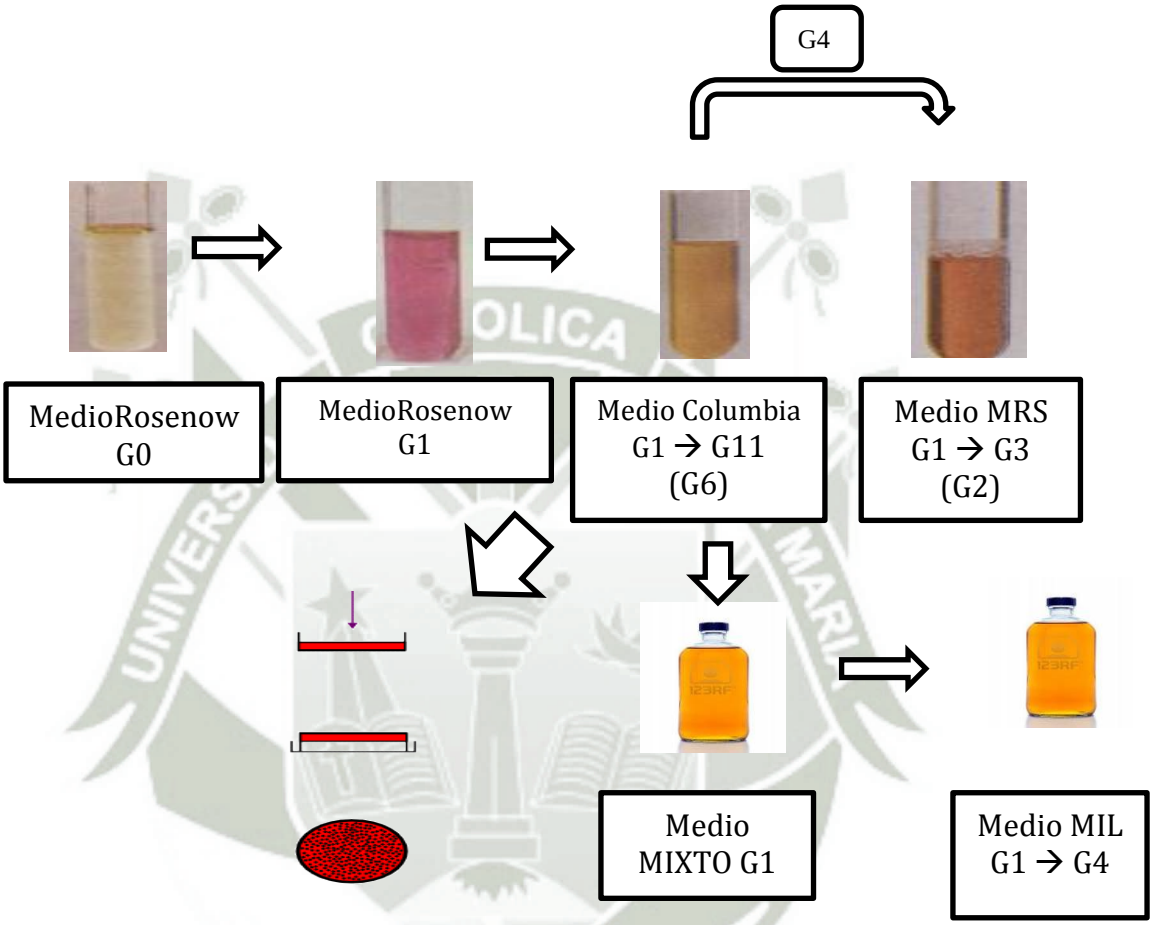


Figura II.2. Proceso de cultivo de las cepas en diferentes medios.

Fuente: *Elaboración propia.*

Realización de diluciones decimales para la extracción de ADN bacteriano, cuantificación por qPCR y pruebas antivirales

- Homogenizar la suspensión microbiana (agitación con movimiento circular durante unos 10 segundos evitando la introducción de aire).
- Abrir y flamear en la llama del mechero la abertura del tubo.
- Tomar 1 ml de suspensión con una pipeta de plástico estéril. No insertar la pipeta en la suspensión de más de 1 cm.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

- Flamear en el mechero y cerrar el tubo. Es aconsejable colocar el tubo en un estante para diferenciar de la muestra que ya fue diluida.
- Abrir el tubo de 9 ml de diluyente (solución de Ringer), flamear en el mechero, e introducir el volumen tomado (en la pared sin tocar el líquido). Evitar el contacto entre la pipeta que contiene el inóculo y el diluyente estéril.
- Flamear en el mechero y cerrar el tubo, desechar la pipeta en el tanque de lejía.
- Cada dilución requiere un tubo de dilución de 9 ml y de una pipeta de 1 ml estéril. Por lo tanto, la realización de una serie de diluciones de 10^{-5} requiere: 5 tubos y 5 pipetas. La siguiente dilución se lleva a cabo como se describe antes, pero partiendo del tubo de la dilución anterior.
- Una alícuota (100 ul) de cada dilución se extendió sobre un agar Columbia preincubado en la cámara anaeróbica o recién preparado.

Siembra en superficie

- Homogenizar la dilución que tomaremos (la más grande).
- Tomar un volumen preciso (1 ml) utilizando una pipeta de 1 ml estéril y colocar 3 gotas de la dilución en el centro de la superficie del medio de agar Columbia suplementado con glucosa (5,0 g/L), y clorhidrato de cisteína (0,3 g/L).
- Extender el volumen añadido con cuentas de vidrio en todo el agar con movimientos circulares, horizontales y verticales. Al finalizar vaciar las bolas en el tanque de lejía, se incuban las placas petri en la cámara anaeróbica a 37 °C hasta la aparición de colonias.
- Después de 48 horas de incubación a 37 °C en una cámara anaeróbica, se leen las placas y se cuentan las colonias.

El propósito de la técnica de conteo de colonias en las placas es determinar la concentración de bacterias en la preparación inicial. Requieren de una o varias diluciones decimales. Para esta ocasión se utiliza un medio sólido para lograr nuestro conteo.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Cada bacteria aislada da lugar a una colonia o UFC "unidad formadora de colonias".

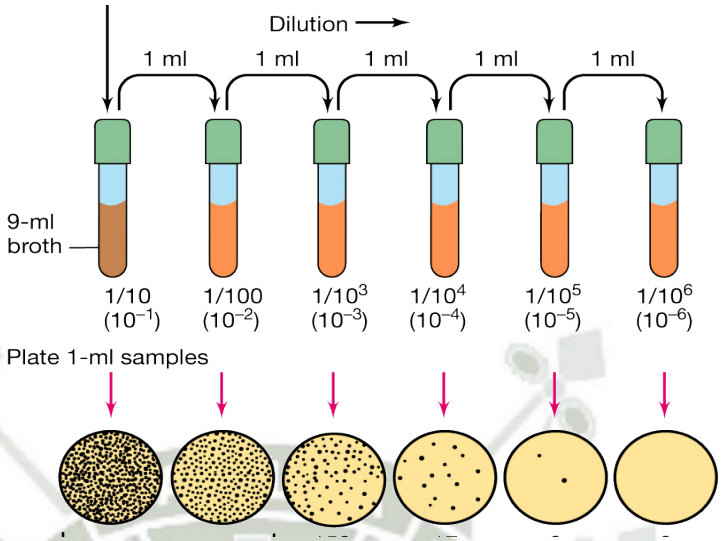


Figura II.3. Dilución y conteo de bifidobacterias.

Fuente: *Elaboración propia.*

2.2 Medición de pH

Durante el cultivo en medio MIL, extraemos un volumen determinado de todas las series cultivadas para medir el pH con el fin de visualizar el metabolismo de *Bifidobacterium longum* mediante la monitorización indirecta del ácido láctico y la secreción de ácido acético que provoca el descenso del pH. Se utiliza PH-metro 526 (MultiCal). La calibración se realiza de manera convencional por 2 puntos, calibrados previamente con las soluciones tampón estándar a pH 7 y pH 4.

2.3 Influencia del poder tampón

Tanto el medio MIXTO como el medio MIL dieron cultivos de bifidobacterias no satisfactorios, para lo cual es necesario el desarrollo de un nuevo medio de cultivo. Para obtener una gran cantidad de bifidobacterias, es necesario compensar la cantidad de ácido formado ya que a una fuerte concentración disminuye la multiplicación bacteriana. De acuerdo a la

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

bibliografía es necesario probar el poder tampón de soluciones salinas. La lista de ensayos se muestra en la siguiente tabla:

Tabla II.2. Lista de las pruebas.

Ensayo	Solución
1	K_2HPO_4 (0,38g/100mL)
	KH_2PO_4 (0,30g/100mL)
2	K_2HPO_4 (0,38g/100mL)
	KH_2PO_4 (0,30g/100mL)
	Acetato de Amonio (0,20g/100mL)
3	K_2HPO_4 (0,38g/100mL)
	KH_2PO_4 (0,30g/100mL)
	Acetato de Amonio (0,20g/100mL)
	Lactalbúmina (0,20g/100mL)
4	K_2HPO_4 (0,38g/100mL)
	KH_2PO_4 (0,30g/100mL)
	Acetato de Amonio (0,20g/100mL)
	Lactalbúmina (0,40g/100mL)
5	K_2HPO_4 (0,38g/100mL)
	KH_2PO_4 (0,30g/100mL)
	Acetato de Amonio (0,38g/100mL)
6	K_2HPO_4 (0,38g/100mL)
	KH_2PO_4 (0,30g/100mL)
	Acetato de Amonio (0,5g/100mL)

Fuente: *Elaboración propia.*

Después de tener la solución preparada y después de comprobar el pH de la solución (6,8), el principio es agregar alícuotas de 0,5 ml de HCl 3M y medir el pH después de cada adición. (Anexo IX)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

2.4 Extracción de ADN bacteriano

El método utilizado en el laboratorio se basa en el kit NucleoSpin® TISSUE cuyo protocolo se resume en la figura II.4. (Anexo X)

NucleoSpin® Tissue

1	Prepare sample		Cut 25 mg into small pieces
2	Pre-lyse sample		180 µL T1 25 µL Proteinase K 56 °C, 1–3 h
3	Lyse sample		200 µL B3 70 °C, 10 min
4	Adjust DNA binding conditions		210 µL 96–100 % ethanol
5	Bind DNA	 	Load all 11,000 x *g*, 1 min
6	Wash silica membrane	 1st and 2nd 	1st wash 500 µL BW 2nd wash 600 µL B5 11,000 x *g*, 1 min
7	Dry silica membrane		11,000 x *g*, 1 min
8	Elute highly pure DNA	 	100 µL BE (70 °C) RT, 1 min 11,000 x *g*, 1 min

Figura II.4. Proceso de extracción de ADN.

Fuente: *Kitt NucleoSpin®Tissue.*

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

2.5 Preparación de las muestras para realizar la Cuantificación Absoluta de los Genes xilulosa-5-fosfato/fructosa-6-fosfato fosfocetolasa por la técnica molecular qPCR.

Para cuantificar bifidobacterias, es posible cuantificar la carga bacteriana por qPCR. Este método es, por tanto, interesante para cuantificar los niveles de bifidobacterias en las suspensiones para la prueba antiviral. Por consiguiente, el primer paso es la extracción del ADN bacteriano. Este procedimiento permite la extracción de ADN total de bacterias. Esto ayuda a deshacerse de los inhibidores de la PCR presentes en tales muestras, de ese modo se tendrá una mejor eficacia de la extracción y mediciones de densidad óptica mejoradas 260/280 nm y 260/230 nm.

Las respectivas proporciones de ADN son puros aproximadamente en valores de 1,8 y 2,0.

Para el trabajo de investigación se utilizó:

- Termociclador de marca Mastercycler realplex2 (Eppendorf).
- Mix AB solute Blue qPCR SYBR Green como trazador de fluorescencia de ADN bacteriano.
- Cebadores descritos en la publicación de V.Cleusix y al. (2010) dirigida al gen de la xilulosa-5-fosfato/fructosa-6-fosfato fosfocetolasa. La secuencia del cebador hacia adelante es ATCTTCGGACCBGAYGAGAC y la secuencia del cebador en sentido contrario es CGATVACGTGVACGAAGGAC.

Seguidamente las muestras y los estándares fueron llevadas a la sala de ciclaje para realizar la qPCR. Para esta prueba se utilizó equipo de qPCR Thermocycleur Mastercycler realplex² Eppendorf en el cual se introdujo el protocolo de ciclaje. (Tabla III.3., protocolo de PCR).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Tabla II.3. Composición mix para la qPCR.

Composición del mix para qPCR	Cantidad
Master Mix Syber green 2x	12,5 µL
Cebador FWD: 2,5µL- Cebador REV 2,5µL	5,0 µL
Agua biológica molecular	2,5µL
Volumen de ADN	5µL
Volumen total reaccional	25 µL

Fuente: *Elaboración propia.*

Tabla II.4. Ciclaje para la qPCR.

Pasos	Temperatura	Tiempo	
Activación de la Polimerasa.	95°C	15 minutos	
Desnaturalización.	95°C	45 segundos	
Hibridación.	62°C	45 segundos	40 ciclos
Extensión.	72°C	45 segundos	
Extensión Final.	72°C	7 minutos	

Fuente: *Elaboración propia.*

2.6 Análisis de la actividad antiviral

Para determinar la eficacia antiviral de las bifidobacterias se investigaron tres condiciones:

- Pre-incubación de las bacterias con células HEP-2 durante una hora, seguido por el virus Coxsackie B4 infección (CVB4).
- Pre-incubación de las bacterias con virus Coxsackie B4 (CVB4) durante una hora, a continuación, infectado células HEP-2.
- La co-incubación con bacterias, células HEP-2 y CVB4.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Para su determinación se utilizó:

- 50µl de células HEP–2 (2,5 x 10^5 células/ml)
- Bifidobacterias con diluciones de 10^{-3} y 10^{-2}.

Se realizó la medida de la viabilidad celular por la técnica de cristal violeta y luego se midió la absorbancia por espectrofotómetro.

2.7 Análisis Bioinformático de secuencias de bifidobacterias

Los primeros resultados antivirales que muestra la bibliografía es el interés de la molécula bífida ya conocida por sus actividades inmunomoduladoras. En primer lugar se tuvo que localizar el gen en su ambiente genético mediante el uso de análisis bioinformático de los genomas ya descritos en sitios públicos. En segundo lugar, los grupos que contienen secuencias genéticas se compararon para identificar el grado de variabilidad genética.

Para realizar el análisis bioinformático, utilizamos herramientas como BLAST *(Basic Local Alignment Search Tool*), puestos a disposición del público por la American Library GENBANK gestionado por el sitio NCBI (Centro Nacional de Información sobre Biotecnología) y la base de datos japonesa KEGG (Kyoto Enciclopedia de genes y genomas, www.genome.jp/kegg/).

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) encuentra las regiones de similitud entre las secuencias de ADN o proteínas. El programa compara nucleótidos o bases de datos de secuencias de proteínas y calcula la significación estadística de los resultados. BLAST se puede utilizar para inferir las relaciones funcionales y evolutivas entre secuencias, así como ayudar a identificar a los miembros de las familias de genes. [63]

La base de datos *GenBank* está diseñada para proporcionar y promover el acceso a la comunidad científica a la información completa más actualizada

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

sobre la secuencia de ADN. Por lo tanto, en el NCBI no hay restricciones en el uso o la distribución de datos *GenBank*.

La página web KEGG es un recurso de base de datos para la comprensión de las funciones y utilidades del sistema biológico y fisiológico, tales como la célula, organismo y la información sobre ecosistemas a nivel molecular, en particular conjunto de datos a gran escala molecular generado por la secuenciación del genoma y otras tecnologías experimentales de alto rendimiento. [64]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Conteo de bifidobacterias

Para contar las colonias de manera estadísticamente representativa utilizamos los resultados de las placas petri en las que el número de colonias está comprendido entre 30<N<300. Los resultados se expresan como logaritmo del número de UFC (unidades formadoras de colonias) por ml de caldo.

Observamos que en la prueba realizada en caldo MRS, la proliferación de las dos cepas es diferente (Tabla III.3) Así, la cepa CFPL 02073 aumenta su población en el caldo MRS en un factor de 10 (1 log) por 18h, mientras que los aumentos en la cepa CFPL 02169 son de la misma manera en 24 horas.

El aumento de la población CFPL 02169 es más rápido en Columbia pero no es estable debido a que el conteo a 24h es menor que la obtenida en 18h. Por el contrario, la cepa CFPL 02073 prolifera en Columbia y alcanza el mismo nivel que en caldo MRS después de 24 horas de cultivo.

Una vez seleccionado el número de colonias que esté dentro de la regla mencionada se realiza el cálculo para obtener UFC por ml.

$$N = \#colonias \times 10 \times 10^{n-1(dilución)}\ UFC/ml$$

Nos interesa las diluciones con tiempo de 18 horas, ya que es nuestra fase estacionaria, el mayor crecimiento de bifidobacterias; a 24 horas tenemos un decrecimiento bacteriano. Es por ello, importante hacer un correcto conteo de colonias para poder saber en qué fase nos encontramos y establecer el tiempo de mayor crecimiento bacteriano. A tiempo de 18 horas nos aseguramos que el 80 - 90 % de bacterias están vivas, a 24 horas hay mayor cantidad de bacterias muertas y no nos sirve porque no va a tener un comportamiento y producción adecuada para los análisis respectivos.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Tabla III.1. Número de colonias a Tiempo cero, 18 horas y 24 horas.

CFPL 02169	DILUCIÓN	MRS G2	UFC/ml	COL G6	UFC/ml
0 h	10^{-3}	208	$6,8*10^{-7}$	994	
	10^{-4}	160		480	
	10^{-5}	186		167	$1,67*10^{-8}$
18 h	10^{-3}				
	10^{-4}	968		992	
	10^{-5}	152	$1,52*10^{-8}$	400	$4*10^{-8}$
24 h	10^{-3}	1600		1872	
	10^{-4}	1424		1552	
	10^{-5}	784	$7,84*10^{-8}$	288	$2,8*10^{-8}$
CFPL 02073					
0 h	10^{-3}	1179		1	$1*10^{-4}$
	10^{-4}	336		1	
	10^{-5}	40	$4*10^{-7}$	1	
18 h	10^{-3}				
	10^{-4}	1024		520	
	10^{-5}	512	$5,12*10^{-8}$	168	$1,68*10^{-8}$
24 h	10^{-3}	2784		3536	
	10^{-4}	1088		1216	
	10^{-5}	752	$7,52*10^{-8}$	736	$7,36*10^{-8}$

Fuente: *Elaboración propia.*

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Tabla III.2 Número de colonias expresadas en UFC/ml.

CFPL 02169	MRS G2	COL G6
0	$6{,}8*10^{-7}$	$1{,}67*10^{-8}$
18	$1{,}52*10^{-8}$	$4*10^{-8}$
24	$7{,}84*10^{-8}$	$2{,}8*10^{-8}$

CFPL 02073	MRS G2	COL G6
0	$4*10^{-7}$	$1*10^{-4}$
18	$5{,}12*10^{-8}$	$1{,}68*10^{-8}$
24	$7{,}52*10^{-8}$	$7{,}36*10^{-8}$

Fuente: *Elaboración propia.*

Tabla III.3 Número de colonias expresadas en log UFC/ml.

Generación	Tiempo	Caldo	CFPL02169	CFPL02073
G2	0	MRS	7,83 log ufc/ml	7,60 log ufc/ml
G2	18	MRS	8,18 log ufc/ml	8,71 log ufc/ml
G2	24	MRS	8,89 log ufc/ml	8,88 log ufc/ml
G6	0	Col.	8,22 log ufc/ml	ND (<4,00)
G6	18	Col.	8,60 log ufc/ml	8,23 log ufc/ml
G6	24	Col.	8,45 log ufc/ml	8,87 log ufc/ml

Fuente: *Elaboración propia.*

* ND: No detectado

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Si representamos los resultados como una curva, las tendencias parecen más pronunciadas. De particular interés, la tasa más lenta de crecimiento es en el medio MRS de la cepa CFPL 02169. Por lo contrario, la cepa CFPL 02073 parece ser menos sensible a la composición del medio.

En medio Columbia con la cepa CFPL02169 notamos que a 24 horas empieza a descender pero con medio MRS hay un aumento a 24 horas. Es la misma bacteria que presenta preferencias por algún medio de cultivo.

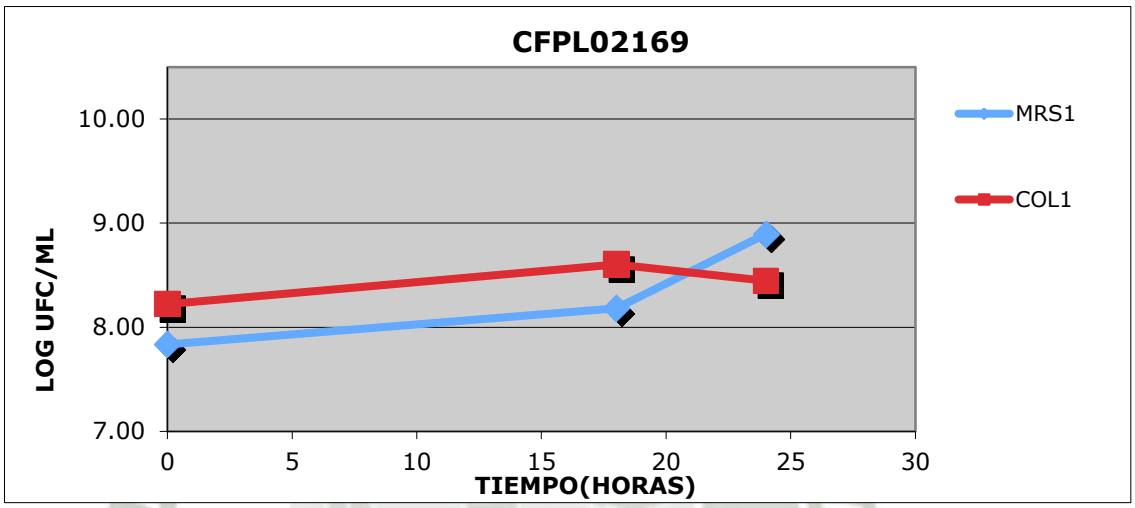


Figura III.1. Curva de crecimiento bacteriano de la cepa CFPL 02169.

Fuente: *Elaboración propia.*

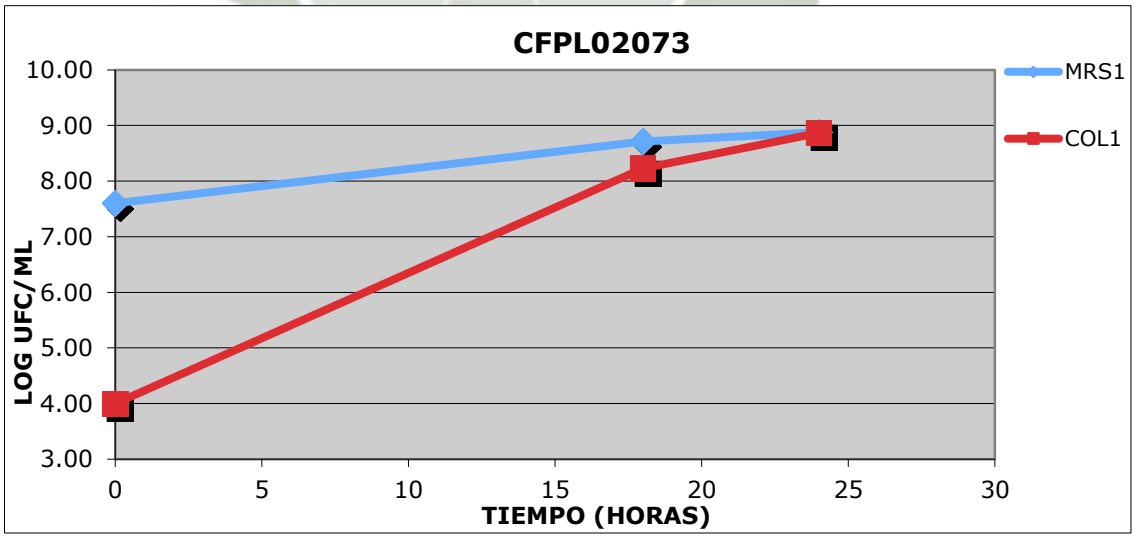


Figura III.2. Curva de crecimiento bacteriano de la cepa CFPL 02073.

Fuente: *Elaboración propia.*

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

2. Medición de pH

La medición de pH en presencia de ácido nos ayuda a determinar el poder tampón y predecir si las bifidobacterias crecerán fácilmente en el medio MIL y MIXTO. De hecho, estas bacterias son ácido productoras y por lo tanto las bacterias pueden ser inhibidas por producto del exceso de ácido.

Si tenemos en cuenta el pH obtenido tras la fermentación de la lactosa (MIL) o la mezcla de lactosa/glucosa (MIXTO) por las cepas, observamos que son sensibles con la cepa CFPL 02169 excepto por el medio MIL G2 (segunda generación MIL).

Tabla III.4 Medición de pH cepa CFPL 02169.

Cepa	Caldo	Tiempo	pH
CFPL 02169	MIXTO G1	48 h	4,39
CFPL 02169	MIL G1	72 h	4,39
CFPL 02169	MIL G2	24 h	5,77
CFPL 02169	MIL G3	24 h	4,35
CFPL 02169	MIL G4	24 h	4,4

Fuente: *Elaboración propia.*

Para la cepa CFPL 02073, los valores de pH son homogéneos. Por lo contrario, vemos que el pH se mantiene en aproximadamente 4,32 incluso después de 72 horas de incubación.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Tabla III.5 Medición de pH cepa CFPL 02073.

Cepa	Caldo	Tiempo	pH
CFPL 02073	MIXTO G1	48 h	4,41
CFPL 02073	MIL G1	72 h	4,32
CFPL 02073	MIL G2	48 h	4,39
CFPL 02073	MIL G3	24 h	4,45

Fuente: *Elaboración propia.*

A partir de la generación 3 (G3 MIL) notamos un débil crecimiento bacteriano.

Es de especial importancia la medida de pH, ya que cuando colocamos las cepas en estudio, estas van a producir ácido ya que son bacterias acidificantes y en el medio de cultivo se tiene un pH de 7; por tal razón, es que el pH comienza a disminuir hasta 3 – 4, estas mediciones nos sirven para ver si hay o no crecimiento bacteriano y así poder cuantificar (conteo en placa). Si vemos el pH disminuye quiere decir que hay un aumento bacteriano en nuestro medio de cultivo y nos permite saber el metabolismo de la bacteria en función del pH.

3. Medición del poder tampón

3.1 Resultados del poder tampón con Acetato de Amonio

El medio Columbia es el más adecuado para el mantenimiento de las dos cepas en cultivo (en 9 generaciones contra 3-4 en el medio MIL), la idea es reconstruir un medio para la preparación necesaria del inóculo para la producción de macromoléculas a partir de los componentes de ese ambiente, pero reemplazando peptonas que pueden causar problemas en un expediente

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

de regulación farmacéutica. Como el acetato de amonio está presente en un número significativo de medios de cultivo de bifidobacterias, utilizado como una fuente de nitrógeno, se consideró importante añadirlo en el tampón.

Por lo tanto, se analizó el poder tampón del acetato a concentraciones crecientes en presencia de tampón fosfato del medio Columbia. Se puede notar que en la solución sin acetato el poder tampón es menor que en presencia de acetato. La concentración de 3,85 g/L es casi tan eficaz como la concentración a 5,0 g/L. Por lo tanto, puede mantenerse, pero puede representar un efecto inhibitorio por el aumento de la energía osmótica.

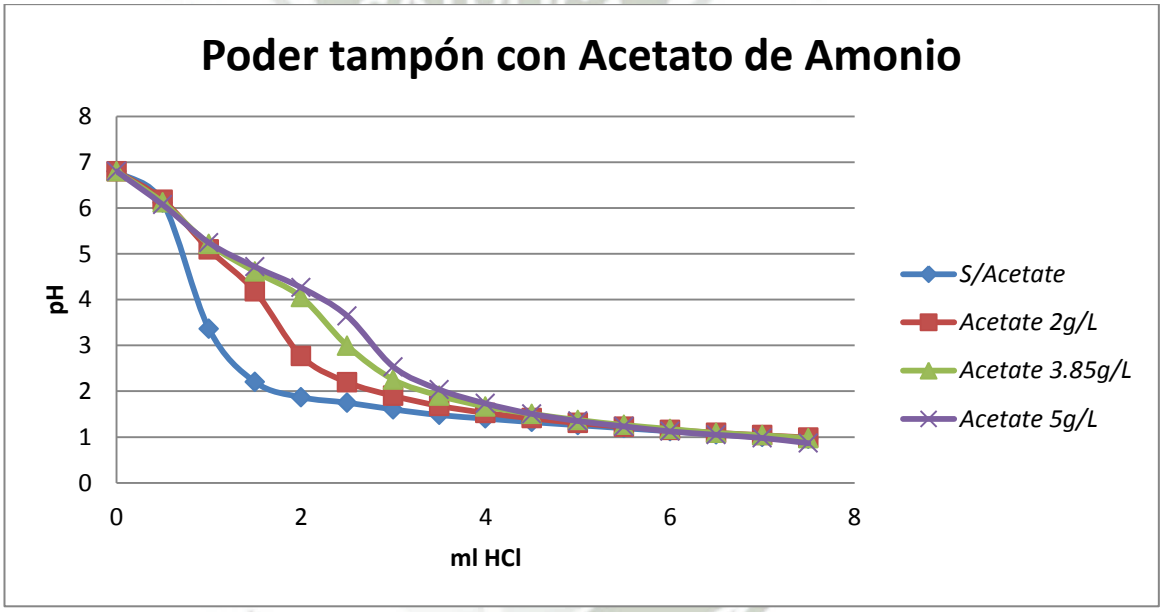


Figura III.3. Poder tampón con Acetato de Amonio.

Fuente: *Elaboración propia.*

3.2 Resultados del poder tampón con Lactalbúmina

En el medio de producción, la principal fuente de nitrógeno se compone de proteínas de suero de leche (lactalbúmina, lactoglobulina) compatibles con el uso en la alimentación humana. Así que, se analizó el efecto de estas proteínas sobre el poder tampón del medio para la preparación del inóculo. Se observa que, en presencia de 2,0 g/L de acetato de amonio con de 2,0 g/L lactalbúmina no tiene ningún efecto sobre la capacidad de amortiguación.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Por lo contrario, con 4,0 g/L de Lactalbúmina tiene una ventaja sobre la capacidad de amortiguación que es ligeramente superior. Así que para obtener un buen crecimiento, es importante mantener una concentración de 4,0 g/L de lactalbúmina.

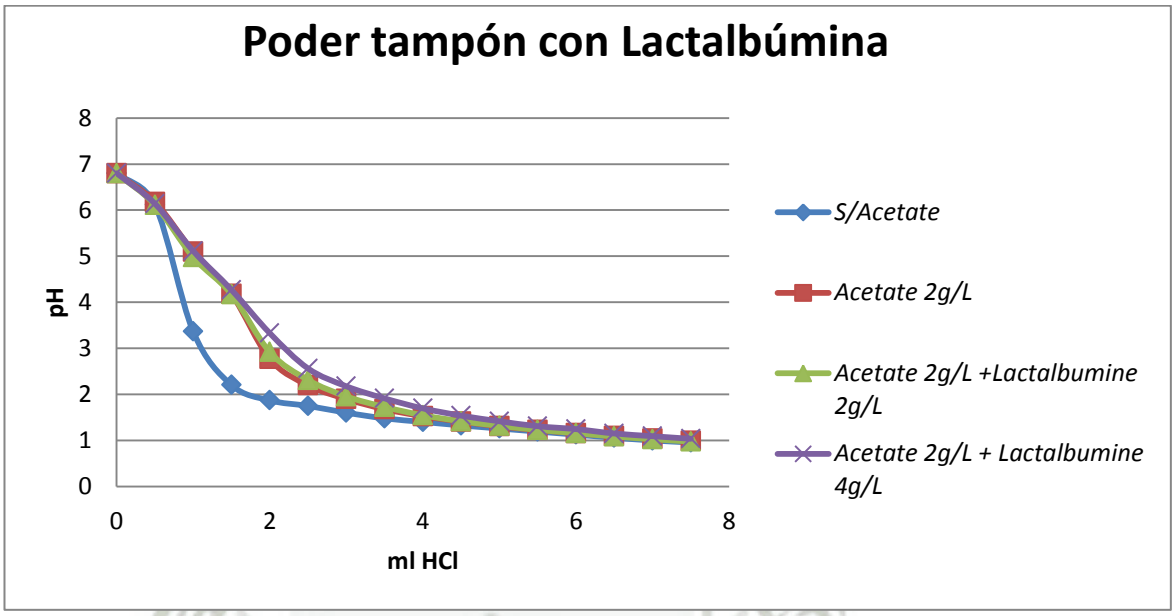


Figura III.4. Poder tampón con Lactalbúmina.

Fuente: *Elaboración propia.*

El poder tampón nos permite no tener demasiada variación de pH durante el crecimiento bacteriano y que el metabolismo bacteriano no esté perturbado por los cambios de pH. Nos permite equilibrar y tener una disminución progresiva de pH.

4. Extracción de ADN bacteriano

Los resultados obtenidos al utilizar el kit de extracción de ADN bacteriano se muestran en la Tabla III.6. Para obtener la cantidad de ADN se utilizó la siguiente fórmula:

$$[ADN] = D.O. \times Factor\ ADN$$

Factor de ADN: 50 mg/ml.

Se puede observar que las muestras que se han obtenido presentan gran cantidad de material genético, necesario para los procesos posteriores de

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

amplificación genética. Así, también se muestra los resultados de la evaluación de la calidad del ADN, medido por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 y 280nm. Notamos D.O. adecuadas con ligeros aumentos en valores normales, por cual se realizó un análisis de Electroforesis. Se ha evaluado la integridad del material genético de las muestras, empleando Electroforesis del tipo submarino. A continuación en la figura III.5. Se observan los resultados de la electroforesis en la que la integridad del ADN de las muestras se mantienen en buen estado (bandas no degradadas), estando aptas para realizar la corrida de qPCR.

Tabla III.6. Medición de D.O y extracción de ADN bacteriano.

Muestras	**D.O. 260/280**	**Cantidad de ADN (mg/ml)**
C 18 02169 -1	1,92	96
C 18 02169 -2	1,54	77
C 18 02169 -3	1,58	79
C 18 02169 -4	1,56	78
C 18 02169 -5	1,45	72,5
C 18 02169 -6	1,54	77
C 18 02073 -1	1,97	98,5
C 18 02073 -2	1,72	86
C 18 02073 -3	1,39	69,5
C 18 02073 -4	1,82	91
C 18 02073 -5	1,54	77
C 18 02073 -6	1,49	74,5

Fuente: *Elaboración propia.*

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

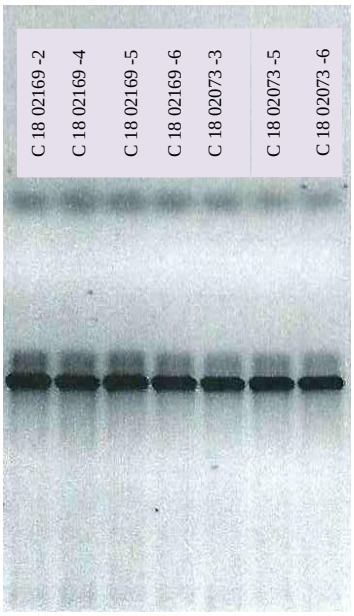


Figura III.5. Evaluación de la integridad del ADN bacteriano por Electroforesis.

Fuente: *Elaboración propia.*

5. Cuantificación de ADN bacteriano por la técnica de qPCR

Para cuantificar la cantidad de ADN bacteriano por la técnica de qPCR se trabajó con cuantificación Absoluta (Uso de estándares con concentraciones conocidas de bacteria), la curva de calibración ha sido construida utilizando concentraciones de 10 pg/5 µl; 1 pg/5 µl; 0,1 pg/5 µl; 10 fg/5 µl; 1 fg/5 µl; 0,1 fg/5 µl; 0,01 fg/ 5 µl. (Figura III.6)

Se tuvo en cuenta que todas las muestras de ADN en solución Ringer no tienen la misma calidad (El resultado del cociente 260/280 para ADN purificado es normalmente entre 1,8 y 2,0) (Tabla III.5).

Se observa que la cepa CFPL 02169 con dilución de 10^{-1} en solución de Ringer, presenta mayor número de copias bacterianas, asimismo el termociclador para qPCR llega a detectar un mínimo de copias en la cepa CFPL 02169 con dilución de 10^{-6} en solución de Ringer. Teniendo en cuenta que la cepa CFPL 02073 presenta el mismo resultado. Por lo tanto, en diluciones de 10^{-6} hay menos bacterias en el diluyente y la cuantificación es menos reproducible.

Para saber la cantidad de ADN aplicamos la siguiente fórmula:

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

$$\frac{N\acute{u}mero\ de\ UFC}{\frac{(Vol.\ ADN\ puesto\ en\ placa * factor\ de\ dilución * vol.\ de\ elución)}{Vol.\ total\ extraído\ de\ la\ muestra}}$$

- Vol. ADN puesto en placa: 5 µl
- Factor de dilución: 50
- Vol. de elución: 100 µl
- Vol. total extraído de la muestra: 2 ml

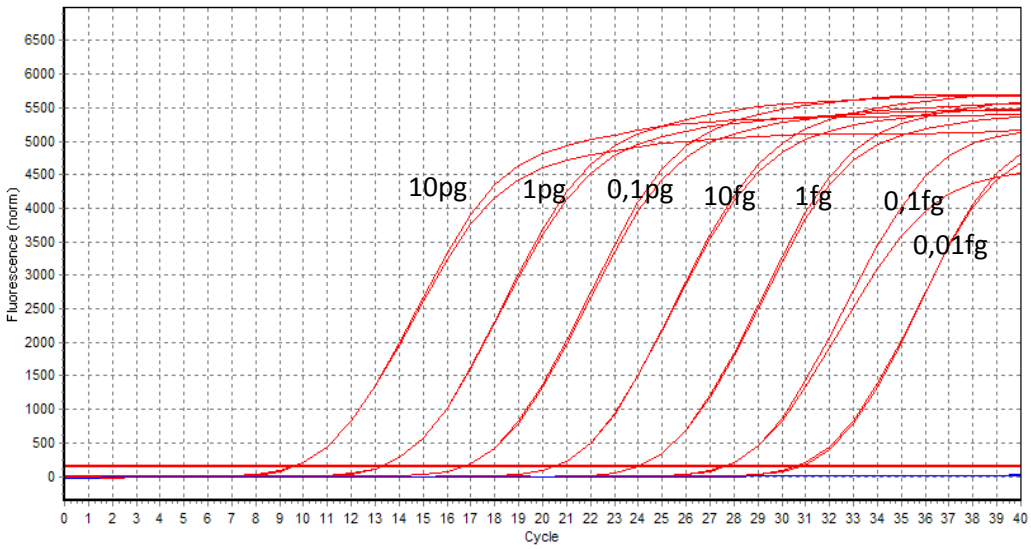


Figura III.6. Elaboración de estándares qPCR.

Fuente: Elaboración propia.

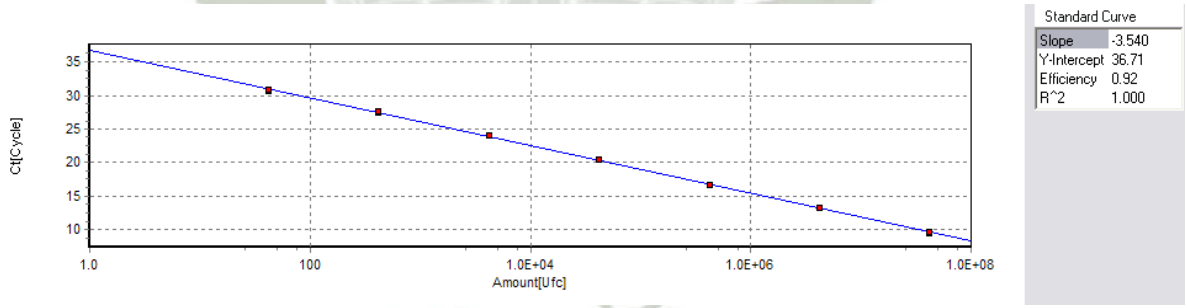


Figura III.7. Gráfico de regresión lineal de los estándares.

Fuente: *Elaboración propia.*

La cuantificación de ADN bacteriano por qPCR nos permite comparar la metodología clásica bacteriana con la nueva tecnología de qPCR, convirtiendo los valores en UFC/ml

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Tabla III.7. Cuantificación de ADN por qPCR.

Muestras	Número de UFC	Cantidad UFC/ml
C 18 CBi -1	1,88E+05	9,40E+07
C 18 CBi -2	33032	1,65E+07
C 18 CBi -3	280	1,40E+05
C 18 CBi -4	418	2,09E+05
C 18 CBi -5	39,8	1,99E+04
C 18 CBi -6	25,5	1,28E+04
C 18 02169 -1	3,96E+05	1,98E+08
C 18 02169 -2	58813	2,94E+07
C 18 02169 -3	6451	3,23E+06
C 18 02169 -4	68,8	3,44E+04
C 18 02169 -5	51,3	2,57E+04
C 18 02169 -6	13,2 3,29	6,60E+03 1,65E+03
C 18 02073 -1	4,01E+05	2,01E+08
C 18 02073 -2	52267	2,61E+07
C 18 02073 -3	1234	6,17E+05
C 18 02073 -4	76,6	3,83E+04
C 18 02073 -5	3,30	1,65E+03
C 18 02073 -6	0	ND

Fuente: *Elaboración propia.*

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Por lo tanto, al utilizar la técnica de qPCR y ser de gran sensibilidad y especificidad es posible estimar el número de bacterias por ml utilizando únicamente a partir de las primeras diluciones.

En la gráfica III.8, III.9 y III.10 se observan los resultados de la amplificación por qPCR de la cepa control, en la cual se muestra la amplificación de 6 muestras con concentraciones definidas, siendo el orden de aparición de 10^{-1}, $10^{-2,}$ 10^{-3}, 10^{-4}, y 10^{-5}, 10^{-6}. Se verifica que la amplificación de las muestras es correlativa con la cantidad de copias de las bacterias.

En cada ciclo hay una producción de ADN y aquellas que aparecen en los últimos ciclos son muestras débilmente concentradas. Sino no hubiera síntesis de ADN, no habría fluorescencia y por lo tanto no habría aparición de curvas en ninguno de los ciclos

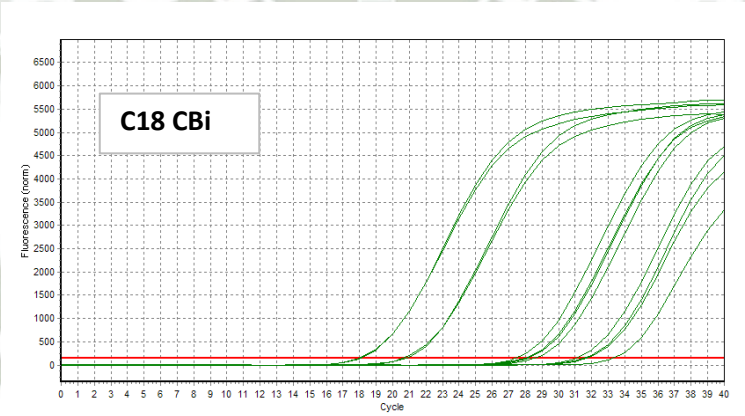
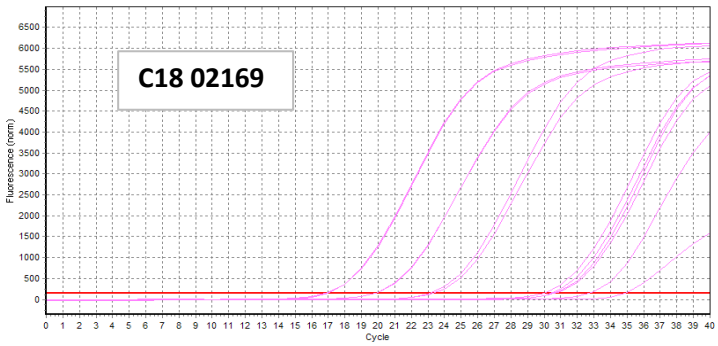


Figura III.8. Ciclos de qPCR CBi0703.

Fuente: *Elaboración propia.*



.**Figura III.9. Ciclos de qPCR CFPL 02169.**

Fuente: *Elaboración propia.*

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

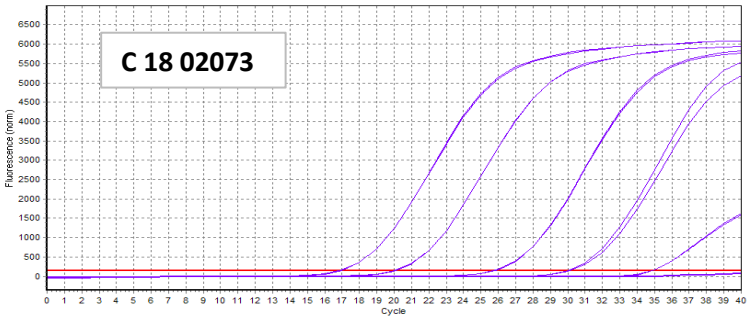


Figura III.10. Ciclos de qPCR CFPL 02073.

Fuente: *Elaboración propia.*

6. Efecto de *Bifidobacterium longun – Bifidobacterium infantis* sobre Coxsackievirus

La cepa CBi0703 *B.longum* es la cepa de referencia que utilizamos para la medición de la actividad antiviral, esta cepa fue patentada por el laboratorio BIFINOVE (Lille – Francia), se considera cepa de referencia ya que se ha demostrado su eficacia sobre problemas inflamatorios en ratas y ratones, produciendo una reducción de osteoartritis y artritis. Cuando las suspensiones bacterianas se ponen en contacto con células HEP-2 en valores de 10^2, 10^3 UFC/ml para la cepa CFPL 02073 y 10^3, 10^4 ufc/ml para la cepa CFPL 02169, no hay evidencia de efectos nocivos (Figura III.11). No se nota agravación en presencia de bifidobacterias CBi0703 (referencia).

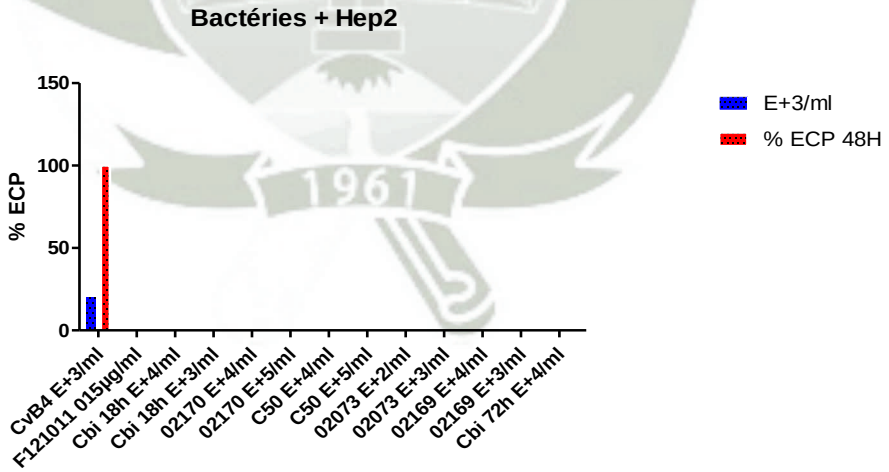


Figura III.11. Tolerancia de células HEP-2 a bifidobacterias en ausencia de infección viral.

Fuente*: Laboratorio de virología – Lille.*

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Si las células se incuban durante 1 hora con las bacterias antes de la infección viral, las células HEP-2 muestran un aumento de la sensibilidad al virus (aumento de ECP) en comparación a la infección con el virus solo (Figura III.12).

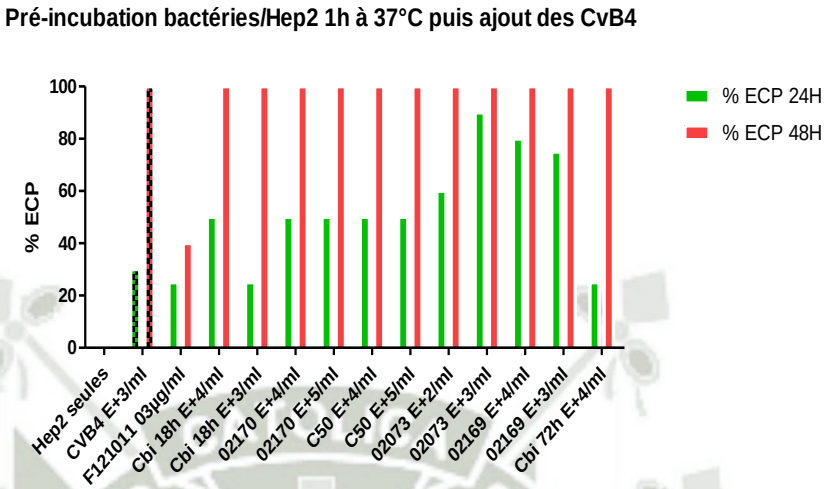


Figura III.12. Preincubación de bacterias y células antes de la infección viral.

Fuente: *Laboratorio de virología – Lille.*

Finalmente, si pre-incubamos el virus con bacterias, se observa la misma agravación a 24 horas mientras que las células en presencia de CBi0703 son más resistentes (Tabla III.13).

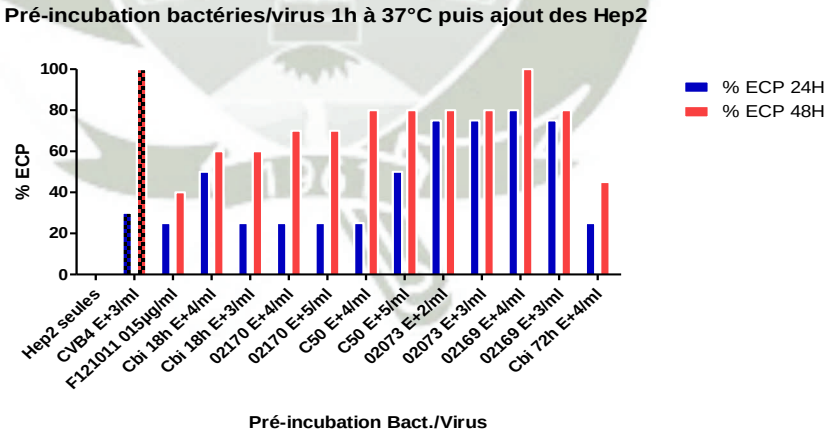


Figura III.13. Preincubación de bacterias/virus antes de la infección de células HEP-2.

Fuente: *Laboratorio de virología – Lille.*

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

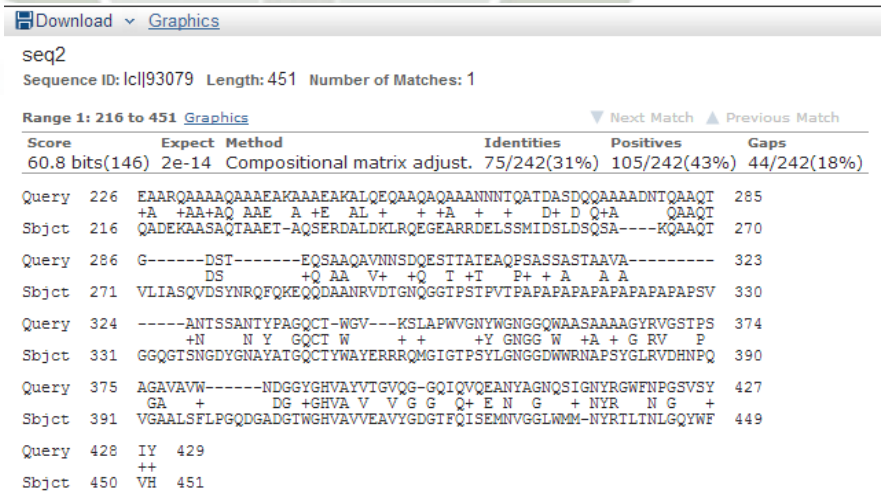
Al parecer, ambas cepas no son protectores a la infección de CVB4. Incluso parecen empeorar la infección con respecto a la cepa CBi0703. O la cepa CBi0703 muestra buena actividad antiviral. Se puede plantear la hipótesis de que esta macromolécula es el apoyo de la actividad antiviral. Como las tres cepas pertenecen a la misma especie, esto es importante para determinar la ubicación del gen que codifica la proteína constituyente de la macromolécula y comparar los genomas previamente secuenciados.

7. Análisis Bioinformático de secuencias de bifidobacterias

Localizamos el gen a nivel del genoma de *Bifidobacterium longum y Bifidobacterium infantis*. Para ello, se utiliza la función BLAST para comparar la secuencia de la proteína en todos los genomas secuenciados.

La función del receptor de glucano puede explicar la presencia de azúcares en la macromolécula. Entonces, se realizó una búsqueda en GenBank para identificar secuencias homólogas de la secuencia de la proteína transportadora de la función del receptor de glucano y conseguimos una alta homología con la proteína ligante de Glucanos del *Streptococcus mutans*.

Si comparamos las secuencias de las cepas CBi0703 y *Streptococcus mutans*, obtenemos el siguiente resultado:


Download Graphics

seq2

Sequence ID: lcl|93079 Length: 451 Number of Matches: 1

Range 1: 216 to 451 Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
60.8 bits(146)	2e-14	Compositional matrix adjust.	75/242(31%)	105/242(43%)	44/242(18%)

```
Query  226  EAARQAAAAQAAAEAKAAAEAKALQEQAAQAQAAANNNTQATDASDQQAAAADNTQAAQT  285
            +A  +AA+AQ AAE  A +E  AL +   + +A  +  +   D+ D Q+A     QAAQT
Sbjct  216  QADEKAASAQTAAET-AQSERDALDKLRQEGEARRDELSSMIDSLDSQSA----KQAAQT  270

Query  286  G------DST-------EQSAAQAVNNSDQESTTATEAQPSASSASTAAVA---------  323
                 DS          +Q AA   V+  +Q  T +T    P+ + A    A A
Sbjct  271  VLIASQVDSYNRQFQKEQQDAANRVDTGNQGGTPSTPVTPAPAPAPAPAPAPAPSV  330

Query  324  -----ANTSSANTYPAGQCT-WGV---KSLAPWVGNYWGNGGQWAASAAAAGYRVGSTPS  374
                 +N    N Y  GQCT W     + +     +Y GNGG W  +A + G RV   P
Sbjct  331  GGQGTSNGDYGNAYATGQCTYWAYERRRQMGIGTPSYLGNGGDWWRNAPSYGLRVDHNPQ  390

Query  375  AGAVAVW------NDGGYGHVAYVTGVQG-GQIQVQEANYAGNQSIGNYRGWFNPGSVSY  427
             GA   +        DG +GHVA V  V G G  Q+ E N  G   + NYR   N G   +
Sbjct  391  VGAALSFLPGQDGADGTWGHVAVVEAVYGDGTFQISEMNVGGLWMM-NYRTLTNLGQYWF  449

Query  428  IY  429
             ++
Sbjct  450  VH  451
```

Figura III.14. Alineación de las secuencias de las cepas CBi0703 y *Streptococcus mutans*.

Fuente: *BLAST*

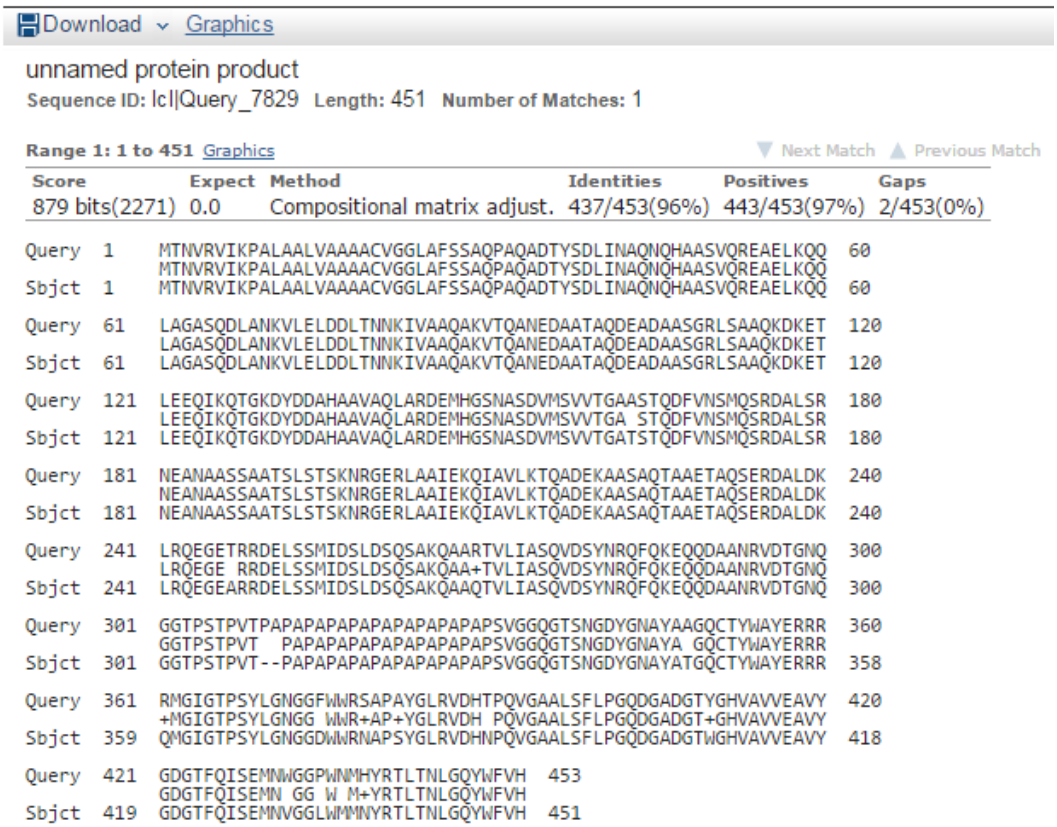
Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Es en la parte C-terminal que se encuentra una homología suficiente para considerar que hay compatibilidad entre las dos proteínas. Un análisis más detallado será necesario para confirmar que la proteína bífida es receptor de Glucano.

En la grafica III.15 se ha realizado la comparacion de la cepa en estudio CFPL 02169 con la muestra control, que es homóloga con *Streptococcus mutans*. Obteniendo una silmilitud del 96% con dicho control.



Download Graphics

unnamed protein product

Sequence ID: lcl|Query_7829 Length: 451 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 451 Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
879 bits(2271)	0.0	Compositional matrix adjust.	437/453(96%)	443/453(97%)	2/453(0%)

```
Query  1    MTNVRVIKPALAALVAAAACVGGLAFSSAQPAQADTYSDLINAQNQHAASVQREAELKQQ  60
            MTNVRVIKPALAALVAAAACVGGLAFSSAQPAQADTYSDLINAQNQHAASVQREAELKQQ
Sbjct  1    MTNVRVIKPALAALVAAAACVGGLAFSSAQPAQADTYSDLINAQNQHAASVQREAELKQQ  60

Query  61   LAGASQDLANKVLELDDLTNNKIVAAQAKVTQANEDAATAQDEADAASGRLSAAQKDKET  120
            LAGASQDLANKVLELDDLTNNKIVAAQAKVTQANEDAATAQDEADAASGRLSAAQKDKET
Sbjct  61   LAGASQDLANKVLELDDLTNNKIVAAQAKVTQANEDAATAQDEADAASGRLSAAQKDKET  120

Query  121  LEEQIKQTGKDYDDAHAAVAQLARDEMHGSNASDVMSVVTGAASTQDFVNSMQSRDALSR  180
            LEEQIKQTGKDYDDAHAAVAQLARDEMHGSNASDVMSVVTGA STQDFVNSMQSRDALSR
Sbjct  121  LEEQIKQTGKDYDDAHAAVAQLARDEMHGSNASDVMSVVTGATSTQDFVNSMQSRDALSR  180

Query  181  NEANAASSAATSLSTSKNRGERLAAIEKQIAVLKTQADEKAASAQTAAETAQSERDALDK  240
            NEANAASSAATSLSTSKNRGERLAAIEKQIAVLKTQADEKAASAQTAAETAQSERDALDK
Sbjct  181  NEANAASSAATSLSTSKNRGERLAAIEKQIAVLKTQADEKAASAQTAAETAQSERDALDK  240

Query  241  LRQEGETRRDELSSMIDSLDSQSAKQAARTVLIASQVDSYNRQFQKEQQDAANRVDTGNQ  300
            LRQEGE RRDELSSMIDSLDSQSAKQAA+TVLIASQVDSYNRQFQKEQQDAANRVDTGNQ
Sbjct  241  LRQEGEARRDELSSMIDSLDSQSAKQAAQTVLIASQVDSYNRQFQKEQQDAANRVDTGNQ  300

Query  301  GGTPSTPVTPAPAPAPAPAPAPAPAPAPSVGGQGTSNGDYGNAYAAGQCTYWAYERRR  360
            GGTPSTPVT  PAPAPAPAPAPAPAPAPSVGGQGTSNGDYGNAYA GQCTYWAYERRR
Sbjct  301  GGTPSTPVT--PAPAPAPAPAPAPAPAPSVGGQGTSNGDYGNAYATGQCTYWAYERRR  358

Query  361  RMGIGTPSYLGNGGFWWRSAPAYGLRVDHTPQVGAALSFLPGQDGADGTYGHVAVVEAVY  420
            +MGIGTPSYLGNGG WWR+AP+YGLRVDH PQVGAALSFLPGQDGADGT+GHVAVVEAVY
Sbjct  359  QMGIGTPSYLGNGGDWWRNAPSYGLRVDHNPQVGAALSFLPGQDGADGTWGHVAVVEAVY  418

Query  421  GDGTFQISEMNWGGPWNMHYRTLTNLGQYWFVH  453
            GDGTFQISEMN GG W M+YRTLTNLGQYWFVH
Sbjct  419  GDGTFQISEMNVGGLWMMNYRTLTNLGQYWFVH  451
```

Figura III.15. BLAST realizado entre CFPL 02169 – CBi0703.

Fuente: *BLAST*

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Download Graphics

unnamed protein product

Sequence ID: lcl|Query_64187 Length: 451 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 451 Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
892 bits(2306)	0.0	Compositional matrix adjust.	443/453(98%)	446/453(98%)	2/453(0%)

```
Query  1    MTNVRVIKPALAALVAAAACVGGLAFSSAQPAQADTYSDLINAQNQHAASVQREAELKQQ  60
            MTNVRVIKPALAALVAAAACVGGLAFSSAQPAQADTYSDLINAQNQHAASVQREAELKQQ
Sbjct  1    MTNVRVIKPALAALVAAAACVGGLAFSSAQPAQADTYSDLINAQNQHAASVQREAELKQQ  60

Query  61   LAGASQDLANKVLELDDLTNNKIVAAQAKVTQANEDAATAQDEADAASGRLSAAQKDKET  120
            LAGASQDLANKVLELDDLTNNKIVAAQAKVTQANEDAATAQDEADAASGRLSAAQKDKET
Sbjct  61   LAGASQDLANKVLELDDLTNNKIVAAQAKVTQANEDAATAQDEADAASGRLSAAQKDKET  120

Query  121  LEEQIKQTGKDYDDAHAAVAQLARDEMHGSNASDVMSVVTGATSTQDFVNSMQSRDALSR  180
            LEEQIKQTGKDYDDAHAAVAQLARDEMHGSNASDVMSVVTGATSTQDFVNSMQSRDALSR
Sbjct  121  LEEQIKQTGKDYDDAHAAVAQLARDEMHGSNASDVMSVVTGATSTQDFVNSMQSRDALSR  180

Query  181  NEANAASSAATSLSTSKNRGERLAAIEKQIAVLKTQADEKAASAQTAAETAQSERDALDK  240
            NEANAASSAATSLSTSKNRGERLAAIEKQIAVLKTQADEKAASAQTAAETAQSERDALDK
Sbjct  181  NEANAASSAATSLSTSKNRGERLAAIEKQIAVLKTQADEKAASAQTAAETAQSERDALDK  240

Query  241  LRQEGEARRDELSSMIDSLDSQSAKQAAQTVLIASQVDSYNRQFQKEQQDAANRVDTGNQ  300
            LRQEGEARRDELSSMIDSLDSQSAKQAAQTVLIASQVDSYNRQFQKEQQDAANRVDTGNQ
Sbjct  241  LRQEGEARRDELSSMIDSLDSQSAKQAAQTVLIASQVDSYNRQFQKEQQDAANRVDTGNQ  300

Query  301  GGTPSTPVTPAPAPAPAPAPAPAPAPSVGGQGTSNGDYGNAYVAGQCTYWAYERRR  360
            GGTPSTPVT  PAPAPAPAPAPAPAPSVGGQGTSNGDYGNAY  GQCTYWAYERRR
Sbjct  301  GGTPSTPVT--PAPAPAPAPAPAPAPAPSVGGQGTSNGDYGNAYATGQCTYWAYERRR  358

Query  361  QMGIGTPSYLGNGGDWWRSAPSYGLRVDHNPQVGAALSFLPGQDGADGTWGHVAVVEAVY  420
            QMGIGTPSYLGNGGDWWR+APSYGLRVDHNPQVGAALSFLPGQDGADGTWGHVAVVEAVY
Sbjct  359  QMGIGTPSYLGNGGDWWRNAPSYGLRVDHNPQVGAALSFLPGQDGADGTWGHVAVVEAVY  418

Query  421  GDGTFQISEMNWGGPWNIHYRTLTNLGQYWFVH  453
            GDGTFQISEMN GG W ++YRTLTNLGQYWFVH
Sbjct  419  GDGTFQISEMNVGGLWMMNYRTLTNLGQYWFVH  451
```

Figura III.16. BLAST realizado entre CFPL 02073 – CBi0703

Fuente: *BLAST*

Observamos que al hacer el estudio bioinformático en el que se ha comparado las cepas CFPL 02169 y CFPL 02073 con la cepa control, estas presentan altos porcentajes de identidad con respecto a la muestra control CBi, excepto la parte C-terminal que corresponde a la función del receptor de azúcar.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

CAPÍTULO IV
CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

CONCLUSIONES

1. El medio Columbia es el más adecuado para el cultivo de cepas CFPL 02169 y CFPL 02073. Por lo contrario, no es adecuado para la preparación del inóculo porque está elaborado a base de carne. Para evitar la contaminación con priones, es mejor utilizar un medio que consiste en proteínas de leche. Las dos cepas no tienen un buen entorno de desarrollo en medio MIL y MIXTO, por lo tanto, era necesario desarrollar un nuevo medio.
2. El aporte de nitrógeno se ha estudiado anteriormente, excepto la fermentación para optimizar el crecimiento de las bifidobacterias. Se visualizó que a una concentración de 2,0 - 3,85 g/L de acetato de amonio asociado a lactalbúmina a una concentración de 2,0 g/L es la solución más adecuada para evitar una acidificación demasiado rápida durante el cultivo de las bifidobacterias.
3. Se tuvo gran cantidad de material genético en el proceso de extracción de ADN bacteriano, el cual fue necesario para poder tener una buena amplificación por qPCR. Cuanto mayor sea la dilución hay menos bacterias en el diluyente y la cuantificación es menos reproducible.
4. Ambas cepas no mostraron ningún efecto protector anti-CVB4. Pero, parece que disminuyen la resistencia de las células HEP-2 mientras que la cepa de referencia no induce la misma agresividad. Estas dos cepas no pueden ser seleccionadas para la utilización como un probiótico. En el caso de la cepa de referencia, que es la macromolécula, parece tener gran eficacia.

   Mediante el análisis bioinformático, vimos que en la porción C-terminal se encuentra la función del receptor de azúcar, es un área donde se observan diferencias en la secuencia, es probable que las dos cepas estudiadas tengan secuencias poco favorables a la función de receptor.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

SUGERENCIAS

1. Determinar la secuencia de las proteínas de las bifidobacterias estudiadas para confirmar la función de receptor de azúcares.
2. Sabiendo que las bifidobacterias tienen un gran aporte en el sistema inmunitario, se debería analizar el efecto de *Bifidobacterium longum* contra la Artritis Reumatoidea, ya que en el laboratorio BIFINOVE se encontró que tiene efectos sobre dicha enfermedad autoinmune.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

REFERENCIAS

1. Simon G. L. & Gorbach, S. L. "*The human intestinal microflora"*, dig. Dis. Sci. 31**,** 1986, pp. 147S-162S.
2. Wostmann B. S., Larkin, C., Moriarty, A., Bruckner-Kardoss, E. "*Dietary intake, energy metabolism, and excretory losses of adult male germfree Wistar rats"*, Lab. Anim. Sci. 33**,** 1983 pp. 46-50.
3. Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J. J., Gibson, G. R., Collins, M. D. & Dore, J. "*Direct analysis of gene encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut".* Appl. Environ. Microbiol., 1999, 65**,** pp. 4799-4807.
4. Biavati, B. & Mattarelli, P., "*The family Bifidobacteriaceae. In: The Prokaryotes"* (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., Eds.), 2001, pp.1–70.
5. Sanders M. E. "*Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health",* Journal of Nutrition, 2000, 130, pp. 384-390.
6. Mercenier A., Pavan S., & Pot B. "*Probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospect",* Current Pharmaceutical Design, 2002, 8, pp. 99-110.
7. Blum S., Delneste Y., Alvarez S., Haller D., Perez P. F., Bode Ch. Hammes W. P., Pfeir A. M. A., & Schiffrin E. J. *"Interactions between commensal bacteria and mucosal immunocompetent cells*", *International Dairy Journal*, 1999, *9* , pp. 63-68.
8. Cunningham-Rundles S., Ahrne S., Bengmark S., Johann-Liang R., Marshall F., Metakis L., Califano C., Dunn A. M., Grassey C., Hinds G., & Cervia J. *"Probiotics and immune response",* American *Journal of Gastroenterology, 2000, 95, pp. 22-25.*
9. http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/poliomelitis.html
10. Scardovi V., 1984. "*Genus Bifidobacterium"* Orla-Jensen, 1924, 472, pp. 1418-1434. "*In Bergey's manual of systematic bacteriology"* Krieg N.R. and Holt J.G. Vol. 1.Williams and Wilkins, Baltimore, Md, USA.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

11. Matto J., Malinen E., Suihko M. L., Alander M., Palva A., & Saarela1 M. *"Genetic heterogeneity and functional properties of intestinal bifidobacterias",* Journal of Applied Microbiology, 2004, 97, pp. 459-470.
12. Hall, L. *"Gut Health and Food Safety Blog",* Institute of Food Research, 2013
13. Fuller R. "*Probiotics in man and animals*", Journal of Applied Bacteriology, 1989, 66, pp. 365- 378.
14. Pessi T., Sütas Y., Saxelin M., Kallioinen H., & Isolauri E. *"Antiproliferative effects of homogenates derived from five strains of candidate probiotic bacteria",* Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65, pp. 4725-4728.
15. Holzapfel W. H., Haberer P., Snel J., Schillinger U., & Huis in't Veld J. H. J. *"Overview of gut flora and probiotics",* International. Journal of Food Microbiology, 1998, 41, pp.85-101.
16. McCracken V. J., & Lorenz R. G. *"The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota",* Cellular Microbiology, 2001, 3, pp.1-11.
17. Hooper L. V., & Gordon J. I. *"Commensal host-bacterial relationships in the gut",* Science, 2001, 292, pp.1115-1118.
18. Kagnoff, M. F., & Eckmann L. *"Epithelial cells as sensors for microbial infection",* Journal of Clinical Investigation, 1997, 100, pp.6-10.
19. Ouwehand A. C., & Vesterlund S. *"Health aspects of probiotics",* Drugs, 2003, 6, pp.573-580
20. Ventura M., van Sinderen D., Fitzgerald G. F., & Zink R. *"Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacterias"*, Antonie van Leeuwenhoek, 2004, 86, pp.205-223.
21. Dong X., Cheng G., & Jian W. *"Simultaneous identification of five Bifidobacterium species isolated from human beings using multiple PCR primers"*, Systematic and Applied Microbiology, 2000, 23, pp.386-390.
22. Universidad Privada San Juan Bautista, Facultad de Ciencias de la Salud.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

23. Lauer E., & Kandler O. *"DNA-DNA homology, murein types and enzyme patterns in the type strains of the genus Bifidobacterium",* Systematic and Applied Microbiology, 1983, 4, pp.42-64.
24. Matteuzzi D., Crociani F., Zani G. & Trovatelli L. D. *"Bifidobacterium suis n. sp.: a new species of the genus Bifidobacterium isolated from pig feces",* Zeitschrift Fur Allgemeine Mikrobiologie, 1971, 11, pp.387-395.
25. Ballongne J. *"Bifidobacteria and probiotic action. In Lactic acid bacteria*", Ed. Salminen A. and Von Wright A., 1993, pp.357-428.
26. Gibson G. R., & Wang X. "*Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria",* Journal of Applied Bacteriology, 1994, 77, pp.412-420.
27. De Vries W. & Stouthamer A. H. *"Fermentation of glucose, lactose, galactose, mannitol and xylose by bifidobacterias",* Journal of Bacteriology, 1967, 96, pp. 472-478.
28. Meile L., Rohr L. M., Geissmann T. A., Herensperger M., & Teuber M. *"Characterization of the D- xylulose 5 phosphate/ D-fructose 6-phosphate phosphoketolase gene (xfp) from Bifidobacterium lactis"*, Journal of Bacteriology, 2001, 183, pp.2929-2936.
29. Zarate S. & Lopez-Leiva M. H. *"Oligosaccharide formation during enzymatic lactose hydrolysis: a literature review",* Journal of Food Protection, 1990, 53, pp.262-268.
30. Miyake T., Watanabe K., Watanabe T., & Oyaizu H. *"Phylogenetic analysis of the genus Bifidobacterium and related genera based on 16S rDNA sequences",* Microbiology and Immunology, 1998, 42, pp. 661-667.
31. Gournier-château N., Larpent J. P., Castillanos M. I., & Larpent J. L. *"Les probiotiques en alimentation animale et humaine"*, Édition Technologie et documentation Lavoisier Paris, France, 1994, pp.1-192.
32. Salminen S., Isolauri E., & Salminen, E. *"Clinical uses of probiotics for stablising gut mucosal barrier: successful strains and future challenges",* Antonie Van Leeuwenhoek, 1996, 70, pp.347-358.
33. Coconier, M. H., Bernet M F., Kernéis S., Chauvière G., Fourniat J., & Servin A. L. "*Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human*

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

intestinal Caco-2 cells by Lactobacillus acidophilus strain LB decreases bacterial invasion", FEMS Microbiology Letters, 1993, 110, 299-306.

34. Kaplan H., & Hutkins R. *"Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacterias"*, Applied and Environnemental Microbiology, 2000, 66, pp.2682-2684.
35. Berg R. D. *"Probiotics, prebiotics or conbiotics",* Trends in Microbiology, 1998, 6, pp.89-92.
36. Blaut M. *"Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora"*, European Journal of Nutrition, 2002, 41, pp.11- 16.
37. Mortensen P. B. & Clausen M. R. *"Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease"*, Scandinavian Journal of Gastroenterology, 1996, 216, pp.132-148.
38. Gibson G. R., & Roberfroid M. B. *"Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics*", Journal of Nutrition 1995, 125, pp.1401-1412.
39. Wang M. F., Lin H. C., Wang Y. Y., & Hsu C. H. *"Treatment of perennial allergic rhinitis with lactic acid bacteria",* Pediatric Allergy and Immunology, 2004, 15, pp.152-158.
40. Baumgart D. C., & Dignass A. U. *"Intestinal barrier function"*, Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 2002, 5, pp. 685-94.
41. Takiguchi, R. *"Effects of fermented-milk administration on defecation and fecal microflora of healthy volunteers, Chonai Saikingaku Zasshi",* 1998, 11, pp.117-122.
42. Verdu E. F, Bercik P., Bergonzelli G. E., Huang X. X., Blennerhasset P., Rochat F., Fiaux M., Mansourian R., Corthesy-Theulaz I., & Collins S. M. *"Lactobacillus paracasei normalizes muscle hypercontractility in a murine model of postinfective gut dysfunction",* Gastroenterology, 2004, 127, pp.826-837.
43. Gibson, G. R., E. R. Beatty, X. Wang, and J. H. Cummings. *"Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. Gastroenterology"*, 1995, 108, pp.975–982.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

44. Schell, M. A., M. Karmirantzou, B. Snel, D. Vilanova, B. Berger, G. Pessi, M. C. Zwahlen, F. Desiere, P. Bork, M. Delley, R. D. Pridmore, and F. Arigoni "*The genome sequence of Bifidobacterium longum reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract"*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002 ,99, pp.14422–14427.
45. Van den Bogaard, P. T., M. Kleerebezem, O. P. Kuipers, and W. M. de Vos. *"Control of lactose transport, galactosidase activity, and glycolysis by CcpA in Streptococcus thermophilus: evidence for carbon catabolite repression by a non-phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system sugar*", J. Bacteriol., 2000, 182, pp.5982–5989.
46. Caescu, C. I., O. Vidal, F. Krzewinski, V. Artenie, and S. Bouquelet. "*Bifidobacterium longum requires a fructokinase (Frk; ATP:D-fructose 6-phosphotransferase, EC 2.7.1.4) for fructose catabolism*". J. Bacteriol., 2004, 186, pp.6515–6525.
47. Romond, M.B. "Microbiologie alimentaire: Techniques de laboratoire", pp. 383-390
48. Gomes, A., F. Malcata, *"Bifidobacterium spp and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutic properties relevant for use as probiotics",* Trends Food Sci. and Technol., 1999, 10, pp.139-157.
49. Scardovi, V., *Op. cit.*
50. Sistemas de Detección de patógenos por PCR a Tiempo Real, Guía de Interpretación de Resultados.
51. http://www.webconsultas.com/pruebas-medicas/pcr-13299.
52. JCR European Commission. Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. Sesión 10
53. JCR European Commission. Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. Sesión 4
54. D. Sandín, G. Rodríguez. *"Enterovirus",*pp.515-518.
55. Organización Mundial de la Salud. Poliomielitis. Nota descriptiva 2016.
56. Ministerio de Salud. Informe de Poliomielitis en el Perú 2011.
57. http://www.news-medical.net/health/Diagnosis-of-Polio-(Spanish).aspx

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

58. Pulendran B., *"Modulating Th1/Th2 responses with microbes, dendritic cells, and pathogen recognition receptors",* Immunology Research. 2004, 29, pp.187-196.
59. Kidd P. *"Th1/Th2 balance: The hypothesis, its limitations, and implications for health and disease",* Alternative Medicine Review, 2003, 8, pp.223-246.
60. Allez M., & Mayer L. *"Regulatory T cells: peace keepers in the gut", Inflammatory* Bowel Diseases, 2004,10, pp.666-676.
61. McGuirk P., & Mills K. H.G. *"Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases",* Trends in Immunology, *2002, 23, pp. 450-455.*
62. Bogden, A. E., and Aptekman, P. M. *"Disappearance of Natural Heteroagglutinins for Human Erythrocytes from the Sera of Rats with Progressively Growing Tumors",* Cancer Research, 1953, 13, pp. 890-894.
63. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
64. www.genome.jp/kegg/

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ANEXOS

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

ANEXO I

MEDIO ROSENOW CISTEÍNA

- Polvo Rosenow 21 g
- Agua destilada csp 1L
- Mármol blanco 1 pedazo por tubo
- Cerebro liofilizado 1 pedazo por tubo
- pH 7,2
- Esterilización en la autoclave por 15 min a 121°C

Materiales necesarios:

- Tubos de ensayo de 15,30*160 mm de espesor, 0,5 mm vaso sodocalcico. (D.Dutscher, réf : 110031)
- Tapas para tubos (Flandre chimie, réf : BC2401)

Composición del medio Rosenow Cisteína (BioRad, réf : 64922):

- Peptona 10 g
- Extracto de Carne 3 g
- Clorhidrato de cisteína 0,3 g
- Glucosa 2 g
- Mármol blanco 1 pedazo por tubo
- Cerebro liofilizado 1 pedazo por tubo
- Indicador de Andrade (fucsina ácida 5 %) 10 ml
- Cloruro de Sodio 5 g
- pH = 7,2

Preparación del medio

- En una marmita, poner la cantidad necesaria de agua de acuerdo al volumen de medio que hay que preparar, comenzar a calentar el agua (40-50°C). Vertir los polvos directamente en la marmita. Remover el medio con una espátula

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

hasta notar la disociación de los polvos y hervir. Luego enfriar el medio, tomar el pH, ajustarlo como tan necesario sea para el pH deseado (pH 7,0; porque el autoclavado del medio aumenta en 0,2 unidad de pH). En cada tubo de ensayo, añadir un pedazo de mármol y de cerebro liofilizado. (No utilizar los pedazos inferiores a 2-3 mm o el polvo de cerebro provocará desorden en el tubo una vez regenerado).

- Repartir el medio en tubos de ensayo a razón de 9 ml por tubo con la ayuda del repartidor.
- Tapar los tubos, arreglarlos en cestas para autoclave (no olvidar poner una reja por encima de los tubos dentro de la cesta, para retener las tapas durante el ciclo de autoclave). Una vez esterilizados, enfriar y almacenarlos a 4°C.

Utilización del medio:

- Regenerar los tubos antes de la utilización: (la regeneración permite eliminar un máximo de O_2 del medio de cultivo) poner un baño maría a 100°C. Una vez que el baño maría está a temperatura, poner los tubos en el baño maría, y contar 20 min a partir del momento en que llego a la temperatura de 100°C. Poner una reja por encima de los tubos para mantener las tapas sobre los tubos durante la regeneración. Sacar los tubos, y dejarlos enfriar para permitir su utilización. La utilización de los tubos debe hacerse dentro de las 2 horas de haberlos regenerado. En el caso de bacterias anaeróbias estrictas. Si esto no es posible, conservarlos en cestas en cámaras anaerobias.

Atención:

- Los tubos deben ser fríos o casi fríos para la transferencia en la cámara anaerobia, si este no es el caso, hay un riesgo de que el contenido de los tubos se escape durante los ciclos de nitrógeno y de mezclas gaseosas en el tamiz.

Siembra de los tubos:

- Una vez el tubo regenerado y enfriado, es posible sembrarlo con la ayuda de un inoculador de 1 o 10 µl estéril en el caso de colonia o de una pipeta pasteur estéril de 5 o 6 ml en el caso de un cultivo en medio líquido.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Después de la siembra de tubos:

- Los tubos pueden ser recubiertos con parafina estéril. La parafina es preparada en un beaker pírex a baño maría, luego acondicionarlo en tubos pírex de 20 a 50 ml y autoclavar por 20 min a 121°C. Para cubrir el caldo del tubo, derretir la parafina con la ayuda de un mechero y vertir estérilmente la parafina liquida en el tubo (no más de 5-6 mm de espesor de parafina)

Lectura de los tubos:

- La fermentación de la glucosa se traduce por una coloración roja, la reducción del medio por una decoloración del medio.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ANEXO II

MEDIO COLUMBIA CISTEÍNA CON GLUCOSA

- Caldo Base Columbia sin agar (Difco) 35 g
- D(+)Glucosa anhidra (Wwr, réf : 23379-294) 5 g
- L-Cisteína Clorhidrato (Wwr, réf : 23255.86) 0,3 g
- Agar granulado (Difco) (BD, réf : 214530) 15 g
- Agua destilada csp 1L
- pH 7,3
- Esterilización en la autoclave por 15 min a 121°C

Materiales necesarios:

- Placas petri con tres espolones de 90 mm (Wwr, réf : 391-0878)
- Caldo Base Columbia Difco (BD, réf : 294420)

Composición del caldo base Columbia DIFCO:

- Extracto de digestión pancreática de caseína 10 g
- Proteosa peptona 35 g
- Extracto de levadura 5 g
- Extracto de digestión tripsica de corazón de buey 3 g
- L-cisteína HCl 0,1 g
- Dextrosa 2,5 g
- NaCl 5 g
- Sulfato de Magnesio 0,1 g
- Sulfato Ferroso 0,02 g
- Carbonato de Sodio 0,6 g
- Tris hidroximetilaminometano 0,83 g
- Tris hidroximetilaminometano HCl 2,86 g
- pH 7,5 ± 0,2

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Preparación del medio:

- En una marmita, vertir la cantidad necesaria de agua de acuerdo al volumen del medio que hay que preparar y comenzar a calentar el agua.
- Verter el polvo directamente en la marmita.
- Remover regularmente el medio con una espátula hasta ebullición, hervir el medio 5 min para permitir que el agar se disuelva totalmente.
- Hacer enfriar el medio hasta una temperatura próxima de 50-60°C.
- Tomar el pH, ajustarlo como tan necesario sea para obtener el pH deseado (pH 7,1; porque el autoclavado del medio aumenta 0,2 unidad de pH el medio).
- Repartir el medio en frascos de 100 o 200 ml, visualizar los frascos (no cerrados totalmente con el fin de dejar un intercambio con vapor durante la esterilización).
- Una vez esterilizados y enfríados, identificar los frascos y almacenarlos a 4°C.

Utilización del medio:

- Regenerar los frascos antes de la preparación de las placas: (la regeneración permite eliminar un máximo de O_2 del medio de cultivo)
- Sacar los frascos del stock frío, abrir ligeramente la tapa para permitir la desgasificación del medio.
- Poner un baño maría a 100°C. Una vez el baño maría con temperatura de 100°C, poner los frascos del medio en el baño maría y descontar 20 min a partir del momento en que está a 100°C. Sacar los frascos, y dejarlos enfriarse para permitir vaciarlos luego en las placas petri.
- La utilización de los tubos debe hacerse dentro de las 2 horas de haberlos regenerado. En el caso de bacterias anaeróbias estrictas. Si esto no es posible, conservarlos en cestas en cámaras anaerobias.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ANEXO III

MEDIO MRS

Fórmula por litro:

- Proteosa peptona N°3 10 g
- Extracto de carne de res 10 g
- Extracto de levadura 5 g
- Dextrosa 20 g
- Polisorbato 80 1g
- Citrato de Amonio 2 g
- Acetato de Sodio 5 g
- Sulfato de Magnesio 0,1 g
- Sulfato de Manganeso 0,05 g
- Fosfato dipotasio 2 g
- Agar 15 g

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ANEXO IV

MEDIO MIXTO

- Caldo de peptona tripticasa (BD ref: 211921) 15g/L
- Glucosa (VWR ref: 24379-294 3g/L
- NaCl (VWR ref: 27788-366) 5g/L
- Lactosa (VWR ref: 24945.291) 2g/L
- Extracto de levadura (BD ref: 211929) 3g/L
- $MgSO_4$, $7H_2O$ (VWR ref : 25165.292) 0,5g/L
- $MnSO_4$, 1 H_2O (VWR ref: 25303.290) 0,9g/L
- Fe SO_4, $7H_2O$ (VWR ref: 24244.298) 0,4g/L
- Hidrolisato de lactalbúmina (Oxoid ref : LP0048) 2g/L
- KH_2PO_4 (VWR ref: ALFA10840.14) 3g/L
- K_2HPO_4 (ALFA11321.10) 3,84g/L
- Ácido L-ascórbico (VWR ref : 20155.237) 0,3g/L
- Agua csp 1L

Atención: No hervir.

- pH: 6,8 después de la esterilización en la autoclave, a fin de poner el pH en 6,6.
- Colocar 90 ml de medio en cada botella.
- Autoclavar por 20 min a 115°C.
- Antes de su uso, regenerar 20 minutos en un baño de agua a 100 ° C.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ANEXO V

PREPARACIÓN DEL MEDIO MIL

(MEDIO INOCULO LACTOSA)

- Caldo de peptona tripticasa (BD ref: 211921) 15g/L
- NaCl (VWR ref: 27788-366) 5g/L
- Lactosa (VWR ref: 24945.291) 5g/L
- Extracto de levadura (BD ref: 211929) 3g/L
- $MgSO_4$, $7H_2O$ (VWR ref : 25165.292) 0,5g/L
- $MnSO_4$, 1 H_2O (VWR ref: 25303.290) 0,09g/L
- Fe SO_4, $7H_2O$ (VWR ref: 24244.298) 0,04g/L
- Hidrolizado de Lactalbúmina (Oxoid ref : LP0048) 2g/L
- $KH_2P\ O_4$ (VWR ref: ALFA10840.14) 3g/L
- $K_2HP\ O_4$ (ALFA11321.10) 3,84g/L
- Ácido L-ascórbico (VWR ref : 20155.237) 0,3g/L
- Agua csp 1L

Atención: No hervir.

- pH: 6,8 después de la esterilización en la autoclave, a fin de poner el pH en 6,6.
- Colocar 90 ml de medio en cada botella.
- Autoclavar por 20 min a 115°C.
- Antes de su uso, regenerar 20 minutos en un baño de agua a 100 ° C.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ANEXO VI

UTILIZACIÓN DE LA CÁMARA ANAEROBIA

Puesta en funcionamiento:

- Poner en la cámara todo el material necesario para la utilización en rutina que no podrá ser trasladado por el tamiz de acero inoxidable (estufa, torre de ventilación).
- Proteger los ángulos de las estufas, el material que podría perjudicar a la envoltura de plástico durante el vacío de éste.
- Desabrochar la envoltura plástica de su estructura tubular (sobre los importes de la altura y del costado).
- Puerta interior del cilindro abierta, hacer un vacío máximo de la envoltura y del cilindro.
- Cubrir la cámara de nitrógeno para reinflar el cuarto.
- Repetir la purga en nitrógeno 4 veces
- Luego efectuar dos purgas en mezcla gaseosa.
- A la última purga en mezcla gaseosa, abrochar la envoltura al soporte de acero inoxidable.
- Retirar todas las protecciones utilizadas y sacarlas a través del tamiz de acero inoxidable.

Hacer entrar:

- El cartucho de palladium previamente deshidratado.
- Los cristales de silicagel previamente deshidratados.
- Un frasco de 100 ml de Ringer cisteína-palladium-résazurina nuevamente regenerado a través del tamiz de transferencia.
- Poner el cartucho de palladium sobre la torre de ventilación luego poner en marcha la torre.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Precauciones:

- Preparación Ringer + résazurina: En un frasco de 100 ml de Ringer (Anexo VI) previamente regenerado a baño maría (20 min a 100°C) y luego puesto a temperatura ambiente, aumentar una "punta de espátula " de résazurina y una decena de pedazos de Palladium regenerado.
- La cámara no puede ser directamente utilizada como cámara "anaeróbia", el color azul de Ringer + résazurina lo demuestran. Hay que contar dos a tres días antes de ver el viraje de color de la résazurina del azul al translúcido. A partir del funcionamiento de la cámara, hay que hacer un cambio diario (ver cada dos días según la utilización) del palladium y del silicagel.

Materiales necesarios:

- Cartucho de Palladium: regenerar en la estufa por 2 horas a 180°C, dejar la puerta de la estufa cerrada durante toda la fase de enfriamiento y hasta la transferencia del cartucho en la cámara con el fin de evitar todo tipo de humedad por el medio ambiente. Si la puerta de la estufa debe ser abierta antes de la transferencia: poner el cartucho en una estufa a 80°C.
- Silicagel: conservarlo en una estufa a 80°C hasta su transferencia en la cámara.
- Testigo de anaerobiosis: frasco de 100 ml de Ringer cisteína + Résazurina + Palladium.

Utilización del cuarto:

- Palladium: sirve para eliminar los gases contaminantes producidos por ciertas bacterias (tales como clostridiums). Su regeneración es esencial para tener eficacia máxima de éste.
- Frecuencia de cambios: lo ideal es ver cada dos días según la utilización.
- La torre de ventilación + cartucho de Palladium: durante la utilización, el CO_2 tiene tendencia a concentrarse en la parte alta de la cámara. La mezcla generada por la torre permite conservar una mezcla gaseosa homogénea en

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

toda la cámara anaeróbia. Asociada con Palladium, permite captar los gases contaminantes. Pues es necesario que gire continuamente.

- Silicagel: en función de la cantidad de placas o frascos de medio de cultivo puestos en la cámara, se crea una cierta cantidad de humedad. Silicagel es esencial para disminuir la hidratación de la cámara. Atención: no desecar demasiado la atmósfera de la cámara porque si la humedad disminuye en exceso, más débil será el cultivo sobre las placas del medio (las bacterias que necesitan una cierta humedad para cultivar).

El Cilindro de transferencia (Tamiz):

Para la puesta en Anaerobiosis = ciclo de purga:

- Asegurarse que ambas puertas sean correctamente cerradas y de manera hermética (sin quebrantar las uniones de las puertas)
- Hacer el vacío del tamiz hasta una presión de-800 mPa y cubrir en nitrógeno. Rehacer una segunda purga en nitrógeno.
- Hacer el vacío del tamiz hasta una presión de-800 mPa y llenar en mezcla gaseosa. Durante el ascenso de la presión, aflojar la tuerca de la puerta de adentro de la cámara.
- La puerta se abre sola tan pronto como la presión del tamiz subió a la presión atmosférica

Precisiones importantes:

- Una vez el tamiz en anaerobiosis y la transferencia de material efectuado (exterior → Interior = aerobio → Anaeróbio), cerrar herméticamente la puerta interior del tamiz.
- Es completamente posible reabrir la puerta interior sin rehacer un ciclo de purga a condición:
- Que, la puerta exterior no haya sido abierta (devolviendo la atmósfera del tamiz aerobio)
- El tiempo de anaerobiosis del tamiz no excede más de una hora. No dudar en rehacer un ciclo completo de purga si la puerta exterior ha sido abierta.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Transferencia de fluidos a través del Cilindro:

- Es importante que la temperatura de los fluidos cualesquiera que sean (agua, Ringer, caldo de cultivo) sea inferior a 40°C (debajo de una temperatura tibia) con el fin de evitar todo riesgo de sobrepresión en los contenedores y pérdida de fluido.
- Si hay utilización de tapas en los recipientes, poner una reja sobre los tubos con el fin de evitar que las tapas se escapen.

Transferencia de placas petri con medio de cultivo a través del cilindro:

- La transferencia como el almacenamiento o la incubación de placas se hace en las bolsas con cierre con el fin de evitar una deshidratación demasiado rápida de éstos. Durante la transferencia de las placas petri estas están colocadas en el tamiz (medio abajo y tapa arriba) Durante la incubación o el almacenamiento de placas en la cámara, regresar las placas (tapa abajo y medio arriba).

Conservación de los medios en la cámara:

- Los medios de cultivo, una vez regenerados, pueden ser conservados en la cámara hasta las 72 horas máximo. Para los tubos con tapa, hay que asegurar que la tapa no esté pegada al tubo, para permitir los intercambios gaseosos. Para los tubos o los frascos con tapón de rosca, asegurarse que la tapa no esté totalmente cerrada, hay que destornillarlo para permitir los intercambios gaseosos. Las placas con medio de cultivo son conservados al revés en saquitos de plástico cerrados y cortados.

Recordar: la regeneración de los medios:

- Para los caldos: 20 min a 100°C, el descuento del tiempo se hace a partir del momento en que el baño maria esté a 100°C, dejar enfriar los tubos o los frascos antes de la transferencia en la cámara.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

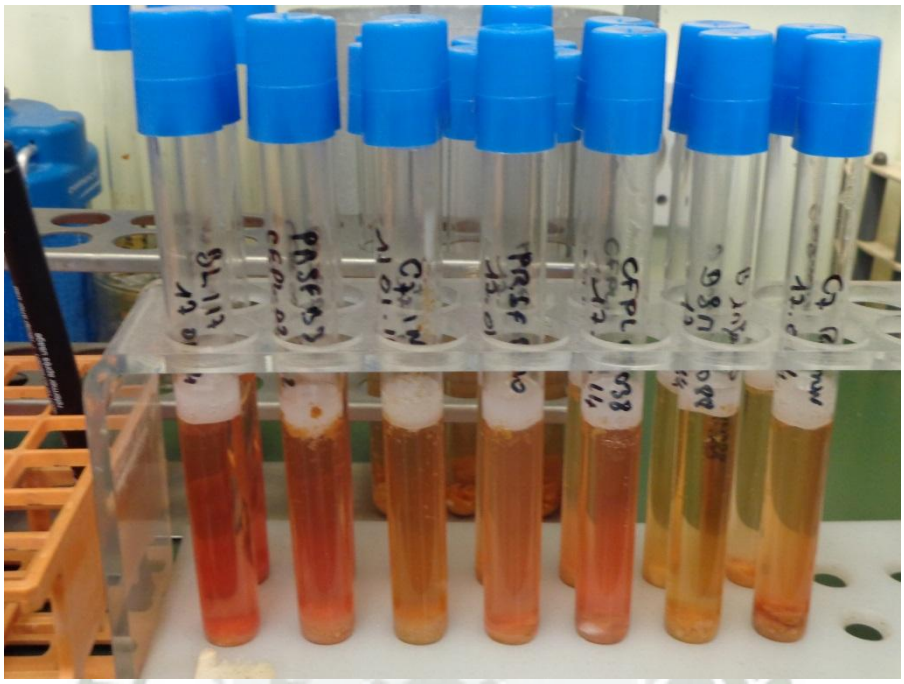
- Para los medios: 20 min a 100°C, el descuento del tiempo se hace a partir del momento en que el medio está casi líquido, dejar enfriar antes de colocar el medio en las placas, y luego trasladar las cajas en saquitos cortados y cerrados.

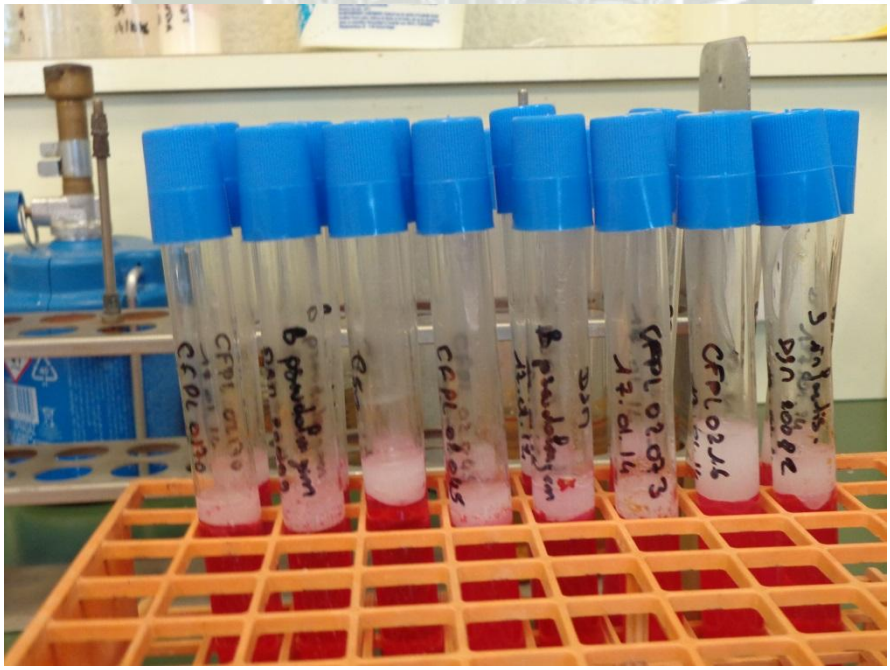
Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ANEXO VII

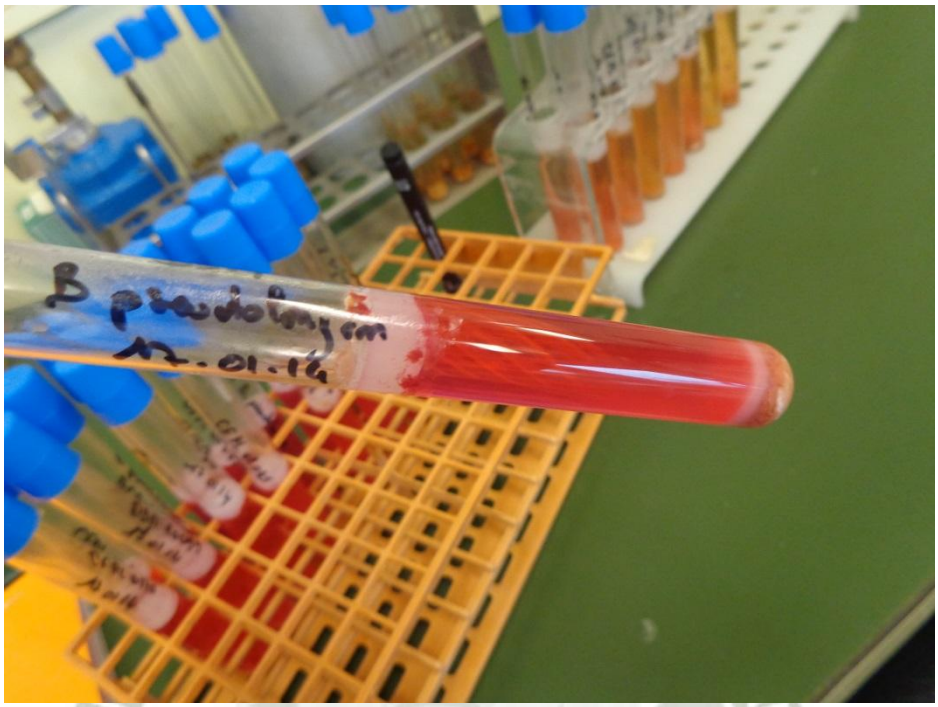


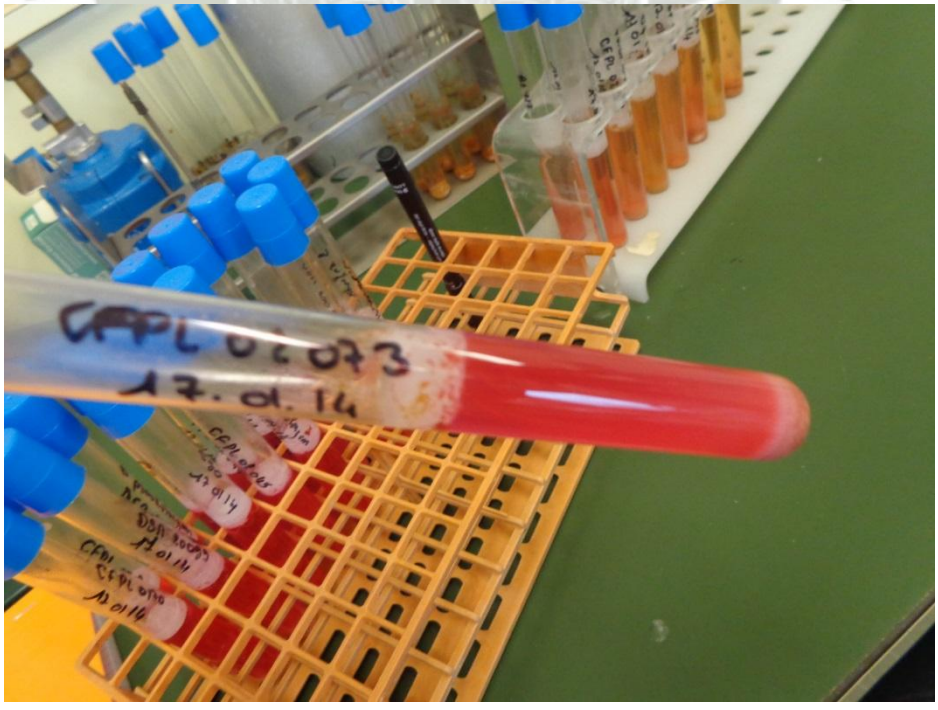


Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

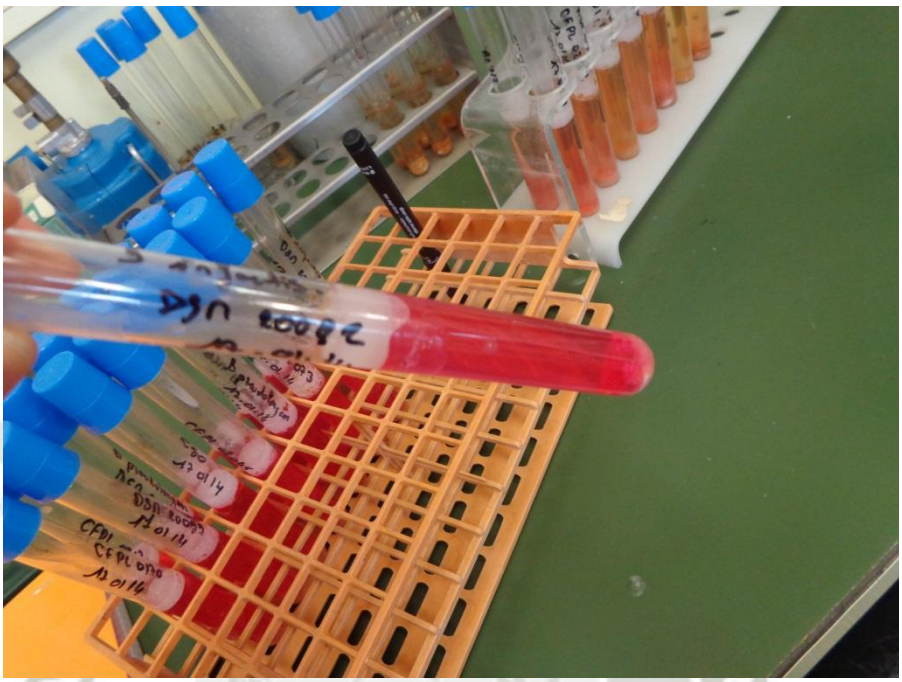


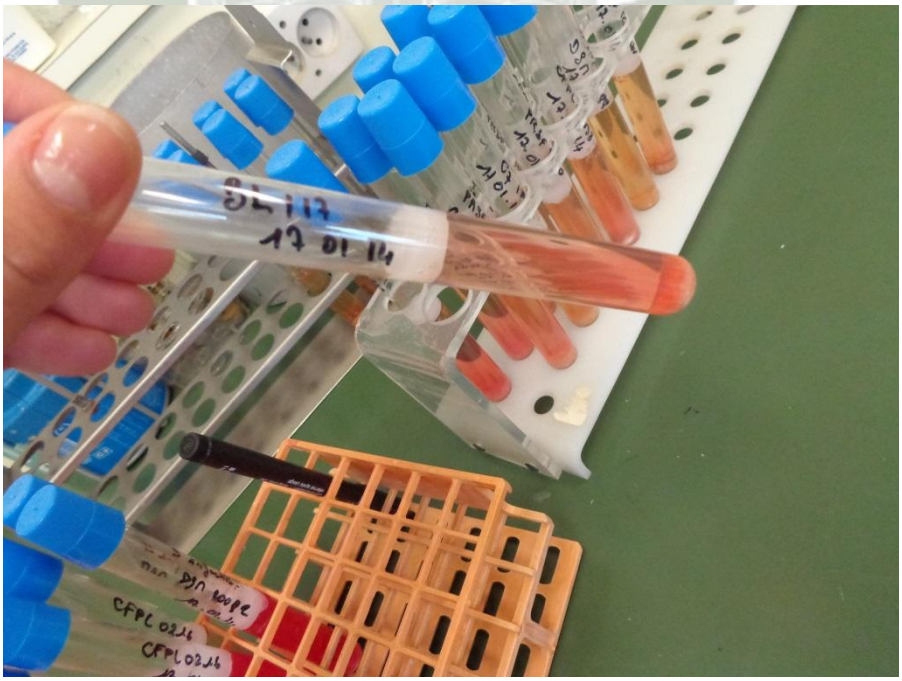


Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA



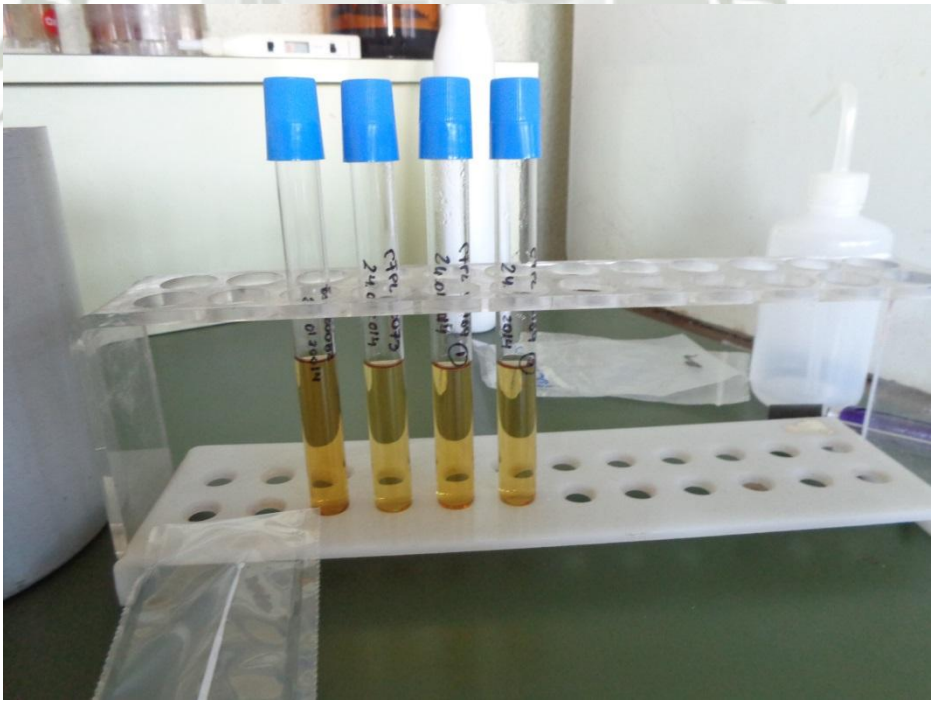


Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

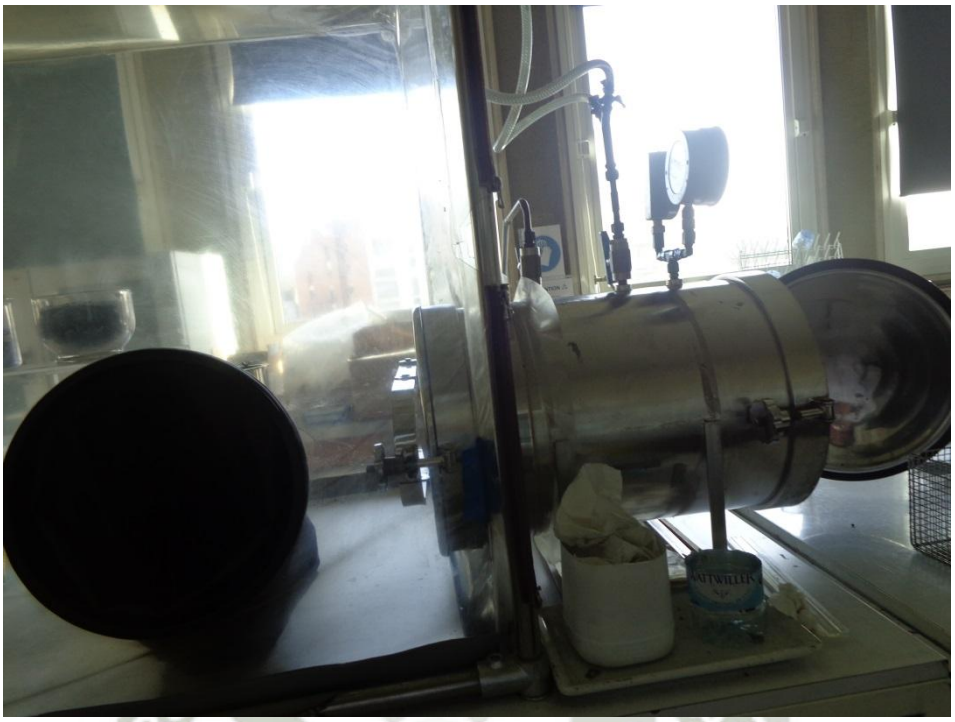


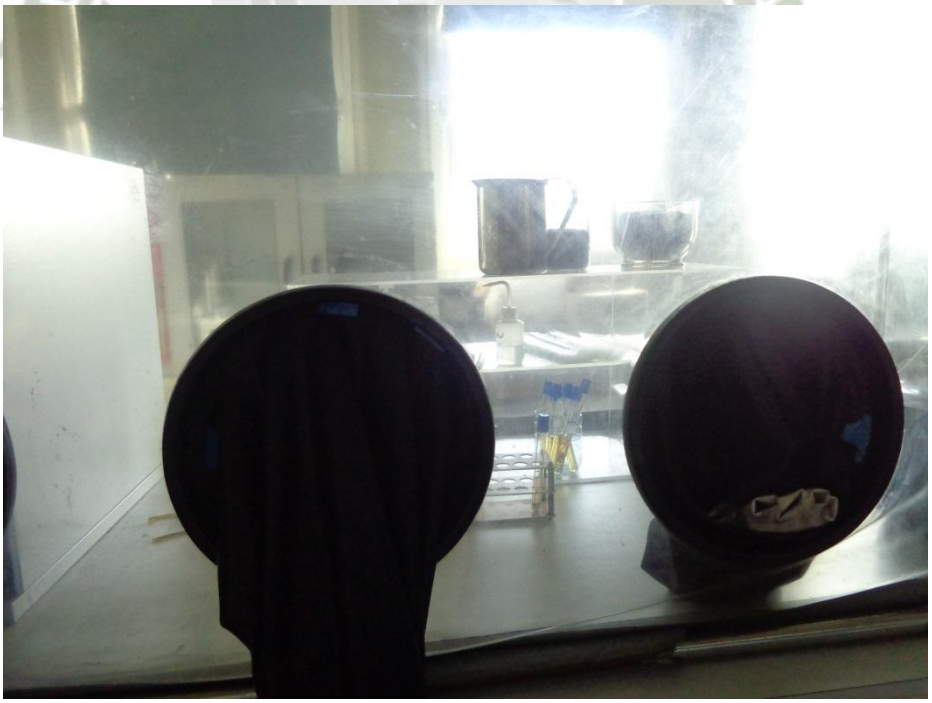


Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

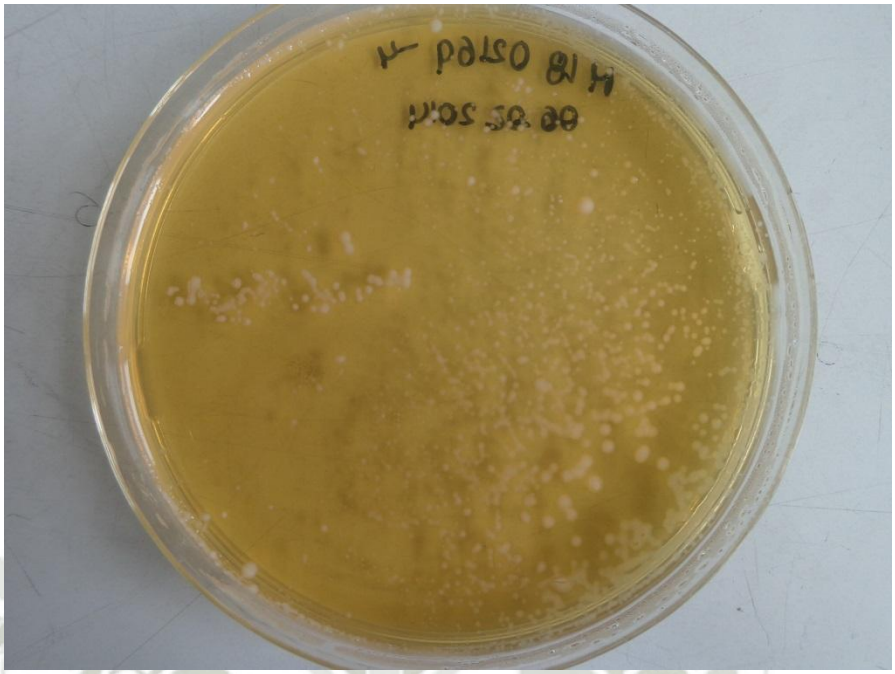


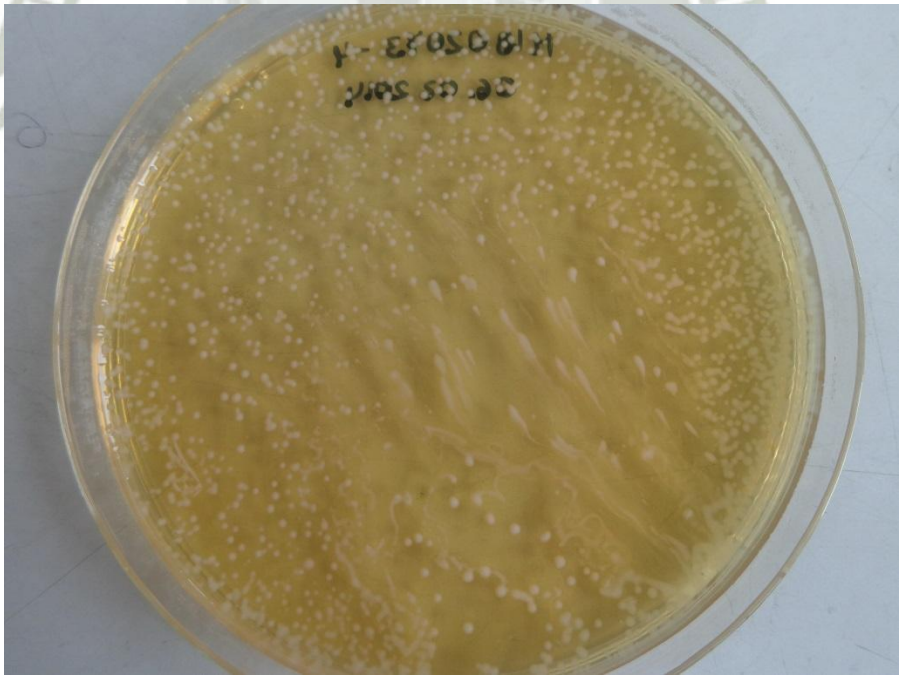


Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA





Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ANEXO VIII

SOLUCIÓN RINGER – CISTEÍNA

Productos utilizados:

- Pastillas de ringer 2 pastillas
- Clorhidrato de cisteína 0,3 g
- Agua de osmosis inversa csp 1L

Composición de pastillas Ringer:

- NaCl 2,25 g
- KCl 0,105 g
- $CaCl_2$ 0,120 g
- Na_2CO_3 0,05 g
- pH 7 (después de la autoclave)

Procedimiento:

- Vertir 1L de agua de osmosis inversa en una marmita.
- Colocar en una placa caliente.
- Colocar el número de pastillas por 1 L en la marmita conteniendo agua.
- Calentar para mezclar todos los restos de las pastillas.
- Medir el pH del medio y adaptarse a 6,8 (para tener un pH 7 tras autoclave).
- Distribuir 9 ml de solución por cada tubo. Tapar el tubo.
- Esterilizar los tubos en una autoclave por 20 minutos a 121 °C.
- Después de retirar los tubos de la autoclave, dejar que los tubos estén fríos y luego se almacena a 4 ° C.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ANEXO IX

TABLAS DE RESULTADOS DE LA MEDICIÓN DE pH (PODER TAMPÓN CON ACETATO Y LACTALBÚMINA A DIFERENTES CONCENTRACIONES)

Poder tampón SIN ACETATO

3,84 g/L K_2HPO_4 + 3,0 g/L KH_2PO_4		
Molaridad M	**HCl 3M (ml.)**	**pH**
	0,0	6,80
0,0015	0,5	6,12
0,003	1,0	3,36
0,0045	1,5	2,20
0,006	2,0	1,87
0,0075	2,5	1,75
0,009	3,0	1,60
0,0105	3,5	1,48
0,012	4,0	1,40
0,0135	4,5	1,33
0,015	5,0	1,26
0,0165	5,5	1,19
0,018	6,0	1,13
0,0195	6,5	1,06
0,021	7,0	1,00
0,0225	7,5	0,96

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Poder tampón CON ACETATO (2,0 g/L)

3,84 g/L K_2HPO_4 + 3,0 g/L KH_2PO_4 + 2,0 g/L Acetato de Amonio		
Molaridad M	**HCl 3M (ml.)**	**pH**
	0,0	6,80
0,0015	0,5	6,18
0,003	1,0	5,10
0,0045	1,5	4,18
0,006	2,0	2,77
0,0075	2,5	2,20
0,009	3,0	1,90
0,0105	3,5	1,68
0,012	4,0	1,53
0,0135	4,5	1,41
0,015	5,0	1,31
0,0165	5,5	1,23
0,018	6,0	1,16
0,0195	6,5	1,09
0,021	7,0	1,04
0,0225	7,5	0,99

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Poder tampón CON ACETATO DE AMONIO (3,85 g/L)

3,84 g/L K_2HPO_4 + 3,0 g/L KH_2PO_4 + 3,85 g/L Acetato de Amonio			
Molaridad M	**HCl 3M (ml.)**	**pH**	**Temp°**
	0,0	6,8	21,4
0,0015	0,5	6,1	21,5
0,003	1,0	5,2	21,6
0,0045	1,5	4,6	21,7
0,006	2,0	4,1	21,8
0,0075	2,5	3,0	21,9
0,009	3,0	2,3	22,0
0,0105	3,5	1,9	22,1
0,012	4,0	1,7	22,2
0,0135	4,5	1,5	22,3
0,015	5,0	1,4	22,4
0,0165	5,5	1,3	22,4
0,018	6,0	1,2	22,5
0,0195	6,5	1,1	22,6
0,021	7,0	1,0	22,7
0,0225	7,5	1,0	22,8

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Poder tampón CON ACETATO DE AMONIO (5,0 g/L)

3,84 g/L K_2HPO_4 + 3,0 g/L KH_2PO_4 + 5,0 g/L Acetato de Amonio			
Molarité M	**HCl 3M (ml.)**	**pH**	**Temp°**
	0,0	6,80	21,8
0,0015	0,5	6,07	21,8
0,003	1,0	5,24	21,9
0,0045	1,5	4,72	21,9
0,006	2,0	4,26	22,0
0,0075	2,5	3,64	22,0
0,009	3,0	2,53	22,1
0,0105	3,5	2,04	22,1
0,012	4,0	1,73	22,2
0,0135	4,5	1,51	22,2
0,015	5,0	1,35	22,2
0,0165	5,5	1,23	22,3
0,018	6,0	1,12	22,3
0,0195	6,5	1,05	22,3
0,021	7,0	0,98	22,4
0,0225	7,5	0,87	22,4

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Poder tampón CON ACETATO DE AMONIO (2,0 g/L) y LACTALBÚMINA (2,0 g/L)

3,84 g/L K_2HPO_4 + 3,0 g/L KH_2PO_4 + 2,0 g/L Acetato de Amonio + 2,0 g/L Lactalbúmina			
Molaridad M	**HCl 3M (ml.)**	**pH**	**Temp°**
	0,0	6,8	18,7
0,0015	0,5	6,11	19,2
0,003	1,0	4,98	19,3
0,0045	1,5	4,17	19,4
0,006	2,0	2,92	19,6
0,0075	2,5	2,31	19,7
0,009	3,0	1,96	19,8
0,0105	3,5	1,73	19,9
0,012	4,0	1,55	20,0
0,0135	4,5	1,42	20,1
0,015	5,0	1,32	20,2
0,0165	5,5	1,23	20,2
0,018	6,0	1,16	20,4
0,0195	6,5	1,09	20,4
0,021	7,0	1,03	20,5
0,0225	7,5	0,98	20,6

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Poder tampón CON ACETATO DE AMONIO (2,0 g/L) Y LACTALBÚMINA (4,0g/L)

3,84 g/L K_2HPO_4 + 3,0 g/L KH_2PO_4 + 2,0 g/L Acetato de Amonio + 4,0 g/L Lactalbúmina			
Molaridad M	**HCl 3M (ml.)**	**pH**	**Temp°**
	0,0	6,8	19,3
0,0015	0,5	6,14	19,6
0,003	1,0	5,11	19,7
0,0045	1,5	4,27	19,8
0,006	2,0	3,33	19,9
0,0075	2,5	2,56	19,9
0,009	3,0	2,18	20,0
0,0105	3,5	1,91	20,1
0,012	4,0	1,70	20,2
0,0135	4,5	1,54	20,4
0,015	5,0	1,42	20,4
0,0165	5,5	1,31	20,5
0,018	6,0	1,25	20,6
0,0195	6,5	1,15	20,7
0,021	7,0	1,09	20,8
0,0225	7,5	1,04	20,9

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

ANEXO X

EXTRACCIÓN DE ADN BACTERIANO (kit NucleoSpin® TISSUE).

Todo el protocolo debe llevarse a cabo bajo PSM correctamente descontaminado antes de su uso, el uso de guantes es obligatorio durante toda la manipulación. Entre cada entrada y salida de las manos de PSM, pasar los guantes de nitrilo por alcohol de 70º.

- Centrifugar el tubo Biopur que contiene la suspensión bacteriana a 15000 rpm, 4°C, 5 min.
- Eliminar el sobrenadante, resuspender el sedimento bacteriano con 120 µl de tampón TE (Tris-HCl 20 mM, EDTA 2 mM, 1% de triton x100, pH 8)
- Añadir 80 µl de solución de lisozima a 50 mg/ml para una concentración final de 20 mg/ml de lisozima en cada muestra.
- Incubar el tubo en un baño maria de 30 a 60 min a 37°C.
- Cuando se haya terminado, poner el baño maria a 56°C.
- Añadir en la muestra 25 µl de proteinasa K a 20 mg/ml.
- Incubar en un baño maria de 1 a 2 horas a 56°C, agitar girando cada 10 minutos.
- Cuando haya terminado, poner el baño maria a 70°C.
- Añadir 20 µl de RNAsa A a 20 mg/mL.
- Incubar 5 min a temperatura ambiente y agitar (la agitación en vórtex inactiva RNAsa A).
- Añadir 200 µl de tampón B3 y colocar en el vórtex.
- Incubar en un baño maria durante 10 min a 70°C, y colocar en el vórtex.
- Añadir 210 µl de etanol a 95°, colocar en vórtex.
- Colocar la muestra en la columna.
- Centrifugar durante 1 min, 11000 rpm, 4°C.

(Repetir aumentando el tiempo de centrifugación si la muestra no está lista para pasar sobre la columna)

- Colocar el tampón BE a baño maria a 70°C.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

- Retirar el contenido del tubo colector y colocar la columna en el tubo.
- Añadir 500 µl de tampón BW.
- Centrifugar 1 min, 11000 rpm, 4°C.
- Retirar el contenido del tubo colector y colocar la columna en el tubo.
- Añadir 600 µl de tampón B5.
- Centrifugar 1 min, 11000 rpm, 4°C.
- Eliminar el contenido del tubo colector y colocar la columna en un nuevo tubo colector.
- Centrifugar durante 3 min, 19000 rpm, 4°C para eliminar el etanol residual.
- Colocar la columna en un tubo de Biopur.
- Añadir 100 µL de tampón BE (tampón de elución) en la columna.
- Incubar 1 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar 1 min, 8000 rpm, 4°C.
- Conservar el ADN a -20°C.

Mediante la repetición de esta etapa de elución, de 10 a 20% del ADN se recupera.

- Añadir 100 µL de tampón BE (tampón de elución) en la columna.
- Incubar 1 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar 1 min, 11000 rpm, 4°C.
- Retirar la columna, cerrar el tubo Biopur e identificar la muestra.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis