

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Medicina Humana
Escuela Profesional de Medicina Humana



“EFICACIA DE CONSORCIOS BACTERIANOS CON POTENCIAL PROBIÓTICO FRENTE A LA INFECCIÓN POR *Salmonella typhimurium* EN *Mus musculus* (RATONES)”

Tesis presentada por la Bachiller:

Valdivia Vega, Camila Alessandra

para optar el Título Profesional de

Médica Cirujana

Asesor (a):

Dra. Diaz Montoya, Diana Lucía

Arequipa - Perú

2023

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
MEDICINA HUMANA
TITULACIÓN CON TESIS
DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 14 de Abril del 2023

Dictamen: 009245-C-EPMH-2023

Visto el borrador del expediente 009245, presentado por:

2016601582 - VALDIVIA VEGA CAMILA ALESSANDRA

Titulado:

**EFICACIA DE CONSORCIOS BACTERIANOS CON POTENCIAL PROBIÓTICO FRENTE A LA
INFECCIÓN POR SALMONELLA TYPHIMURIUM EN MUS MUSCULUS (RATONES)**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**29244943 - VASQUEZ HUERTA VICTOR LUIS
DICTAMINADOR**



**29389055 - DEL CASTILLO SOLORZANO NOEMI
DICTAMINADOR**



**29719524 - VARGAS OLIVERA GERMAN AUGUSTO
DICTAMINADOR**



DEDICATORIAS



A mis padres Nilda y José Carlos

A mi hermano Juan Carlos y a mi Lalita

AGRADECIMIENTOS

*Quiero agradecer primero a mi madre Nilda,
por todos los años que me regaló a su lado y
todo lo que me enseñó en el camino,
aunque no pudo acompañarme este último año presencialmente
siempre estará espiritualmente en mi corazón,
y espero se sienta muy orgullosa de este logro y esté gozando de paz y alegría.*

*Agradecer a mi padre José Carlos que está conmigo
y siempre me apoyó y no permitió que me rindiera.*

*A mi hermano Juan Carlos,
mi ejemplo a seguir que me motiva a seguir adelante
y esperando algún día llegar a ser tan buena
como él en todos los ámbitos de su vida.*

*A mi enamorado Fernando que me acompañó todos estos años y
fue mi fortaleza cada vez que me quería derrumbar,
estoy muy agradecida por todo
el apoyo que me ha dado sobre todo este último año.*

*Gracias a toda mi familia que creyó en mí;
este logro es para todos ustedes.*

RESUMEN

Introducción: Es de conocimiento que la tasa de enfermedades diarreicas en el Perú es alta debido a las malas condiciones sanitarias en las que vivimos. La infección por *Salmonella* no tifoidea, específicamente la especie *Salmonella typhimurium*, tiene una alta incidencia de infección en nuestro país, la cual actúa directamente afectando al intestino delgado. Adicionalmente, se ha visto que las *Salmonellas* no tifoideas han desarrollado resistencia a los antibióticos. Es por esto, por lo que es necesario determinar si la aplicación de bacterias probióticas ayuda a combatir esta infección y a disminuir el compromiso de la mucosa intestinal.

Objetivos y técnica: El objetivo de este trabajo de investigación fue evaluar la eficacia de la administración de consorcios bacterianos con potencial probiótico frente a la infección por *S. typhimurium* en *Mus musculus*. Se dividió a la muestra de estudio conformado por 36 ratones, en cuatro grupos de tratamientos (n=9): Grupo 1: *L. lactis*; Grupo 2: *B. licheniformis*, Grupo 3: *L. lactis* y *B. licheniformis*; Grupo 4: control negativo: sólo suero fisiológico. Al tercer día de tratamiento, se les inoculó el microorganismo infectante *S. typhimurium*. Se hizo la recolección de heces de cada grupo de estudio para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC). Al final, se realizó el sacrificio de los sujetos de estudio y se recolectó una biopsia de intestino delgado para su análisis anatomopatológico y determinación de los cambios en la mucosa intestinal.

Resultados: Los ratones tratados con el consorcio bacteriano de *L. lactis* y *B. licheniformis* tuvieron un grado de actividad inflamatoria leve (77.78%), evidenciado en el estudio anatomopatológico. El número de UFC en heces de ratones posterior a la infección por *S. typhimurium* al sexto día de tratamiento disminuyó significativamente en el grupo al que se le aplicó el consorcio bacteriano de *L. lactis* y *B. licheniformis*.

Conclusiones: Durante la infección de *S. typhimurium*, el tratamiento con el consorcio bacteriano *Lactococcus lactis* y *Bacillus licheniformis* tuvo una mejor respuesta a la infección que los otros tratamientos, evidenciado en la disminución de grado de actividad inflamatoria de la mucosa intestinal y en la disminución significativa de las UFCx10⁵ en heces de ratones.

Palabras clave: *Salmonella typhimurium*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus licheniformis*.

ABSTRACT

Introduction: It is known that the rate of diarrheal diseases in Peru is high due to the poor sanitary conditions in which we live. Non-typhoid *Salmonella* infection, specifically the species *Salmonella typhimurium*, has a high incidence of infection in our country, which acts directly affecting the small intestine. Additionally, it has been seen that non-typhoidal *Salmonellas* have developed resistance to antibiotics. For this reason, it is necessary to determine if the application of probiotic bacteria helps to combat this infection and to reduce the compromise of the intestinal mucosa.

Objectives and technique: The objective of this research work was to evaluate the efficacy of the administration of bacterial consortia with probiotic potential against infection by *S. typhimurium* in *Mus musculus* (mice). The study sample made up of 36 mice was divided into four treatment groups (n=9): Group 1: *L. lactis* inoculation; Group 2: *B. licheniformis*, Group 3: *L. lactis* and *B. licheniformis*; Group 4: negative control: only physiological serum. On the third day of treatment, they were inoculated with the infecting microorganism *S. typhimurium*. Feces were collected from each study group to determine the colony-forming units (CFU). At the end, the study subjects were sacrificed and a small intestine biopsy was collected for pathological analysis and determination of intestinal mucosal changes.

Results: Mice treated with the bacterial consortium of *L. lactis* and *B. licheniformis* had a degree of mild inflammatory activity (77.78%), evidenced in the anatomopathological study. The number of CFUs in mouse feces after infection by *S. typhimurium* on the sixth day of treatment decreased significantly in the group to which the bacterial consortium of *L. lactis* and *B. licheniformis* was applied.

Conclusions: During the infection of *S. typhimurium*, the treatment with the bacterial consortium *Lactococcus lactis* and *Bacillus licheniformis* had a better response to the infection than the other treatments, evidenced in the decrease in the degree of inflammatory activity of the intestinal mucosa and in the decrease of CFUx10⁵ in mouse feces.

Key words: *Salmonella typhimurium*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus licheniformis*.

INDICE GENERAL

DEDICATORIAS	3
AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INDICE GENERAL	7
INTRODUCCIÓN	9
CAPITULO I: PLANTEAMIENTO TEÓRICO	10
1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	11
1.1. Determinación del problema.....	11
1.2. Enunciado del problema.....	11
1.3. Descripción del problema	11
1.4. Justificación del problema	13
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo general:.....	14
2.2. Objetivo específico:.....	14
3. MARCO TEÓRICO	15
3.1. CONCEPTO.....	15
3.2. PATOGENESIS	15
3.3. EPIDEMIOLOGÍA	17
3.4. CLÍNICA.....	17
3.5. MANEJO.....	18
3.6. PROBIÓTICOS.....	19
4. ANÁLISIS DE ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	20
4.1. A nivel local	20
4.2. A nivel nacional	20
4.3. A nivel internacional	22
5. HIPÓTESIS	28
CAPITULO II: PLANTEAMIENTO OPERACIONAL	29
1. TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACIÓN	30

1.1. Técnica:.....	30
1.2. Manejo de los animales de experimentación:	31
1.3. Instrumentos:.....	31
1.4. Materiales:.....	31
2. CAMPO DE VERIFICACIÓN	32
2.1. Ubicación espacial:	32
2.2. Ubicación temporal:.....	32
2.3. Unidades de estudio:.....	32
3.1. Organización:.....	33
3.2. Recursos:.....	33
3.3. Validación del instrumento:.....	33
3.4. Ética de la experimentación con animales:.....	34
3.5. Criterios o estrategias para el manejo de resultados:	34
CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN:	35
3.1. RESULTADOS:	36
3.1.1. Estudio anatomopatológico de la biopsia intestinal de ratones:.....	36
3.1.2. Valoración del conteo de UFC bacterianas en muestra de heces de ratones.....	42
3.2. COMENTARIOS Y DISCUSIÓN:.....	51
CONCLUSIONES:.....	55
RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS:	56
REFERENCIAS	57
ANEXOS	61
ANEXO 1: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS 1	62
ANEXO 2: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS 2	63
ANEXO 3: INDICE DE ACTIVIDAD HISTOLÓGIA SEGÚN Gupta y cols, 2007	64
ANEXO 4: COMITÉ DE ETICA.....	65
ANEXO 5: MATRIZ DE RECOLECCIÓN DE DATOS	67
ANEXO 6: EVIDENCIA FOTOGRÁFICA DEL ANALISIS ANATOMOPATOLÓGICO DE MUESTRA DE INTESTINO DELGADO.....	69

INTRODUCCIÓN

Es de conocimiento que la tasa de enfermedades diarreicas en el Perú es alta debido a las malas condiciones sanitarias en las que vivimos al ser nuestro país uno tercermundista; además de esto, tenemos que recalcar que la pobreza en el Perú tiene una alta incidencia y es la mayoría de nuestra población, por lo tanto, una mayor cantidad de personas no cuentan con las condiciones necesarias para el acceso a los servicios básicos como el agua. Según un reporte del Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI) del 2017, el servicio higiénico conectado a redes públicas en el área rural es solo el 20% de viviendas y por lo tanto tampoco a un adecuado proceso de sanitización de los alimentos y de aseo personal como el lavado de manos (1).

Adicionalmente a esto, he de recalcar que “la resistencia a los antibióticos está en incremento día a día, debido a su uso incorrecto por la población, ya que lamentablemente no contamos con un buen sistema de educación de nuestra comunidad para poderles inculcar la no automedicación y las consecuencias negativas que esto podría desenvolver en su salud a largo plazo” (2,3).

“Al tener nosotros mayor incidencia de resistencia a los antibióticos, limita nuestro accionar para el manejo de los pacientes que presentan infecciones que requieren antibioticoterapia, teniendo a la larga menos opciones de tratamiento y más complicaciones de los casos” (3).

Por todo lo mencionado anteriormente, es que las infecciones gastrointestinales y su manejo toman una gran importancia para su investigación, ya que con esto podríamos mejorar la calidad de vida de la población tanto en la prevención como el tratamiento de dichas enfermedades que tanto acechan a nuestra comunidad.



CAPITULO I: PLANTEAMIENTO TEÓRICO

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Determinación del problema

La infección por salmonella no tifoidea, específicamente la variedad *Salmonella typhimurium* tiene alta incidencia de infección en nuestro país, esta actúa directamente en la mucosa intestinal, prioritariamente a nivel del intestino delgado generando una respuesta inflamatoria a este nivel e incluso su destrucción. Adicionalmente se ha visto que las salmonelas no tifoideas tienen mayor resistencia a los antibióticos. Es por esto por lo que es necesario determinar si el uso de probióticos ayudaría a combatir la infección y a disminuir el compromiso de la mucosa intestinal.

1.2. Enunciado del problema

¿Es eficaz la aplicación de consorcios bacterianos con potencial probiótico en el manejo de la infección por *Salmonella typhimurium* en *Mus musculus*?

1.3. Descripción del problema

1.3.1. Área de conocimiento

- Área general: Ciencias de la Salud
- Área específica: Medicina Humana
- Especialidad: Biotecnología aplicada a la salud
- Línea: Manejo de infección por salmonella no tifoidea

1.3.2. Análisis u operacionalización de variables e indicadores

VARIABLES	INDICADORES	ESCALA/VALOR	UNIDAD/CATEGORIA
Independiente: Bacterias con potencial probiótico	Ratones inoculados con 9×10^8 UFC/mL de <i>Lactococcus lactis</i>	Nominal 9×10^8 UFC/mL	Se administró
	Ratones inoculados con 9×10^8 UFC/mL de <i>Bacillus licheniformis</i>	Nominal 9×10^8 UFC/mL	No se administró
	Ratones inoculados con 9×10^8 UFC/mL de <i>Lactococcus lactis</i>	Nominal 9×10^8 UFC/mL	Se administró
	Ratones inoculados con 9×10^8 UFC/mL de <i>Bacillus licheniformis</i>	Nominal 9×10^8 UFC/mL	No se administró

	Ratones inoculados con 9×10^8 UFC/mL de <i>Lactococcus lactis</i> y <i>Bacillus licheniformis</i> en consorcio	Nominal 9×10^8 UFC/mL	Se administró No se administró
Dependiente: Análisis anatomopatológico de mucosa intestinal	Reacción inflamatoria local (índice de actividad histológica)	Ordinal	Grado 0: Inactivo o ausente Grado 1: Leve Grado 2: Moderado Grado 3: Acentuada
Dependiente: Valoración de bacterias en heces	Conteo de bacterias mesófilas en muestra de heces de ratones antes y después de la infección por <i>Salmonella typhimurium</i>	Nominal Número de UFCx 10^5 /mL	Aumento de UFC/mL Disminución de UFC/mL

1.3.3. Interrogantes básicas:

- ¿La aplicación de probióticos (*L. lactis*, *B. licheniformis* y ambos en consorcio) en *mus musculus* infectados con *salmonella typhimurium* tendrá algún efecto sobre la mucosa intestinal?
- ¿La aplicación de probióticos (*L. lactis*, *B. licheniformis* y ambos en consorcio) en *mus musculus* infectados con *salmonella typhimurium* tendrá algún efecto sobre el número de UFC bacterianas de *S. typhimurium* en muestras de heces?
- ¿Qué efecto tiene la aplicación de probióticos (*L. lactis*, *B. licheniformis* y ambos en consorcio) en *Mus musculus* infectados con *salmonella typhimurium*?

1.3.4. Tipo de investigación:

Básica

1.3.5. **Diseño de investigación:**

Cuantitativo, experimental, longitudinal y prospectivo.

1.3.6. **Nivel de investigación:**

Experimental

1.4. **Justificación del problema**

1.4.1. **Social:** La incidencia de enfermedades diarreicas en el Perú es alto debido a las malas condiciones sanitarias en las que vivimos “Según el reporte del INEI del 2017, los servicios higiénicos conectados con las redes públicas es mayor en el área urbana (87.2%) que en el área rural (20%)” (1). Adicionalmente a esto he de recalcar que “la resistencia a los antibióticos está en incremento día a día debido al uso inadecuado de estos por la población, siendo este un factor importante para la dificultad del manejo de infección por salmonella no tifoidea en la población, siendo entre estas la de mayor incidencia la *Salmonella typhimurium*” (4). Es por esto la necesidad de determinar la eficacia del uso de probióticos en el manejo.

1.4.2. **Teórica:** “Las enfermedades infecciosas gastrointestinales que sobresalen son las infecciones por *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli* diarreogénica, *Salmonella spp.*, *Shiguella spp.* y *Yersinia spp.*” (5). “Para el manejo de estas enfermedades en su mayoría de veces son necesarias las antibioticoterapias, sin embargo este manejo también trae consecuencias en la microbiota intestinal y dificulta su restablecimiento posterior al tratamiento” (6). “El manejo adicional con probióticos ayuda al tratamiento de la infección y a la recuperación de dicha mucosa intestinal dañada, y a su vez reduce la respuesta inflamatoria producida por estos patógenos intestinales” (7). Por este motivo es que este estudio experimental busca evidenciar la eficacia del uso de consorcios bacterianos con potencial probiótico en el manejo de la infección por *Salmonella typhimurium* y su beneficio sobre la mucosa intestinal en ratones, para que posteriormente se puede extrapolar los resultados a humanos.

1.4.3. **Práctica:** Este presente estudio tiene como objetivo brindar información actual acerca de la eficacia del manejo de infección de *Salmonella typhimurium* con consorcios bacterianos para así poder iniciar su utilización en el protocolo de manejo de esta enfermedad en el futuro junto con el manejo antibiótico actual.

- 1.4.4. **Personal:** Como estudiante de medicina en el presente estudio tengo como objetivo el mejoramiento del manejo de gastroenteritis por salmonella no tifoidea y así cumplir con mi deber personal del cuidado de la vida humana. Así mismo con el presente estudio busco poder obtener el título de médico- cirujano.
- 1.4.5. **Originalidad:** Este estudio es original debido a que no se ha realizado en el Perú, y al evidenciar los resultados podría evolucionar el manejo de infección por *Salmonella typhimurium* para un mejor desarrollo de la enfermedad.
- 1.4.6. **Factibilidad:** El presente estudio se realizó experimentalmente con el financiamiento del concurso realizado por el vicerrectorado de investigación de la Universidad Católica de Santa María, cuyo desarrollo de la investigación se realizó en las instalaciones de esta casa universitaria.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general:

Evaluar la eficacia de la administración de consorcios bacterianos con potencial probiótico frente a la infección por *Salmonella typhimurium* en *Mus musculus* (ratones).

2.2. Objetivo específico:

- Realizar un estudio anatomopatológico de la biopsia intestinal de ratones infectados con *S. typhimurium* para evaluar la eficacia de la administración de *Lactococcus lactis*, *Bacillus licheniformis* y ambos en consorcio.
- Valorar el conteo de UFC bacterianas de *S. typhimurium* en muestras de heces de ratones infectados con *S. typhimurium* y tratados con bacterias probióticas *L. lactis*, *B. licheniformis* y ambos en consorcio).
- Comparar el efecto de la aplicación de inóculos bacterianos con potencial probiótico en suspensiones orales de *Lactococcus lactis*, *Bacillus licheniformis* y ambos en consorcio a ratones infectados con *Salmonella typhimurium*.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. CONCEPTO

“Salmonella es de la familia de las enterobacterias, es de tipo Gram (-) y anaerobia facultativa, móvil. Esta salmonella se divide en dos especies, una de las cuales es la Salmonella entérica que tiene su subespecie entérica donde abarca lo que es *Salmonella typhi*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium*” (8).

“Las especies de Salmonella no tifoidea producen cuadros de diarrea severa en los humanos, de estas, la más importante es *S. typhimurium*, la cual tiene la capacidad de infectar tanto a humanos como a especies animales” (9).

3.2. PATOGENESIS

“Dentro de las salmonelas, las especies no tifoideas son transmitidos por los alimentos, en especial con los productos de granja tanto animales como vegetales, más específicamente con las aves de corral y los huevos” (10).

“El periodo en el que incuba dicho microorganismo es de 8 a 72 horas, sin embargo ha habido estudios que consideran que el periodo es más largo, llegando hasta los 6-14 días (promedio 8 días)” (11).

“El cuadro clínico se presenta principalmente por la respuesta proinflamatoria que se liberan por la bacteria, por ejemplo la respuesta de los neutrófilos y la producción de interleucinas (IL-8)” (12).

“Posterior a la ingesta de la salmonella, esta llegará a la mucosa del intestino delgado e invadirá las células M que se encuentran en las placas de Peyer y los enterocitos. Estas bacterias se replican en las vacuolas endocíticas. Todo este proceso ocurre gracias a los islotes de patogenicidad I y II de los cromosomas bacterianos que producen proteínas invasivas secretadas por *Salmonella* y también tienen genes que evaden el sistema de respuesta inmunitaria del hospedador. Esta respuesta inflamatoria solo se limita a la mucosa intestinal” (13).

Mecanismos de adherencia e invasión:

“Hay dos componentes principales para la infección por *Salmonella* del tracto gastrointestinal: adherencia e invasión posterior. La adherencia es compleja y está mediada

por múltiples genes. Las fimbrias son muy importantes para adherirse y adaptarse a una superficie celular eucariota; pero varios mecanismos como los operones fimbriales, el biofilm también se encuentran en los mecanismos de adherencia” (14).

La invasión puede lograrse mediante varios mecanismos diferentes:

- “La *Salmonella* puede adherirse selectivamente a células epiteliales especializadas que recubren los parches de Peyer en el colon conocidos como células M. Estas células son importantes para la entrada de *Salmonella* y otros patógenos en el sistema linfoide submucoso. Las células M son altamente endocíticas y pueden transferir rápidamente material desde su lado luminal a su lado basal, donde residen las células T y las células presentadoras de antígeno, listas para provocar una respuesta inmune” (15).
- “Se ha sugerido que las células del epitelio columnar también pueden ser un importante portal común de entrada para *Salmonella*, particularmente porque superan en gran medida a las células M” (16).
- “Las salmonelas también pueden inducir a las células no fagocíticas, como los enterocitos, e internalizarlas. Este proceso de endocitosis mediada por bacterias ha sido ampliamente estudiado in vitro y parece ser importante en la patogénesis de la gastroenteritis por *Salmonella*” (17).
- “La invasión también puede ocurrir a través de las células dendríticas que se intercalan entre las células epiteliales extendiendo las protuberancias en la luz intestinal” (17).

“En la actualidad, los estudios de los cambios en la mucosa intestinal frente a salmonella se realizan en ratones por su susceptibilidad a generar la infección con el serotipo *Salmonella typhimurium* que puede ser comparable con los humanos incluso a la infección por *Salmonella typhi*, es decir, presentan el cuadro de fiebre tifoidea” (12).

“En estos modelos animales las manifestaciones tempranas que presenta al inocular la enfermedad es la adhesión e invasión del epitelio intestinal por los microorganismos y en consecuencia la inflamación de la lámina propia y los nódulos linfáticos” (18).

3.3. EPIDEMIOLOGÍA

“La infección de salmonella no tifoidea es la causa predominante de gastroenteritis y diarrea en el mundo, dentro de estas, los agentes causantes más relevantes son la *Salmonella enteritidis*, *S. newport* y *S. typhimurium*” (4).

“Esta infección está estrechamente relacionada con las enfermedades transmitidas por los alimentos, relacionados principalmente con productos lácteos, animales y productos de corral, carnes mal cocidas, frutas y verduras contaminadas, entre otros” (19).

Según la OMS “cada año se enferman 550 millones de personas, de estas, 220 millones son representados por niños menores de 5 años y la Salmonella es de las cuatro causas principales de diarreas en el mundo” (20).

“En el Perú estas enfermedades transmitidas por los alimentos tienen importancia en la salud pública porque influyen mucho en la morbilidad del país. Los departamentos con mayor incidencia de estas en los últimos 5 años son Lima (20.3%), Junín (10,1 %), Cajamarca (9,6 %), Cusco (8,6 %), Huánuco (6 %), Loreto (5,6 %) y Piura (4,7 %)” (19).

“En el 2018 se evidencio que, de todos los brotes de estas enfermedades, el 37.9% fueron producidas por Salmonella” (19).

3.4. CLÍNICA

“Se presentan dos cuadros clínicos de acuerdo con el serotipo de infección. Uno de ellos es la fiebre entérica y paratifoidea que se da por la *Salmonella typhi* y *paratyphi* respectivamente; el segundo tipo de presentación es la gastroenteritis que es el cuadro clínico más común producido principalmente por *Salmonella Enteritidis* y *Salmonella typhimurium*” (12).

“Las salmonelosis no tifoideas mayormente son clínicamente leves y en algunos casos no presentan clínica; la gravedad del cuadro y su duración va a estar dado por la cantidad de bacterias que se han consumido; sin embargo, dentro del cuadro se puede encontrar náuseas, vómitos, fiebre, calambre abdominal y diarreas” (4).

Según un estudio realizado se determinó que “las características clínicas que sobresalieron frente a la infección por salmonella no tifoidea fueron el dolor abdominal (83%), fiebre (82%) y diarrea sanguinolenta (42%)” (10).

“El cuadro de la infección se resolverá inicialmente la fiebre, en 48- 72 horas y las diarreas se resolverán a los 4- 10 días. La presentación de la enfermedad grave se caracteriza por diarrea intensa (9 a 10 veces por día), fiebre alta persistente y necesidad de hospitalización” (4).

3.5. MANEJO

“La mayoría de esta enfermedad infecciosa se autolimita y solo necesita principalmente tratamiento con la reposición de líquidos y electrolitos. Los casos que necesitan tratamiento antimicrobiano son aquellas moderadas o graves, que se asocian a una comorbilidad que comprometa negativamente la inmunidad y las edades extremas de la vida que se puedan complicar más y puedan llevar a una infección sistémica. El antibiótico de elección para la infección por *Salmonella* en adultos y adolescentes son las fluoroquinolonas debido a su eficacia frente a bacterias entéricas gram (-) y su capacidad de acción a nivel tisular e intracelular. La dosis utilizada es el ciprofloxacino 500mg VO c/12 horas o el levofloxacino 500mg VO C/24 horas” (4).

Se ha determinado que “el tratamiento antibiótico empírico en pacientes inmunocompetentes que presentan diarreas moderada a severa es de 3 a 7 días” (21).

El tiempo de tratamiento de pacientes inmunocomprometidos es de más tiempo debido a que se trata de evitar las infecciones persistentes o recurrentes; este tratamiento “dura más de 14 días, puede llegar a durar de semanas a meses y deben estar en vigilancia constante por el riesgo de bacteriemia”(22).

Sin embargo, se ha evidenciado que las salmonelas no tifoideas tienen mayor resistencia a los antibióticos:

- En Estados Unidos “8.6% de las cepas de *Salmonella* no tifoidea son resistentes al ácido nalidíxico y el 0.5% son resistentes a la ciprofloxacina. El 3.5% de los aislados de *Salmonella* no tifoideales en los son resistentes a la ceftriaxona (23).
- En Europa el “16,7% de las cepas son resistentes al ácido nalidíxico y el 13,5% a la ciprofloxacina. El 1,8% de los aislados reportados son resistentes a la cefotaxima”(24).
- En el Perú “La susceptibilidad a antibióticos frente a salmonelosis fue de 83,3% a ceftriaxona, 78,8% a cotrimoxazol y 75,0% a cloranfenicol. Sólo 50,8% fueron susceptibles a ciprofloxacino” (25).

Relación de la expresión de *Salmonella typhimurium* en cultivos de heces posterior al manejo:

“Aproximadamente la excreción de *S. typhimurium* en heces dura 5 semanas, pudiendo llegar hasta 7 semanas en niños menores de cinco años. En el tiempo de excreción del microorganismo también influirá si la infección es sintomática o no, de tal manera que si es sintomática implicará mayor tiempo de excreción; incluso la antibioticoterapia no disminuye esta duración, incluso la puede incrementar y hasta puede promover su resistencia” (4).

3.6. PROBIÓTICOS

“La mucosa intestinal del humano está compuesta por comunidades microbianas como hongos, bacterias y virus; sólo del estómago hasta el recto tenemos aproximadamente 10^{14} microorganismos y más de 2 000 especies. En esta composición influye la edad, dieta, genética y el consumo de antibióticos de cada persona. El equilibrio de toda esta microbiota determina la salud del humano” (26).

Interacción con la flora intestinal : “tanto la transmisión de patógenos como la eliminación de patógenos de la luz intestinal pueden estar mediadas por la microbiota. En un estudio, los ratones con flora intestinal de baja complejidad no lograron eliminar el *S. typhimurium* de la luz intestinal, y la eliminación del patógeno se logró mediante la transferencia de una microbiota compleja normal. Por lo tanto, además de prevenir la transmisión de patógenos por una microbiota intacta (también conocida como resistencia a la colonización), la microbiota también facilita la eliminación de patógenos, una segunda función protectora novedosa” (16).

Se evidenció que “el uso de probióticos en las diarreas infecciosas agudas del adulto disminuía el tiempo de hospitalización y el tiempo de duración de dicha diarrea. Sin embargo, el uso excesivo de este tenía como efectos adversos generar toxinas y albergar genes de resistencia antimicrobiana” (27).

A. Jakobson y L. Lam comprobaron que “la microbiota intestinal normal produce propionato, este es un ácido graso de cadena corta que evita la colonización de *Salmonella typhimurium*. Este estudio lo realizó in vitro donde el propionato inhibe directamente su crecimiento al interrumpir la homeostasis del pH intracelular”(28).

Se realizó un estudio donde se evidenció que “la microbiota intestinal normal produce propionato, este es un ácido graso de cadena corta que evita la colonización de *Salmonella typhimurium*, por lo que la administración de *Bacteroides thetaiotaomicron*, un probiótico productor de propionato, incrementaba la resistencia a la colonización”(29).

***Lactococcus lactis*:**

- “El *Lactococcus lactis*, en específico la subunidad cremoris tiene una proteína que es la Lactococcina A, la cual presenta propiedades fisicoquímica que le otorgan una función antimicrobiana”(30).

Bacillus licheniformis

- “El *Bacillus licheniformis* demostró ser un buen antiinflamatorio y tener respuesta antioxidante, e inhibió satisfactoriamente la adhesión a bacterias patógenas de *E. coli* y *Salmonella typhimurium*”(31).

4. ANÁLISIS DE ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

4.1. A nivel local

No existe información a nivel local acerca de la utilización de *Bacillus licheniformis*, *Lactococcus lactis* ni de otros probióticos en el manejo de *Salmonella typhimurium* y los efectos que este podría causar frente a dicha infección.

4.2. A nivel nacional

A) AUTOR: “Fortunato Escobar Mamani, Félix Pompeyo Ferro Mayhua, Nelly, Martha Rocha Zapana, Alicia Magaly Leon Tacca” (2).

TITULO: “Seminario Internacional “resistencia a antibióticos”: Amenaza global a la salud pública - Universidad Nacional del Altiplano, Puno Perú”(2).

RESUMEN: “En las instalaciones de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno - Perú (Ciudad Universitaria) del 05 al 07 de noviembre 2019, se llevó a cabo el “Seminario Internacional resistencia a antibióticos: amenaza global a la salud pública”. Evento financiado por Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología - CONCYTEC-, en alianza estratégica con la Escuela Superior de Biotecnología de la Universidad Católica Portuguesa; con el objeto de “difundir el problema de

resistencia a los antibióticos como amenaza global a la salud pública”, tanto en el escenario local e internacional; respecto a la forma cómo las bacterias con factores de resistencia antimicrobiana presentes en ambiente natural pueden ser transmitidos a los seres humanos. Las bacterias inducen a infecciones, y si no son adecuadamente combatidos, genera resistencia a los antibióticos, proceso abordado desde distintas posturas de los expositores invitados. De ellas, los temas abordados en el evento en su mayoría han recomendado la necesidad de adoptar medidas urgentes mediante la implementación de políticas públicas, para que las infecciones comunes o complejas resistentes a los antibióticos no se conviertan en mortales como lo prevé la ciencia. La presente edición especial dedicada al referido evento, en la primera parte presenta una descripción preliminar de la literatura científica referida a la resistencia a los antibióticos y sus implicancias; y en la segunda parte, se transcribe el resumen de las ponencias principales presentadas en el seminario a fin de que sea punto de partida para las siguientes investigaciones. En la tercera parte, termina con los manuscritos presentados y valorados positivamente como tema de debate en el Seminario Internacional y su relevancia de sus resultados”(2).

B) AUTOR: “Coralith García Apac” (32).

TITULO: “Resistencia antibiótica en el Perú y América Latina” (32).

RESUMEN: “La resistencia antibiótica es un problema creciente a nivel mundial. En América Latina las infecciones bacterianas importantes comienzan a incrementar su resistencia de manera alarmante. Esto significa que las bacterias vienen evolucionando, sobreviviendo y multiplicándose en cepas más difíciles de tratar, lo que puede causar enfermedades graves asociadas o muerte”(32).

C) AUTOR: “Valeria D. Parra-Payano, Claudia R. Rondón-Paz, Coralith García” (25).

TITULO: “Salmonelosis invasiva en un hospital de Lima, Perú” (25).

RESUMEN: “El objetivo del estudio fue determinar las características epidemiológicas, clínicas y laboratoriales de los casos de salmonelosis invasiva y el perfil de susceptibilidad antibiótica de aislamientos de salmonela (2013-2017), en una serie de casos de pacientes con *Salmonella* spp. aislada de secreciones y/o líquidos corporales con o sin coprocultivo positivo (n=70). Para la evaluación de la

susceptibilidad antibiótica se consideró el primer aislamiento en todos los casos de salmonelosis (n=168). La mayor frecuencia de casos ocurrió entre 0 a 4 años (14,3%) y mayores de 65 años (24,3%). Los síntomas más frecuentes fueron fiebre (66,1%), diarrea (40,7%) y trastorno del sensorio (40,7%). La infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) fue la comorbilidad más frecuente (42,4%). La frecuencia de susceptibilidad fue de 83,3% a ceftriaxona, 78,8% a cotrimoxazol y 75,0% a cloranfenicol. Sólo 50,8% fueron susceptibles a ciprofloxacino. Concluimos que, la salmonelosis invasiva fue más frecuente en niños pequeños y ancianos, y que la comorbilidad más frecuente fue la infección por VIH” (25).

4.3. A nivel internacional

A) AUTOR: “Catherine D. Shelton, Woongjae Yoo, Nicolas G. Shealy, Teresa P. Torres, Jacob K. Zieba, M. Wade Calcutt” (29).

TITULO: “*Salmonella enterica* serovar *typhimurium* utiliza la respiración anaeróbica para superar la resistencia a la colonización mediada por propionato” (29).

RESUMEN: “La microbiota intestinal beneficia al huésped al limitar la expansión del patógeno entérico (resistencia a la colonización), en parte a través de la producción de metabolitos inhibitorios. Se propone que el propionato, un ácido graso de cadena corta producido por los miembros de la microbiota, medie la resistencia a la colonización contra *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* (*S. Tm*). Aquí, mostramos que *S. Tm* supera los efectos inhibitorios del propionato al usarlo como fuente de carbono para la respiración anaeróbica. Determinamos que el metabolismo del propionato proporciona una ventaja de colonización dependiente de la inflamación a *S. Tm* durante la infección. Tal beneficio se abole en la luz intestinal de ratones libres de gérmenes infectados con *Salmonella*. Curiosamente, la expansión intestinal mediada por *propionato de S. Tm* se restaura cuando los ratones libres de gérmenes son monocolonizados con *Bacteroides thetaiotaomicron* (*B. theta*), un productor prominente de propionato en el intestino, pero no cuando los ratones son monocolonizados con una cepa *B. theta* deficiente en producción de propionato. Tomados en conjunto, nuestros resultados revelan una estrategia

utilizada por *S. Tm* para mitigar la resistencia a la colonización mediante el metabolismo del propionato derivado de la microbiota” (29).

- B) AUTOR: “Amanda Jacobson, Lilian Lam, Manohary Rajendram, Fiona Tamburini, Jared Honeycutt, Trung Pham, Will Van Treuren, Kali Pruss, Stephen Russell Stabler” (28).

TITULO: “Un metabolito intestinal producido por comensales media la resistencia de colonización a la infección por *Salmonella*” (28).

RESUMEN: “La microbiota intestinal proporciona resistencia a la colonización contra patógenos invasores, limitando la expansión de patógenos, la transmisión al medio ambiente y la infección de huéspedes ingenuos. Los mecanismos descritos anteriormente de resistencia a la colonización mediada por la microbiota se han identificado observando la pérdida de resistencia a la colonización después de perturbaciones de la comunidad, como el tratamiento con antibióticos o los cambios en la dieta. Aquí, identificamos un mecanismo mediado por microbiota de resistencia a la colonización contra el patógeno bacteriano intestinal *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (*S. Typhimurium*) comparando comunidades de alta complejidad con diferentes niveles de resistencia a la colonización. Usando dos cepas de ratones endogámicos con dinámicas de infección significativamente diferentes y cargas intestinales de *S. Typhimurium*, demostramos que las especies de *Bacteroides* median la resistencia a la colonización contra *S. Typhimurium* in vivo a través de la producción del propionato de ácidos grasos de cadena corta. Mostramos que el propionato inhibe directamente el crecimiento de *S. Typhimurium* in vitro al interrumpir la homeostasis del pH intracelular. Este trabajo proporciona la primera comprensión mecanicista del papel de las comunidades microbianas individualizadas en la variabilidad de huésped a huésped de la transmisión de patógenos” (28).

- C) AUTOR: “Vera Peralta, Cinthia Michelle” (27).

TITULO: “Efectos del uso de probióticos en diarrea infecciosa en adultos” (27).

RESUMEN: “Antecedentes: La diarrea es considerada una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. En los últimos años, se ha propuesto el consumo de probióticos para el tratamiento de la diarrea infecciosa.

Objetivo: Describir el uso de probióticos en diarrea infecciosa en adultos y establecer su efecto en la duración de la patología y el tiempo de hospitalización. Materiales y métodos: Se realizó un estudio bibliográfico narrativo, donde se incluyen artículos científicos: meta-análisis, revisiones sistemáticas, ensayos clínicos controlados, estudios de cohortes, desde el año 2016 hasta el año 2021, en idiomas inglés y español. Resultados: la fisiopatología de la diarrea infecciosa involucra dos mecanismos: daño al borde en cepillo vellosos del intestino (diarrea osmótica) y liberación de toxinas (diarrea secretora). El riesgo de diarrea infecciosa está relacionado a factores sociodemográficos, hábitos personales, ambientales. El uso de probióticos presenta muchas ventajas como el prevenir infecciones asociadas a *Clostridium difficile* o diarrea del viajero. Los probióticos tienen la capacidad de disminuir el tiempo de hospitalización y el tiempo de duración de la diarrea infecciosa. Por otro lado, el uso de probióticos involucra cierto riesgo para la salud, debido a sus efectos adversos al poseer la capacidad de generar toxinas y albergar genes de resistencia antimicrobiana. Conclusiones: el uso de probióticos confiere tanto efectos benéficos como adversos, pero hay que evaluar el contexto clínico para su administración al paciente. Otorgan particularmente disminución del tiempo de la enfermedad y de los días de hospitalización” (27).

D) AUTOR: “Ana Cristina Gomes-Santos, Rafael P. Oliveira¹, Thais G. Moreira, Archimedes B., Castro Junior, Bernardo C. Horta¹, Luisa Lemos, Leonardo A. Almeida¹, Rafael M” (33).

TITULO: “El *Lactococcus lactis* productor de Hsp65 previene la enfermedad intestinal inflamatoria en ratones por vías dependientes de IL-10 y TLR2”(33).

RESUMEN: “Las proteínas de choque térmico (Hsps) se expresan altamente en todos los sitios de inflamación. Como son antígenos ubicuos e inmunodominantes, estas moléculas representan buenos candidatos para el uso terapéutico de la tolerancia oral en enfermedades inflamatorias autoinmunes y crónicas. Las evidencias de estudios en humanos y animales indican que la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es el resultado de respuestas inflamatorias incontroladas a la microbiota intestinal. Las Hsp son proteínas inmunodominantes expresadas por varias células inmunes y por

bacterias comensales. Usando un modelo de ratón con EII, demostramos que el pretratamiento oral con *Lactococcus lactis* modificado genéticamente que produce y libera Mycobacterium Hsp65, previno completamente la colitis inducida por DSS en ratones C57BL / 6. La protección se asoció con citoquinas proinflamatorias reducidas, como IFN- γ , IL-6 y TNF- α ; aumento de la producción de IL-10 en el tejido colónico; y expansión de las células T reguladoras CD4+Foxp3+ y CD4+LAP+ en el bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos. Este efecto fue dependiente de IL-10 y del receptor tipo toll 2. Por lo tanto, este enfoque puede abrir opciones alternativas para el tratamiento a largo plazo de la EII” (33).

E) AUTOR: “Sebastián Posada Bustos, José Fernando Vera Chamorro”(34).

TITULO: “Probióticos en diarrea aguda, asociada a antibióticos y nosocomial: evidencia en pediatría” (34).

RESUMEN: “Introducción: los probióticos son microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, proveen una acción benéfica en el ser humano. Existen numerosos estudios acerca de su uso en enfermedad diarreica en pediatría, por lo que se hace necesario evaluar la evidencia. Métodos: se realizó una revisión de la literatura incluyendo solo metaanálisis y revisiones sistemáticas en los últimos 10 años acerca del uso de probióticos en diarrea aguda, diarrea asociada a antibióticos y *Clostridium difficile*, y diarrea nosocomial. Resultados: en diarrea aguda, los metaanálisis muestran disminución de la duración en un día (intervalo de confianza [IC] 95%; 15,9 a 33,6 horas) y disminución del riesgo de prolongación en los siguientes 4 y 7 días, con recomendaciones fuertes y evidencia moderada para *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Saccharomyces boulardii*. En diarrea asociada a antibióticos y a C. difficile, los metaanálisis mostraron reducción del riesgo entre el 50% y 60%, con recomendación fuerte para *L. rhamnosus* GG y *S. boulardii* con un número necesario a tratar (NNT) de 10 (IC 95%; 7-12). En diarrea nosocomial, se encontró evidencia moderada con el uso de *L. rhamnosus* GG, principalmente en reducción del riesgo de gastroenteritis sintomática por rotavirus. Sin evidencia suficiente para dar recomendación para las cepas *Streptococcus thermophilus* y *Bifidobacterium bifidum*. Conclusión: solo existe evidencia con los probióticos *L.*

rhamnosus GG y *S. boulardii* en reducción de la duración y disminución del riesgo de prolongación de diarrea aguda, así como reducción del riesgo entre 50% y 60% de diarrea asociada a antibióticos. Existe evidencia moderada con *L. rhamnosus* GG, en la reducción de riesgo de diarrea nosocomial” (34).

F) AUTOR: “Taboada Apaez, Karla Denisse” (30).

TITULO: “Análisis in silico de la proteína lactococcina A de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* como posible agente antimicrobiano” (30).

RESUMEN: “Existen alrededor de 31 especies de microorganismos causantes de enfermedades gastrointestinales. Entre estos microorganismos se encuentran diferentes especies de bacterias, el tratamiento para tratar estas enfermedades comprende el uso de antibióticos, un grupo de fármacos con diferentes mecanismos de acción dependiendo del tipo de bacteria causante de la infección. Sin embargo, con el paso del tiempo, las bacterias han adquirido diversos mecanismos de adaptación, entre ellos la resistencia a los antibióticos. El uso irracional de estos fármacos también afecta de manera importante a la microbiota intestinal es decir al grupo de bacterias que viven en nuestro cuerpo sin afectar nuestra salud y que además cumplen diferentes funciones dentro del organismo. Cuando se altera en número y/o composición de la microbiota se le denomina disbiosis, la cual se ha observado tiene estrecha relación con la obesidad y otros problemas de salud. Por esta razón en el presente trabajo se analizó mediante el uso de herramientas computacionales las características fisicoquímicas y estructurales de la proteína Lactocina A de *Lactococcus lactis* subs. *cremoris* como posible agente antimicrobiano. Los datos arrojados en los diferentes programas predicen que la proteína presenta propiedades fisicoquímicas, que le confieren una posible función antimicrobiana. Así mismo, los resultados observados en el antibiograma demuestran su efecto inhibitorio en el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. microorganismo de importancia clínica. Estudios futuros podrán evaluar su incorporación como aditivo en alimentos o su empaque para venta como fármaco sustituto con acción antimicrobiana. La producción de bacteriocinas de manera recombinante es crucial

para el desarrollo de futuras terapias antimicrobianas que permitan disminuir la resistencia a los antibióticos” (30).

G) AUTOR: “Nikolett Palkovicsné Pézsa, Dóra Kovács, Bence Rácz, Orsolya Farkas” (31).

TITULO: “Efectos de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis* en la función de barrera intestinal, respuesta proinflamatoria, producción de ROS y propiedades de inhibición de patógenos en el cocultivo IPEC-J2- *Escherichia coli* / *Salmonella typhimurium*” (31).

RESUMEN: “La aparición de resistencia a los antimicrobianos plantea serias preocupaciones en todo el mundo. Los probióticos ofrecen una alternativa prometedora para mejorar la promoción del crecimiento en animales de granja; Sin embargo, su modo de acción aún necesita ser dilucidado. La línea celular IPEC-J2 (células epiteliales intestinales porcinas) es una herramienta adecuada para estudiar el efecto de los probióticos sobre las células epiteliales intestinales. En nuestros experimentos, las células IPEC-J2 fueron desafiadas por dos agentes causantes de infecciones gastrointestinales (GI), *Escherichia coli* (*E. coli*) o *Salmonella enterica* ser. Typhimurium (*S. Typhimurium*). Nos centramos en determinar el efecto de pre, co y post-tratamiento con dos candidatos probióticos, *Bacillus licheniformis* o *Bacillus subtilis*, sobre la función de barrera, la respuesta de citoquinas proinflamatorias (IL-6 e IL-8) y la producción de especies reactivas intracelulares de oxígeno (ROS) de las células IPEC-J2, además del efecto de inhibición de la adhesión. *Bacillus licheniformis* (*B. licheniformis*) y *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) demostraron ser antiinflamatorios y tuvieron un efecto antioxidante bajo ciertas combinaciones de tratamiento, e inhibieron eficazmente la adhesión de bacterias patógenas. Curiosamente, tuvieron poco efecto sobre la permeabilidad paracelular. Según nuestros resultados, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis* son candidatos prometedores para contribuir a los efectos beneficiosos de las mezclas probióticos multiespecies” (31).

5. HIPÓTESIS

Ho: La aplicación de consorcios bacterianos probióticos a ratones no favorecerá a la superación de la infección por *Salmonella typhimurium* ni disminuirá el daño de la mucosa intestinal.

Ha: La aplicación de consorcios bacterianos probióticos a ratones favorecerá a la superación de la infección por *Salmonella typhimurium* y disminuirá el daño de la mucosa intestinal.





CAPITULO II: PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

1. TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACIÓN

1.1. Técnica:

Para este trabajo, primeramente, se realizó la reactivación de cepas bacterianas ATCC *Lactococcus lactis*, *Bacillus licheniformis* y *Salmonella typhimurium* mediante inoculación en caldo nutritivo a 37°C por 24 horas y posteriormente se sembró en los medios de cultivo específicos: Agar Sangre y Agar Mac Conkey a 37°C durante 24 horas más.

Se dividió a la muestra de estudio en 4 grupos de acuerdo con la administración de tratamientos. Cada grupo tendrá 9 individuos (n=9). Estos serán: Grupo 1: Inoculación oral de *L. lactis*; Grupo 2: Inoculación oral de *B. licheniformis*, Grupo 3: Inoculación oral de *L. lactis* y *B. licheniformis*; Grupo 4: control negativo: Aplicación oral de suero fisiológico.

Se realizó la recolección no invasiva de heces de los sujetos de estudio, las que se diluyeron a 10^5 en suero fisiológico, luego se siembra y cultiva en Agar Cuenta Colonias para el posterior conteo de UFC (unidades formadoras de colonias) a las 48 horas de bacterias mesófilas.

Luego de esto, se realizó la inoculación de bacterias probióticas durante 6 días a la densidad bacteriana de 9×10^8 UFC/mL vía oral determinado por la absorbancia en un espectrofotómetro a 580 nm. Al cuarto día de la administración de probióticos, se volvió a hacer la colecta de heces para su conteo de UFC con el mismo procedimiento y luego le aplicó el inóculo del microorganismo infectante *Salmonella typhimurium* vía oral en *Mus musculus* a la concentración de 9×10^8 UFC/mL.

Al sexto día se volvió a recolectar otra muestra de heces de los sujetos en estudio para el conteo de UFC de bacterias mesófilas con el mismo procedimiento inicial.

Al séptimo día, se realizó la última recolección de muestra de heces para el conteo de UFC y se comprobó el crecimiento de *S. typhimurium* en heces haciendo la siembra de cada grupo en agar S-S; y se procedió a el sacrificio de los ratones, de los que se recolectó muestras de intestino para su posterior procesamiento

anatomopatológico, donde se analizó microscópicamente los cambios de la mucosa intestinal y se determinó el grado de respuesta inflamatoria mediante el “Índice de actividad histológica (IAH) desarrollado por Gupta y cols” (35).

1.2. Manejo de los animales de experimentación:

Se emplearon 36 *Mus musculus* machos de un peso promedio entre 30 a 40gr que fueron obtenidos del Bioterio de la Universidad Católica de Santa María (UCSM). El desarrollo experimental fue realizado en el bioterio de la UCSM durante los meses de Febrero – Marzo del año 2023. En tal lugar se mantuvieron a las condiciones de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclos de luz- oscuridad (12 horas- 12 horas), con dieta balanceada y agua *ad libitum*.

1.3. Instrumentos:

- Ficha de recolección de datos 1 y 2 (ANEXO 1 Y 2)
- índice de actividad histológica según Gupta y Cols (ANEXO 3)
- Matriz de datos

1.4. Materiales:

- 40 *Mus musculus* Balb/c
- Cepas bacterianas: ATCC: *Lactococcus lactis*, *Bacillus licheniformis* y *Salmonella typhimurium*
- Placas Petri
- Caldo nutritivo
- Agar Mc Conckey
- Agar Sangre
- Agar Cuenta Colonias
- Asa microbiológica
- Asa de Digarsky
- Jeringas de 1cc
- Jeringas de 5cc
- Tubos de ensayo
- Suero fisiológico

- Micropipetas
- Tubos Vacutainer
- Tubos ependorff
- Microscopio óptico
- Autoclave
- Estufa incubadora
- Balanza analítica
- Espectrofotómetro
- Formol 10%
- Kit de disección
- Matraz Erlenmeyer
- Láminas portaobjeto
- Mechero de alcohol
- Papel kraft
- Implementos de bioseguridad
- Impresora/ fotocopidora
- Útiles de escritorio
- Laptop con programas de Microsoft Office (Word, Excel, Power Point) y programa estadístico SPSS.

2. CAMPO DE VERIFICACIÓN

2.1. Ubicación espacial:

El estudio se realizó en los laboratorios y bioterio de la Universidad Católica de Santa María- Arequipa.

2.2. Ubicación temporal:

El estudio se realizó entre Enero- Marzo del año 2023

2.3. Unidades de estudio:

- Universo: *Mus musculus* BALB/c
 - Criterios de inclusión:
 - Ratones de 4 semanas machos BALB/c

- Ratones de la misma camada
- Ratones con un gramaje similar
- Criterios de exclusión
 - Ratones macho con patologías identificadas
- Tamaño de muestra: 36 ratones
- Procedimiento de Muestreo: Muestreo por conveniencia

3. ESTRATEGIA DE RECOLECCIÓN DE DATOS:

3.1. Organización:

Con el apoyo de la oficina de gestión de la investigación y mediante solicitudes de uso de laboratorios de investigación y bioterio se procedió a realizar la ejecución de los procedimientos experimentales en los ambientes mencionados de la Universidad Católica de Santa María. La recolección de datos se realizó en las Fichas de Recolección de Datos (ANEXO 1 y 2).

3.2. Recursos:

- Humanos:
 - Investigadora
 - Asesor
- Materiales:
 - Fichas de recolección de datos
 - Impresora/ fotocopidora
 - Útiles de escritorio
 - Laptop con programas de Microsoft Office (Word, Excel, Power Point) y programa estadístico SPSS.
- Financieros:
 - Financiamiento del concurso de proyectos de investigación 2021-II

3.3. Validación del instrumento:

No requiere validación del instrumento

3.4.Ética de la experimentación con animales:

En el presente estudio de investigación “según el protocolo de manejo de animales, se respetará las normas de la ética y manipulación de animales siguiendo los 5 principios de Marshall Hall” (36).:

- a. “La experimentación no debe realizarse si la observación puede sustituirla”(36).
- b. “Ningún experimento debe ser realizado sin un objetivo claro”(36).
- c. “Los científicos deben estar bien informados acerca de los experimentos de sus colegas, para evitar repeticiones innecesarias”(36).
- d. “Los experimentos justificados deben llevarse a cabo con el menor dolor posible”(36).
- e. “Cada experimento debe realizarse bajo circunstancias que den lugar a los resultados más claros y eviten la repetición de los mismos”(36).

3.5.Criterios o estrategias para el manejo de resultados:

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente con la prueba de ANOVA, la prueba de Tukey y la prueba de Dunnett mediante el programa estadístico SPSS y Excel. Los resultados se interpretaron como significativos si el valor de p era inferior a 0,05.



CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

3.1.RESULTADOS:

3.1.1. Estudio anatomopatológico de la biopsia intestinal de ratones:

Eficacia de consorcios bacterianos con potencial probiótico frente a la infección por *Salmonella typhimurium* en *Mus Musculus* (ratones)

Tabla 1

Porcentaje de grado de actividad inflamatoria por grupo de tratamiento de ratones inducido por infección con *Salmonella typhimurium*

Grupos	Grado de inflamación	N° de <i>Mus musculus</i>	Porcentaje
Grupo 1	0: Inactividad	0	0%
	1: Actividad leve	2	22.23%
	2: Actividad moderada	6	66.67%
	3: Actividad acentuada	1	11.12%
Grupo 2	0: Inactividad	0	0%
	1: Actividad leve	4	44.45%
	2: Actividad moderada	4	44.45%
	3: Actividad acentuada	1	11.12%
Grupo 3	0: Inactividad	2	22.23%
	1: Actividad leve	7	77.78%
	2: Actividad moderada	0	0%
	3: Actividad acentuada	0	0%
Grupo 4	0: Inactividad	0	0%
	1: Actividad leve	0	0%
	2: Actividad moderada	4	44.45%
	3: Actividad acentuada	5	55.56%
Total		36	100.00%

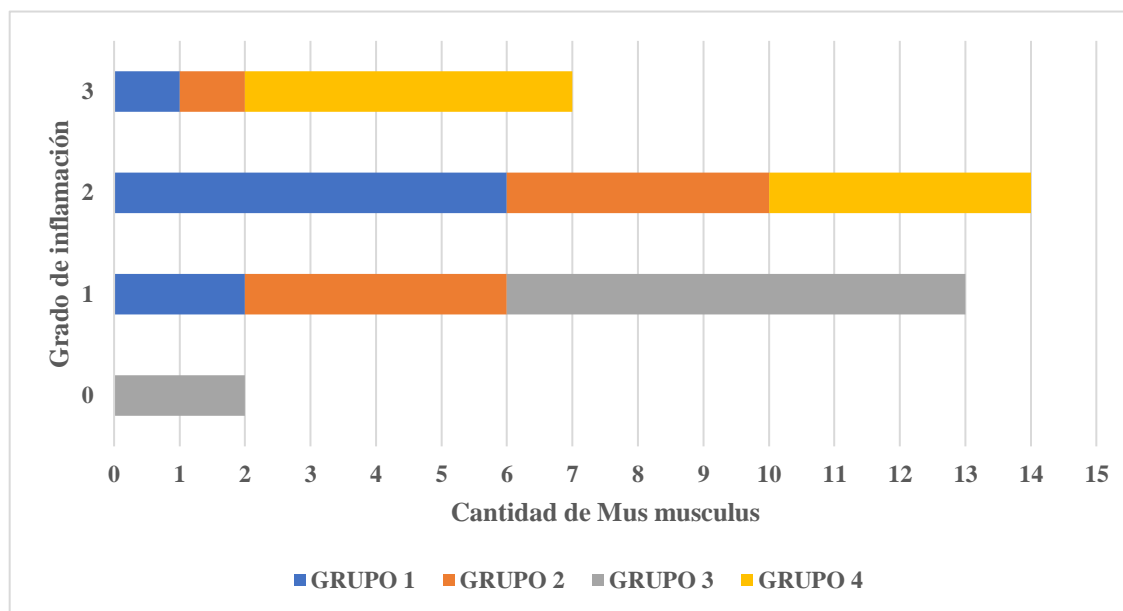
Fuente: Elaboración propia

En el estudio experimental se tuvo una población total de 36 ratones, los cuales se dividieron en 4 grupos, de acuerdo con el tratamiento administrado. En la tabla 1 se puede evidenciar el grado de actividad inflamatoria evidenciado en el estudio anatomopatológico. En el grupo 1 (tratados con *Lactococcus lactis* e infectados con *Salmonella typhimurium*) predominó el grado 2 de inflamación (actividad moderada) con 66.67%. En el grupo 2 (tratados con *Bacillus licheniformis* e infectados con *Salmonella typhimurium*) la inflamación osciló entre el grado 1 (actividad leve) y 2 (actividad moderada) obteniéndose un 44.45% para cada uno. El grupo 3 (tratados con *Lactococcus lactis* y *Bacillus licheniformis* e infectados con *Salmonella typhimurium*) presentó predominantemente un grado 1 (actividad inflamatoria leve) con un 77.78%. El grupo 4 (tratados con suero fisiológico como control negativo e infectados con *Salmonella typhimurium*) tuvo mayor cantidad de sujetos con grado 3 (actividad inflamatoria acentuada) con un 55.56%, seguidos de un 44,45% para el grado 2 (actividad inflamatoria moderada).

Eficacia de consorcios bacterianos con potencial probiótico frente a la infección por *Salmonella typhimurium* en mus *Musculus* (ratones)

Gráfico 1

Cantidad de sujetos de estudio según el grado de inflamación ratones inducido por infección con *Salmonella typhimurium*



Fuente: Elaboración propia

En el gráfico 1 se puede evidenciar el grado de inflamación del intestino delgado posterior a la administración de bacterias probióticas e inoculación del microorganismo infectante *S. typhimurium* según el estudio anatomopatológico. El grupo 1 (n=9) presentó 0 sujetos sin actividad inflamatoria, 2 sujetos con actividad inflamatoria leve, 6 sujetos con actividad inflamatoria moderada y 1 sujeto con actividad inflamatoria acentuada. El grupo 2 (n=9) presentó 0 sujetos sin actividad inflamatoria, 4 sujetos con actividad inflamatoria leve, 4 sujetos con actividad inflamatoria moderada y 1 sujeto con actividad inflamatoria acentuada. El grupo 3 (n=9) presentó 2 sujetos sin actividad inflamatoria, 7 sujetos con actividad inflamatoria leve, 0 sujetos con actividad inflamatoria moderada y 0 sujeto con actividad inflamatoria acentuada. El grupo 4 (n=9) presentó 0 sujetos sin actividad inflamatoria, 0 sujetos con actividad inflamatoria leve, 4 sujetos con actividad inflamatoria moderada y 5 sujeto con actividad inflamatoria acentuada.

Eficacia de consorcios bacterianos con potencial probiótico frente a la infección por *Salmonella typhimurium* en *mus Musculus* (ratones)

Tabla 2

Prueba de ANOVA para comparar las medias del grado de actividad inflamatoria de la mucosa intestinal entre los grupos de tratamiento

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	14,556	3	4,852	14,556	0,000
Dentro de grupos	10,667	32	0,333		
Total	25,222	35			

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 2 con la prueba de ANOVA se determina que al ser el valor P (0.000) < a 0.05 (nivel de significancia), podemos determinar que, en al menos un grupo de tratamiento, la media del grado de actividad inflamatoria de la mucosa intestinal del estudio anatomopatológico es distinta, con un 95% de confiabilidad.

Eficacia de consorcios bacterianos con potencial probiótico frente a la infección por *Salmonella typhimurium* en *mus Musculus* (ratones)

Tabla 3

Prueba de Tukey para determinar la diferencia del Grado de actividad inflamatoria intestinal entre los grupos de estudio

	Grupos de tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	3
HSD Tukey^a	Grupo 3	9	0,78		
	Grupo 2	9		1,67	
	Grupo 1	9		1,89	1,89
	Grupo 4	9			2,56
	Sig.		1,000	0,846	,088

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 9,000.

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 3, según la prueba de diferenciación de medias de Tukey, podemos afirmar con un nivel de significancia de 0.05, que el grado de actividad inflamatoria de la mucosa intestinal del grupo 3 de tratamiento es menor (0.78) que de los grupos 1, 2 y 4 (1.89, 1.67, 2.56, respectivamente). Adicionalmente, se puede evidenciar que el grupo 2 tuvo un menor grado de actividad inflamatoria de la mucosa intestinal (1.67) con respecto al grupo 4 (2.56), que es el grupo que solo recibió suero fisiológico; sin embargo, el grupo 1(1.89) no presentó diferencia estadística significativa con respecto al grupo 4 (2.56).

Eficacia de consorcios bacterianos con potencial probiótico frente a la infección por *Salmonella typhimurium* en *mus Musculus* (ratones)

Tabla 4

Comparación de la actividad inflamatoria de la mucosa intestinal entre los grupos de tratamiento y el grupo control

Variable dependiente: Grado de inflamación mucosa intestinal

	(I) Grupos de tratamiento	(J) Grupo control	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
T de Dunnett (bilateral) b	Grupo 1	Grupo 4	-0,667	0,272	0,052	-1,34	0,00
	Grupo 2	Grupo 4	-0,889*	0,272	0,007	-1,56	- 0,22
	Grupo 3	Grupo 4	-1,778*	0,272	0,000	-2,45	-1,11

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Fuente: Elaboración propia

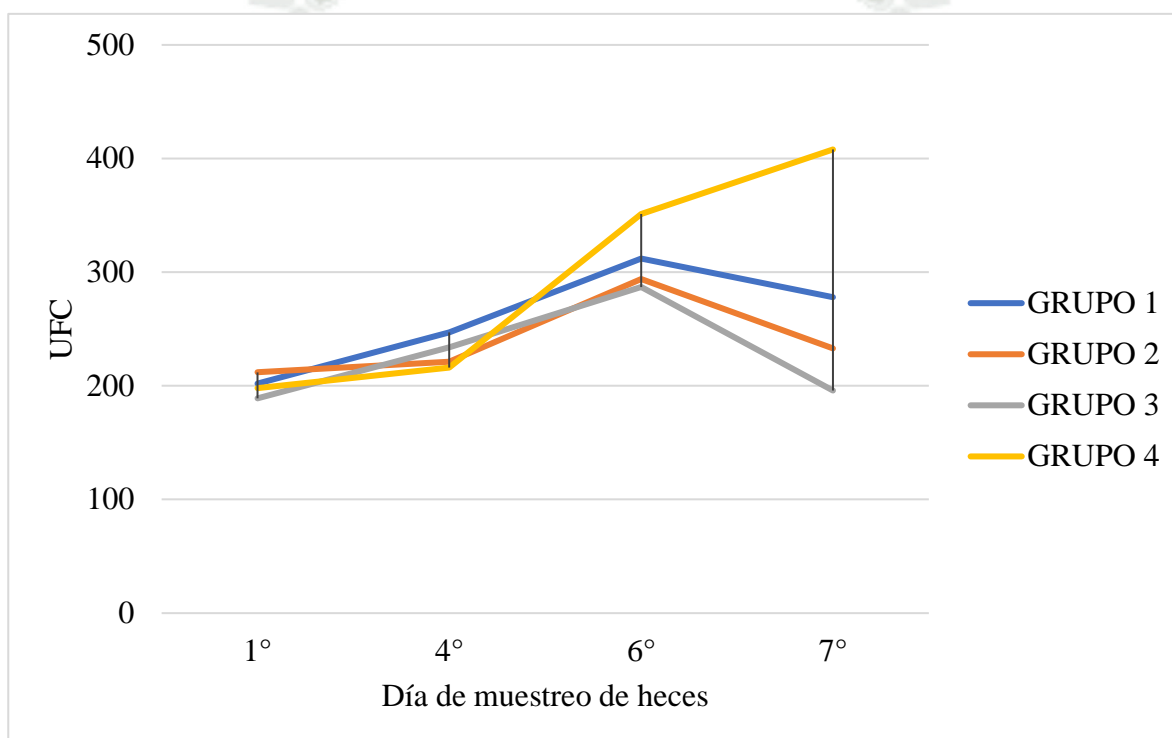
En la **tabla 4** se puede evidenciar según la prueba de T de Dunnett que el tratamiento del grupo 1 no tuvo una diferencia significativa (0.052) con el grupo control. Sin embargo, el grupo 2 y el grupo 3 tuvo una significancia <0.05 (0.007 y 0.000 respectivamente).

3.1.2. Valoración del conteo de UFC bacterianas en muestra de heces de ratones

Eficacia de consorcios bacterianos con potencial probiótico frente a la infección por *Salmonella typhimurium* en *mus Musculus* (ratones)

Gráfico 2

Conteo de UFCx10⁵ en muestra de heces de ratones tratados con bacterias probióticas e infectados con *Salmonella typhimurium*



Fuente: Elaboración propia

En el grafico 1 se evidencia la evolución del conteo de UFC en heces de bacterias mesófilas a lo largo de los días de acuerdo con el grupo de tratamiento. Los cuatro grupos presentaron un conteo de UFCx10⁵ similar previo al inicio del tratamiento con probióticos, oscilando sus valores entre 200-280 UFCx10⁵. Posterior al inicio del tratamiento, se puede evidenciar que los grupo 1, 2 y 3 aumentan levemente su número de UFC, teniendo su mayor número de colonias a los 2 días posterior a la inoculación del microorganismo infectante *S. typhimurium* y, luego de 3 días de infección, se ve como hay una disminución progresiva del número de UFC, siendo la más

resaltante la del grupo 3 (tratamiento con *Lactococcus lactis* y *Bacillus licheniformis*) con 196 UFCx10⁵. A diferencia del grupo 4 (control con suero fisiológico) que presenta un aumento continuo del número de UFC posterior a la inoculación de *S. typhimurium*, contándose el último día 408 UFCx10⁵.



Eficacia de consorcios bacterianos con potencial probiótico frente a la infección por *Salmonella typhimurium* en *mus Musculus* (ratones)

Tabla 5:

Prueba de ANOVA para la variación del número de UFC en heces posterior a 3 días de tratamiento de ratones con bacterias probióticas y previo a la infección por *S. typhimurium*

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	702485,556	3	234161,852	217,698	0,000
Dentro de grupos	34420,000	32	1075,625		
Total	736905,556	35			

Fuente: Elaboración propia

En la **tabla 5** según la prueba de ANOVA podemos determinar con un nivel de significancia del 0.05 que al menos uno de los grupos de tratamiento tuvo una variación en el conteo de UFCx10⁵ de heces desde el día 0 hasta el 3° día de uso de probióticos.

Eficacia de consorcios bacterianos con potencial probiótico frente a la infección por *Salmonella typhimurium* en *mus Musculus* (ratones)

Tabla 6:

Prueba de Tukey para determinar la variación del N° de UFC de heces de ratones antes del tratamiento con probióticos hasta el 3er día de tratamiento y previo a la infección por *S. typhimurium*

Grupos de tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	
HSD Tukey ^a	Grupo 4	9	17,11	
	Grupo 2	9	28,56	
	Grupo 1	9	42,00	
	Grupo 3	9	72,78	
	Sig.		,064	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 9,000.

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 6 con la prueba de Tukey, se obtuvo como resultado que no hubo una diferencia significativa entre el grupo 1, 2 y 4 de tratamiento (aumento de 42.0, 28.56, 17.11 UFCx10⁵ respectivamente). En cambio, el grupo 3 tuvo un mayor incremento en el número de UFC al 3° día de tratamiento con probióticos (*L. lactis* y *B. licheniformis* en consorcio) con respecto al día 0 (diferencia de 72.78 UFCX10⁵).

Eficacia de consorcios bacterianos con potencial probiótico frente a la infección por *Salmonella typhimurium* en *mus Musculus* (ratones)

Tabla 7
Prueba de Dunnett para la variación del N° de UFC en heces de ratones antes del tratamiento con probióticos hasta el 3er día de tratamiento y previo a la infección por *S. typhimurium*

Variable dependiente: N° de UFCx10⁵.

	(I) Grupos de tratamientos	(J) Grupo control	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
T de Dunnett (bilateral)^b	Grupo 1	Grupo 4	24,889*	9,593	0,037	1,24	48,54
	Grupo 2	Grupo 4	11,444	9,593	0,500	-12,21	35,10
	Grupo 3	Grupo 4	55,667*	9,593	0,000	32,02	79,32

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 7 según la prueba de Dunnett el grupo 1 y 3 tuvieron una diferencia significativa <0.05 en relación con la variación del número de UFCx10⁵ desde el día 0 previo al tratamiento hasta el 3er día de tratamiento con probióticos bacterianos; resaltando significativamente el grupo 3 que tuvo una significancia del 0.000. El grupo 2 no tuvo una diferencia significativa con respecto al grupo control (significancia de 0.5).

Eficacia de consorcios bacterianos con potencial probiótico frente a la infección por *Salmonella typhimurium* en *mus Musculus* (ratones)

Tabla 8

Prueba de Tukey para determinar la variación del N° de UFC de *S. typhimurium* de heces de ratones desde el 3° día de tratamiento con probióticos hasta el 2° día después de la inoculación oral con *S. typhimurium*

	Grupos de tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
HSD Tukey^a	Grupo 4	9	135,8889	
	Grupo 2	9		70,5556
	Grupo 1	9		67,4444
	Grupo 3	9		17,6667
	Sig.		1,000	,080

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 9,000.

Fuente: Elaboración propia

La tabla 8 de la Prueba de Tukey muestra que posterior al 2° día de inoculación con *S. typhimurium* hubo una diferencia significativa en el número de UFC de *S. typhimurium* en el grupo 4 (135.89 UFCx10⁵) con respecto a los grupos 1, 2 y 3 (67.45, 70.56, 17.67 UFCx10⁵, respectivamente). Si bien el grupo 3 tuvo un menor aumento en el número de UFC de *S. typhimurium* en las heces, no hubo una diferencia significativa entre este y el grupo 1 y 2.

**Eficacia de consorcios bacterianos con potencial probiótico frente a la infección por
Salmonella typhimurium en *mus Musculus* (ratones)**

Tabla 9

Prueba de Dunnett para la variación del N° de UFC de *S. typhimurium* en heces de ratones desde el 3° día de tratamiento con probióticos hasta el 2° día después de inoculación de la *S. typhimurium*

Variable dependiente: Variación del N° de UFC

	(I) Grupos de tratamientos	(J) Grupos control	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
T de Dunnett (bilateral)^b	Grupo 1	Grupo 4	68,44444*	21,18328	0,008	16,2153	120,6736
	Grupo 2	Grupo 4	65,33333*	21,18328	0,011	13,1042	117,5625
	Grupo 3	Grupo 4	118,22222*	21,18328	0,000	65,9931	170,4514

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Fuente: Elaboración propia

La tabla 9 con la prueba de Dunnett puede evidenciar que hubo una diferencia significativa <0.05 en los grupos 1, 2 y 3 de tratamiento con probióticos bacterianos (significancia de 0.008, 0.011 y 0.000, respectivamente) con respecto al grupo control en el conteo del número de UFCx10⁵ de *S. typhimurium* posterior al 2° día de inoculación de *S. typhimurium* y con 4 días de tratamiento.

Eficacia de consorcios bacterianos con potencial probiótico frente a la infección por *Salmonella typhimurium* en *mus Musculus* (ratones)

Tabla 10

Prueba de Tukey para determinar la variación del N° de UFC de *S. typhimurium* desde el 3° día de tratamiento con probióticos hasta el 3° día después de la inoculación de *S. typhimurium*

	Grupos de tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	3
HSD Tukey^a	Grupo 4	9	192,6667		
	Grupo 1	9		33,3333	
	Grupo 2	9		10,2222	
	Grupo 3	9			-66,8889
	Sig.			1,000	,720

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 9,000.

Fuente: Elaboración propia

La tabla 10 muestra con los resultados de la prueba de Tukey, que hubo diferencia estadística significativa en el conteo del número de UFCx10⁵ de *S. typhimurium* en el grupo 3 (tratamiento con *L. lactis* y *B. licheniformis*) con respecto a los demás grupos, teniendo una disminución al 3° día de la inoculación del microorganismo infectante y con 6 días de tratamiento probiótico, con respecto al día previo de la inoculación de dicho microorganismo y 3 días de tratamiento. Adicionalmente se puede evidenciar que también hubo una diferencia significativa del grupo 1 y 2 de tratamiento con respecto al grupo 4 control; sin embargo, la diferencia del grupo 3 supera a los otros grupos de tratamiento.

Eficacia de consorcios bacterianos con potencial probiótico frente a la infección por *Salmonella typhimurium* en *mus Musculus* (ratones)

Tabla 11

Prueba de Dunnett para la variación del N° de UFC de *S. typhimurium* desde el 3° día de tratamiento con probióticos hasta el 3° día después de inoculación de *S. typhimurium*

Variable dependiente: Variación del N° de UFC

	(I) Grupos de tratamientos	(J) Grupos de tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
T de Dunnett (bilateral)^b	Grupo 1	Grupo 4	159,33333*	21,94286	0,000	105,2314	213,4353
	Grupo 2	Grupo 4	182,44444*	21,94286	0,000	128,3425	236,5464
	Grupo 3	Grupo 4	259,55556*	21,94286	0,000	205,4536	313,6575

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 11 con la prueba de Dunnett se puede evidenciar que los grupos 1, 2 y 3 de tratamiento tuvieron una diferencia significativa (0.000 cada una) con respecto al grupo 4 control en el conteo del número de UFCx10⁵ de *S. typhimurium* desde el 3° día de tratamiento con probióticos, previa inoculación del microorganismo infectante hasta el 3° día de inoculación de *S. typhimurium* y 6° día de tratamiento con probióticos bacterianos, con un nivel de significancia de 0.05.

3.2.COMENTARIOS Y DISCUSIÓN:

En el presente estudio se realizó una infección experimental en *Mus musculus* con *Salmonella typhimurium* para determinar la eficacia de la administración de consorcios bacterianos con potencial probiótico, en este caso de *Lactococcus lactis* y *Bacillus licheniformis* de forma independiente y en consorcio, mediante la evaluación de la variación del conteo UFC de bacterias mesófilas en heces de ratones durante el tratamiento probiótico y posterior inoculación del microorganismo infectante; y, el análisis de la actividad inflamatoria de la mucosa intestinal mediante el estudio anatomopatológico al final del tratamiento y frente a la infección por *S. typhimurium*.

El estudio experimental tuvo una población total de 36 ratones, los cuales se dividieron en 4 grupos de acuerdo al tratamiento administrado. Estos fueron: Grupo 1: Inoculación de *L. lactis* e infección con *S. typhimurium*; Grupo 2: Inoculación de *B. licheniformis* e infección con *S. typhimurium*, Grupo 3: Inoculación de *L. lactis* y *B. licheniformis* e infección con *S. typhimurium*; Grupo 4: control negativo: Aplicación oral de suero fisiológico e infección con *S. typhimurium*.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la **tabla 1** y en el **gráfico 1** se puede afirmar que el grado de actividad inflamatoria moderada fue la predominante, teniendo 14 sujetos de estudio, los cuales pertenecían al grupo 1, 2 y 4. Adicionalmente, vemos que el grado de actividad inflamatoria leve tuvo 13 sujetos de estudio de los cuales en su mayoría pertenecieron al grupo 3.

La **tabla 2** nos confirma que en al menos uno de los grupos de estudio tuvo una diferencia significativa (<0.05) del promedio de grado de actividad inflamatoria de la mucosa de intestino delgado en el estudio anatomopatológico; corroborado por la **tabla 3 y 4** que nos permite decir que el grado de actividad inflamatoria de la mucosa intestinal del grupo 3 (*L. lactis* y *B. licheniformis* en consorcio) es menor que los grupos 1, 2 y 4; es decir que, dicho grupo de tratamiento fue más efectivo que los demás grupos de estudio. Además de esto, se ve que el grupo 2 tuvo un menor grado de actividad inflamatoria de la mucosa intestinal con respecto al grupo 4, sin embargo, no se asemeja a la respuesta que obtuvo el grupo 3 en cuanto al grado de actividad inflamatoria de la mucosa intestinal. El grupo 1 por sí solo, no representa una mejoría en la respuesta inflamatoria frente a la infección por *S. typhimurium* en comparación con los

sujetos a los que no se le administró ningún tratamiento (grupo 4). Por lo que, estos resultados nos permiten inferir que *L. lactis* y *B. licheniformis* aplicadas en consorcio protegen del daño de *Salmonella typhimurium* a la mucosa del intestino delgado de ratones infectados produciendo un menor grado de actividad inflamatoria (77.78% de grado 1: actividad leve).

En el **gráfico 2** se puede evidenciar que posterior al inicio del tratamiento con probióticos bacterianos (grupo 1, 2 y 3) hubo un leve aumento del número de UFC de bacterias mesófilas lo que podría reflejar la presencia y multiplicación de las bacterias probióticas administradas. Asimismo, se puede evidenciar que posterior a la inoculación del microorganismo infectante, el aumento del número de UFC de *S. typhimurium* en el grupo 1, 2 y 3 es menor que en el grupo 4 (grupo control), por lo que se puede interpretar que los probióticos ayudaron a una menor propagación de *S. typhimurium* comparado con los que no recibieron tratamiento.

Según los resultados de la **tabla 5** podemos confirmar con un 95% de confiabilidad que al menos uno de los grupos de tratamiento tuvo una variación en cuanto al número de UFCx10⁵ de bacterias mesófilas desde el día 0 previo al tratamiento hasta el 3° día de tratamiento. Confirmándose con la **tabla 6** y **7** donde se evidencia que el grupo 3 (*L. lactis* y *B. licheniformis* en consorcio) tuvo un mayor aumento de UFC (Aumentó en 72.78 UFCx10⁵) pudiendo determinar que los probióticos bacterianos están haciendo efecto sobre la microbiota intestinal.

La **tabla 8** y **9** evidencian que hubo una diferencia en el número de UFCx10⁵ de *S. typhimurium* del 3° día de tratamiento al 2° día posterior a la inoculación del microorganismo infectante, teniendo al grupo 4 (control) como el que presentó mayor aumento del número de UFC de *S. typhimurium* (135.89 UFCx10⁵) con respecto a los otros grupos. Pudiendo interpretar así que la administración de tratamiento del grupo 1, 2 y 3 ayudó a que se produjera menor infección por *S. typhimurium* al 2° día posterior a la inoculación de *S. typhimurium*, reflejado en el menor número de UFC de *S. typhimurium* con respecto al grupo control (67.45, 70.56 y 17.67 UFCx10⁵, respectivamente); sin embargo, los resultados de este 2° día post inoculación no permitió determinar cuál de los tratamientos es más efectivo frente a la infección, ya que no presentan una diferencia significativa entre los tres grupos de tratamiento.

La **tabla 10** y **11** dan como resultado que al 3° día posterior a la inoculación del microorganismo infectante (*S. typhimurium*) y con 6 días de tratamiento con probióticos bacterianos hubo una diferencia significativa en el número de UFCx10⁵ de *S. typhimurium*, principalmente en el grupo 3, donde se pudo ver que su conteo fue menor al 6° día de tratamiento de las dos bacterias probióticas en consorcio y 3° día de inoculación del microorganismo infectante, con respecto al 3° día de tratamiento (-66.89 UFCx10⁵); a su vez, este conteo fue menor que el de los grupos 1, 2 y 4. Los grupos 1 y 2 tuvieron una diferencia significativa con respecto al grupo 4, ya que el grupo 1 y 2 tuvieron un menor incremento del número de UFC de *S. typhimurium* (33.32, 10.23 UFCx10⁵, respectivamente) que el grupo 4 (192.67 UFCx10⁵). Al ver estos resultados se puede determinar que al 3° día posterior a la infección de *S. typhimurium*, el tratamiento del grupo 3 (*Lactococcus lactis* y *Bacillus licheniformis* en consorcio) tuvo una mejor respuesta a la infección que los otros tratamientos (grupo 1 y 2). Además, se analizaron macroscópicamente las heces de los ratones donde se pudo objetivar que el uso de consorcios bacterianos con potencial probiótico generaba que las heces sean más blandas, y posterior a la inoculación del microorganismo infectante, no hubo cambios en la integridad de las heces comparado con los sujetos de estudio del grupo control, donde se evidenció que las heces luego de la infección, se tornaron más blandas, mucosas y con mal olor.

Vera, 2021, señala que “el uso de probióticos otorga una disminución en el tiempo de presentación de la enfermedad y de los días de hospitalización; pero también señala que pueden conferir tanto efectos beneficiosos y adversos, y que hay que tener en cuenta el cuadro clínico del paciente para su administración” (27).

Shanmugasundaram estudió “el efecto del uso de probióticos sobre la carga cecal de Salmonella, donde tuvo como resultado que el uso de *B. licheniformis* disminuyó la concentración del número de UFC en heces posterior a la infección por *Salmonella*, comprobado además con PCR en tiempo real, por lo que sugieren que el *B. licheniformis* es un probiótico que se puede aplicar para contrarrestar la infección por *Salmonella*” (37).

“*Lactococcus lactis* es una bacteria ácido láctica que puede producir Lactococcina A, bacteriocina con propiedades antimicrobianas como provocar la lisis bacteriana; así mismo, forma sustancias (ácido acético y ácido láctico) que disminuyen el pH, el cual funciona también

como factor protector de bacterias patógenas” (38). Taboada “evaluó *in silico* la lactococcina A de *L. lactis* concluyendo que esta proteína presenta propiedades fisicoquímicas y estructurales que lo podrían permitir una posible función antimicrobiana e incluso demostró que podía inhibir el crecimiento de algunas bacterias patógenas” (30).

Palkovicsné estudió “los efectos del *B. licheniformis* frente a *S. typhimurium*; sugirió que esta bacteria podría contrarrestar el efecto inflamatorio de *S. typhimurium*, disminuyendo los niveles de IL-6. Además, precisó que *B. licheniformis* tenía la propiedad de inhibir significativamente la adhesión de *S. typhimurium*, sugiriendo que se podría usar *B. licheniformis* con otras especies probióticas para poder complementar sus efectos” (31).

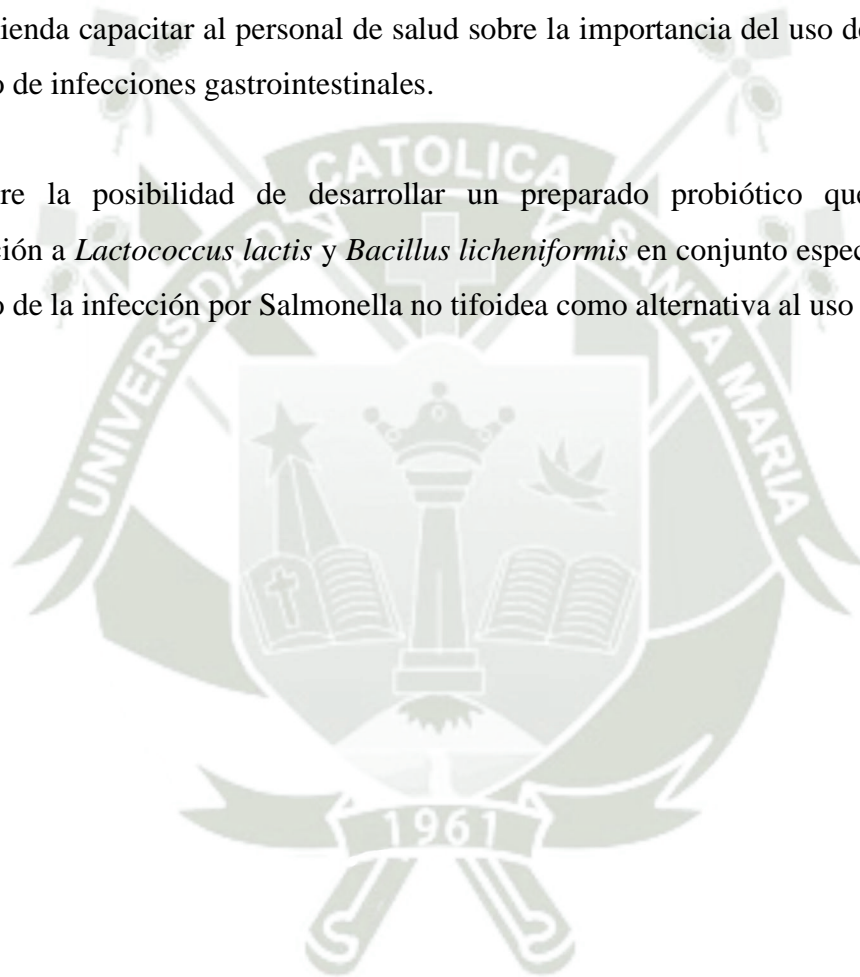
Por lo tanto, al combinar las propiedades de *L. lactis* y *B. licheniformis* en nuestro estudio se pudo demostrar que ejercieron actividades sinérgicas y disminuyeron la actividad inflamatoria de la mucosa de intestino delgado interpretando una posible infección por *S. typhimurium* más leve que si los sujetos de estudio no hubieran estado con tratamiento probiótico.

CONCLUSIONES:

- Primera.-** La aplicación oral de *Lactococcus lactis* por sí sola, no tuvo diferencia significativa (>0.05) con el grupo control en cuanto a la actividad inflamatoria de la mucosa de intestino delgado, *Bacillus licheniformis* sí produjo un menor grado de actividad inflamatoria con respecto al grupo sin tratamiento, pero no tan efectiva como las dos bacterias en consorcio que tuvo una mayor diferencia significativa (<0.05), evidenciándose en un grado de actividad inflamatoria leve en un 77.78% e inactiva en el 22.23%; a diferencia de los ratones no tratados, en quienes en un 55.56% se produjo inflamación acentuada y en un 44.45% se produjo inflamación moderada de la mucosa del intestino delgado.
- Segunda.-** Al tercer día posterior a la inoculación de *S. typhimurium* y con seis días de tratamiento con probióticos bacterianos, las dos bacterias probióticas en consorcio produjeron una disminución de 66.89×10^5 del conteo de UFC de *S. typhimurium*, mientras que *L. lactis* produjo un leve incremento de 33.33×10^5 de UFC y *B. licheniformis* de 10.22×10^5 UFC de *S. typhimurium*, y el grupo sin tratamiento un gran incremento de 192.67×10^5 UFC de *S. typhimurium*.
- Tercera.-** El uso del consorcio bacteriano *Lactococcus lactis* y *Bacillus licheniformis* tuvo una mejor respuesta frente a la infección experimental de ratones con *S. typhimurium* que los otros tratamientos, evidenciado en la mayor disminución del grado de actividad inflamatoria de la mucosa intestinal y en la disminución más significativa del número de UFC de *S. typhimurium* en heces de ratones al final del tratamiento.

RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS:

1. Se sugiere la ampliación de estudios del uso de probióticos en infección por *S. typhimurium* (no tifoidea) en humanos para determinar su eficacia, si disminuye el grado de actividad inflamatoria y si podría llegar a reemplazar al uso de antibióticos para la superación de la infección.
2. Se recomienda capacitar al personal de salud sobre la importancia del uso de probióticos en el manejo de infecciones gastrointestinales.
3. Se sugiere la posibilidad de desarrollar un preparado probiótico que tenga en su composición a *Lactococcus lactis* y *Bacillus licheniformis* en conjunto específicamente para el manejo de la infección por Salmonella no tifoidea como alternativa al uso de antibióticos.



REFERENCIAS

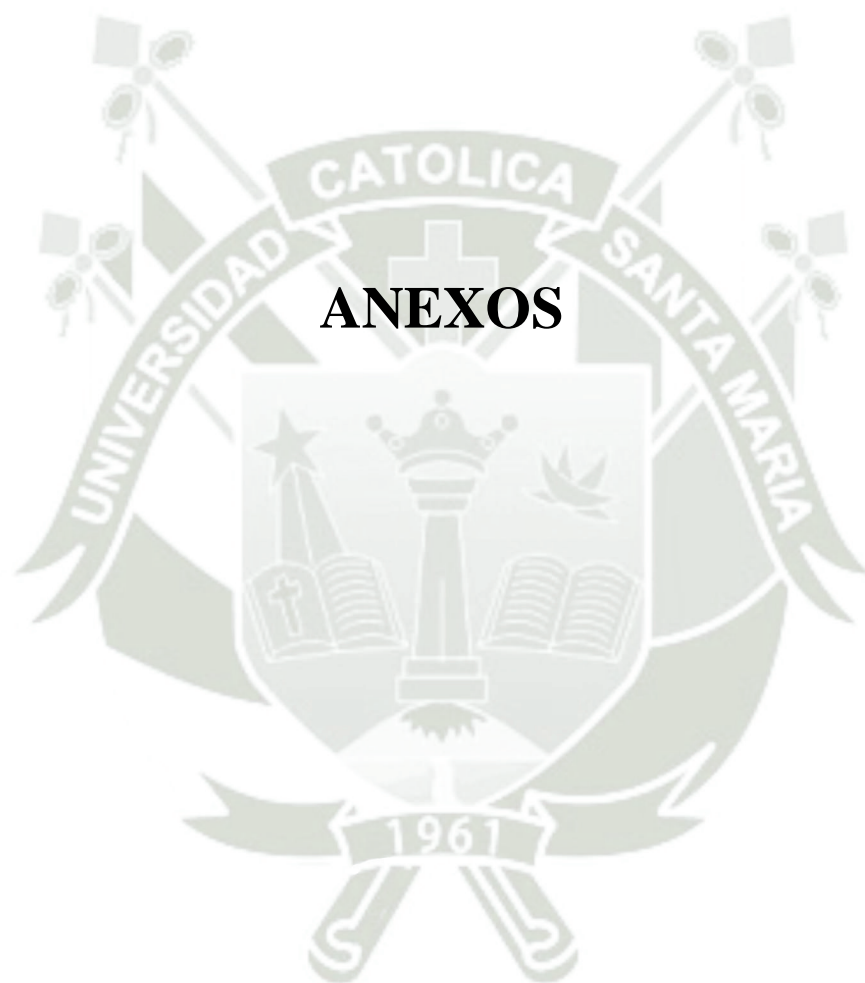
1. Sánchez CC. Enfermedades infecciosas relacionadas con el agua en el Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. junio de 2018;35:309-16.
2. Escobar Mamani F, Ferro Mayhua FP, Rocha Zapana NM, Leon Tacca AM, Escobar Mamani F, Ferro Mayhua FP, et al. Seminario Internacional “resistencia a antibióticos”: Amenaza global a la salud pública - Universidad Nacional del Altiplano, Puno Perú. *Revista de Investigaciones Altoandinas*. marzo de 2020;22(1):7-24.
3. Authority EFS, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020. *EFSA Journal*. 2022;20(3):e07209.
4. Hohmann E. Salmonella no tifoidea: infección gastrointestinal y transporte - UpToDate [Internet]. [citado 23 de noviembre de 2022]. Disponible en: https://www.uptodate.com/contents/nontyphoidal-salmonella-gastrointestinal-infection-and-carriage?search=salmonella%20typhimurium&source=search_result&selectedTitle=1~15&usage_type=default&display_rank=1#H1
5. Silva-Díaz H, Bustamante-Canelo O, Aguilar-Gamboazsu FR, Mera-Villasis K, Ipanaque-Chozo J, Seclen-Bernabe E, et al. Enteropatógenos predominantes en diarreas agudas y variables asociadas en niños atendidos en el Hospital Regional Lambayeque, Perú. *Horizonte Médico (Lima)*. enero de 2017;17(1):38-44.
6. García MM. Efecto de los antibióticos en el microbioma intestinal. *Repertorio Científico*. 8 de junio de 2016;19(1):19-25.
7. Alarcón P, González M, Castro É. Rol de la microbiota gastrointestinal en la regulación de la respuesta inmune. *Revista médica de Chile*. julio de 2016;144(7):910-6.
8. Tindall BJ, Grimont P a. D, Garrity GM, Euzéby JP. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol*. enero de 2005;55(Pt 1):521-4.
9. Gul S, Kashif M, Waheed N, Arshad M, Maqbool B, Khatoon A, et al. *Salmonella typhimurium* (A Zoonotic Threat) Prevailing in Commercial Poultry in Sylwan. 1 de julio de 2021;165:56-77.
10. MARCUS R, VARMA JK, MEDUS C, BOOTHE EJ, ANDERSON BJ, CRUME T, et al. Re-assessment of risk factors for sporadic *Salmonella* serotype Enteritidis infections: a case-control study in five FoodNet Sites, 2002–2003. *Epidemiol Infect*. enero de 2007;135(1):84-92.
11. Brooks JT, Matyas BT, Fontana J, DeGroot MA, Beuchat LR, Hoekstra M, et al. An outbreak of *Salmonella* serotype Typhimurium infections with an unusually long incubation period. *Foodborne Pathog Dis*. marzo de 2012;9(3):245-8.

12. Cardona-Castro N, Sánchez-Jiménez M. Mecanismos de interacción de Salmonella con la mucosa intestinal. *Infectio*. 1 de enero de 2003;7:22-9.
13. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiología médica*. Elsevier Health Sciences; 2017. 973 p.
14. Ledebouer NA, Frye JG, McClelland M, Jones BD. Salmonella enterica serovar Typhimurium requires the Lpf, Pef, and Tafi fimbriae for biofilm formation on HEp-2 tissue culture cells and chicken intestinal epithelium. *Infect Immun*. junio de 2006;74(6):3156-69.
15. Kohbata S, Yokoyama H, Yabuuchi E. Cytopathogenic Effect of Salmonella typhi GIFU 10007 on M cells of Murine Ileal Peyer's Patches in Ligated Ileal Loops: An Ultrastructural Study. *Microbiology and Immunology*. 1986;30(12):1225-37.
16. Hughes EA, Galán JE. Immune Response to Salmonella: Location, Location, Location? *Immunity*. 1 de marzo de 2002;16(3):325-8.
17. Pace J, Hayman MJ, Galán JE. Signal transduction and invasion of epithelial cells by S. typhimurium. *Cell*. 26 de febrero de 1993;72(4):505-14.
18. Darwin KH, Miller VL. Molecular basis of the interaction of Salmonella with the intestinal mucosa. *Clin Microbiol Rev*. julio de 1999;12(3):405-28.
19. BOLETÍN EPIDEMIOLÓGICO DEL PERÚ 2019 [Internet]. [citado 23 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2019/08.pdf>
20. Salmonella (no tifoidea) [Internet]. [citado 17 de enero de 2023]. Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
21. Dryden MS, Gabb RJ, Wright SK. Empirical treatment of severe acute community-acquired gastroenteritis with ciprofloxacin. *Clin Infect Dis*. junio de 1996;22(6):1019-25.
22. Bacterial Enteric Infections | NIH [Internet]. [citado 18 de enero de 2023]. Disponible en: <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/hiv-clinical-guidelines-adult-and-adolescent-opportunistic-infections/bacterial-enteric>
23. Antibiotics Tested by NARMS | NARMS | CDC [Internet]. 2019 [citado 18 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/narms/antibiotics-tested.html>
24. EFSA | Science, safe food, sustainability [Internet]. [citado 18 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.efsa.europa.eu/en>
25. Parra-Payano VD, Rondón-Paz CR, García C, Parra-Payano VD, Rondón-Paz CR, García C. Salmonelosis invasiva en un hospital de Lima, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. septiembre de 2019;36(3):464-8.

26. Rowan-Nash AD, Korry BJ, Mylonakis E, Belenky P. Cross-Domain and Viral Interactions in the Microbiome. *Microbiol Mol Biol Rev.* 9 de enero de 2019;83(1):e00044-18.
27. Vera Peralta CM. Efectos del uso de probióticos en diarrea infecciosa en adultos. Universidad Católica de Cuenca [Internet]. 2021 [citado 19 de enero de 2023]; Disponible en: <https://dspace.ucacue.edu.ec/handle/ucacue/11440>
28. Jacobson A, Lam L, Rajendram M, Tamburini F, Honeycutt J, Pham T, et al. A gut commensal-produced metabolite mediates colonization resistance to Salmonella infection. *Cell Host Microbe.* 8 de agosto de 2018;24(2):296-307.e7.
29. Shelton CD, Yoo W, Shealy NG, Torres TP, Zieba JK, Calcutt MW, et al. Salmonella enterica serovar Typhimurium uses anaerobic respiration to overcome propionate-mediated colonization resistance. *Cell Rep.* 4 de enero de 2022;38(1):110180.
30. Apaez T, Denisse K. Análisis in silico de la proteína lactococcina A de *Lactococcus lactis* subsp. cremoris como posible agente antimicrobiano. 5 de diciembre de 2022 [citado 19 de enero de 2023]; Disponible en: <http://riaa.uaem.mx/xmlui/handle/20.500.12055/2909>
31. Palkovicsné Pézsa N, Kovács D, Rácz B, Farkas O. Effects of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* on Gut Barrier Function, Proinflammatory Response, ROS Production and Pathogen Inhibition Properties in IPEC-J2-*Escherichia coli*/*Salmonella Typhimurium* Co-Culture. *Microorganisms.* 29 de abril de 2022;10(5):936.
32. García Apac C. Resistencia antibiótica en el Perú y América Latina. *Acta Médica Peruana.* abril de 2012;29(2):99-103.
33. Gomes-Santos A, Pires de Oliveira R, Moreira T, Castro-Junior A, Horta B, Lemos L, et al. Hsp65-Producing *Lactococcus lactis* Prevents Inflammatory Intestinal Disease in Mice by IL-10- and TLR2-Dependent Pathways. *Frontiers in Immunology.* 9 de enero de 2017;8.
34. Posada Bustos S, Vera Chamorro JF, Posada Bustos S, Vera Chamorro JF. Probióticos en diarrea aguda, asociada a antibióticos y nosocomial: evidencia en pediatría. *Revista colombiana de Gastroenterología.* marzo de 2018;33(1):41-8.
35. Gupta RB, Harpaz N, Itzkowitz S, Hossain S, Matula S, Kornbluth A, et al. Histologic Inflammation Is a Risk Factor for Progression to Colorectal Neoplasia in Ulcerative Colitis. *Gastroenterology.* octubre de 2007;133(4):1099-341.
36. Pastor LM, Aranda A. Ética de la experimentación con animales. *Revista Bioética y Ciencias de la Salud.* 2017;3(4).
37. Shanmugasundaram R, Applegate TJ, Selvaraj RK. Effect of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* probiotic supplementation on cecal *Salmonella* load in broilers challenged with salmonella. *Journal of Applied Poultry Research.* 1 de diciembre de 2020;29(4):808-16.

38. Holo H, Nilssen O, Nes IF. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J Bacteriol.* junio de 1991;173(12):3879-87.





ANEXO 1: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS 1

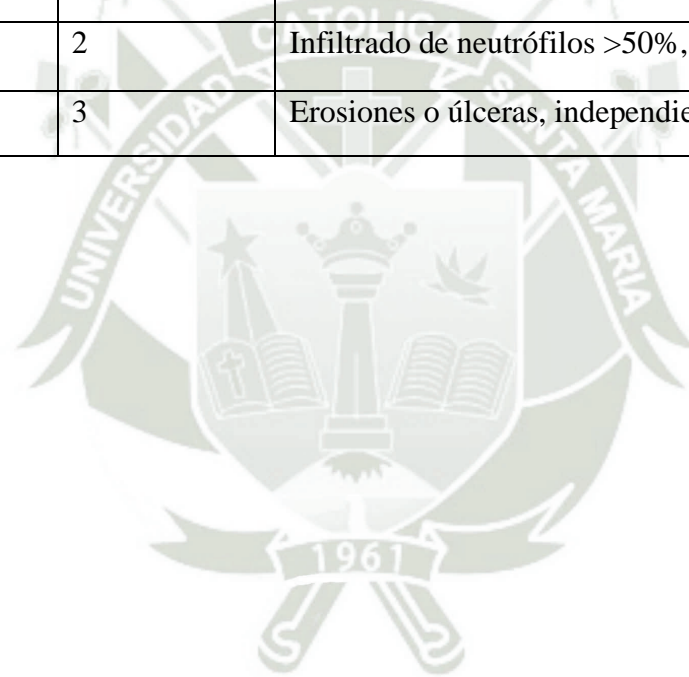
DIA	MUESTRA DE HECES	GRUPO DE ESTUDIO			
		GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4
1°	MUESTRAS DE HECES 1 UFC (10 ⁻⁵)				
4°	MUESTRAS DE HECES 2 UFC (10 ⁻⁵)				
I N O C U L A C I Ó N D E S A L M O N E L L A					
6°	MUESTRAS DE HECES 3 UFC (10 ⁻⁵)				
7°	MUESTRAS DE HECES 4 UFC (10 ⁻⁵)				

ANEXO 2: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS 2

GRUPO	# DE RATON	INFILTRADO DE NEUTRÓFILOS (+, ++, +++)	EROSIÓN (ALTERACIÓN DE ARQUITECTURA, VASOS DAÑADOS)	PRESENCIA DE ÚLCERA	GRADO DE INFLAMACION	OTROS HALLAZGOS
	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
	7					
	8					
	9					

ANEXO 3: INDICE DE ACTIVIDAD HISTOLÓGICA SEGÚN Gupta y cols, 2007

ACTIVIDAD INFLAMATORIA	PUNTAJE	CARACTERISTICA HISTOLÓGICA
Inactiva/ quiescente/ normal	0	Sin infiltrado epitelial por neutrófilos
Actividad leve	1	Infiltrado de neutrófilos <50%, sin úlcera ni erosiones
Actividad moderada	2	Infiltrado de neutrófilos >50%, sin úlcera ni erosiones
Actividad acentuada	3	Erosiones o úlceras, independiente de otras características.



ANEXO 4: COMITÉ DE ETICA

COMITÉ DE ÉTICA INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN UCSM



DICTAMEN COMITÉ DE ETICA DE INVESTIGACION UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

Arequipa, 27 de marzo de 2023

Investigadora Camila Alessandra Valdivia Vega

Presente. -

De mi especial consideración.

Me dirijo a usted para hacerle llegar el resultado de la evaluación de su proyecto de investigación y dictamen del Comité Institucional de Ética de Investigación.

TÍTULO: “Eficacia de consorcios bacterianos con potencial probiótico frente a la infección por *Salmonella typhimurium* en *Mus musculus* (ratones)”.

Investigadora a cargo de la investigación: Camila Alessandra Valdivia Vega.

TIPO Y DISEÑO: Cuantitativo, experimental, longitudinal y prospectivo.



OBJETIVO: La investigación tiene como objetivo: Evaluar la eficacia de la administración de consorcios bacterianos con potencial probiótico frente a la infección por *Salmonella typhimurium* en *Mus musculus* (ratones).

PROCEDIMIENTOS: Ficha de recolección de datos.

COMITÉ DE ÉTICA INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN UCSM



**DICTAMEN COMITÉ DE ETICA DE INVESTIGACION
UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA**

SUJETOS DE ESTUDIO:

40 ratones.

RIESGO DEL ESTUDIO:

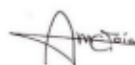
Mínimo

OBSERVACIONES, SUGERENCIAS:

Debe proteger confidencialidad de la data sensible

DICTAMEN:

DICTAMEN FAVORABLE
032 - 2023



Águeda Muñoz del Carpio Toia
Comité Institucional de Ética de la Investigación UCSM

Cualquier duda comunicarse a: comiteeticainvestigacionucsm@gmail.com

ANEXO 5: MATRIZ DE RECOLECCIÓN DE DATOS

MATRIZ DE RECOLECCIÓN DE DATOS					
DIA	MUESTRA	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4
1°	1	202	212	189	198
4°	2	247	221	234	216
6°	3	312	294	287	351
7°	4	278	233	196	408

ANATOMOPATOLÓGICO		
GRUPO	# DE RATON	GRADO DE INFLAMACION
1	1	2
1	2	3
1	3	2
1	4	2
1	5	2
1	6	2
1	7	1
1	8	1
1	9	2

ANATOMOPATOLÓGICO		
GRUPO	# DE RATON	GRADO DE INFLAMACIO
2	1	3
2	2	2
2	3	2
2	4	2
2	5	1
2	6	1
2	7	1
2	8	1
2	9	2

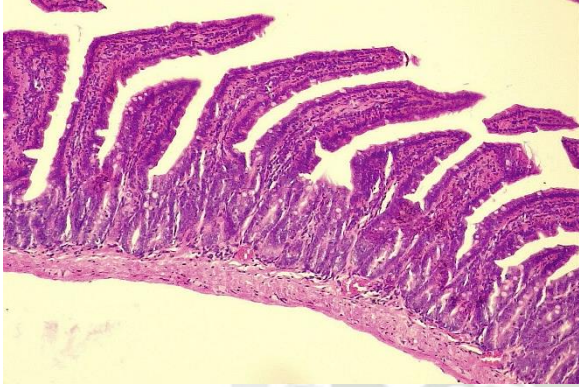
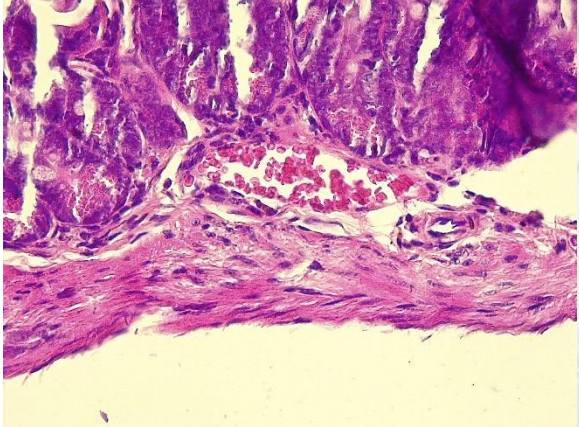
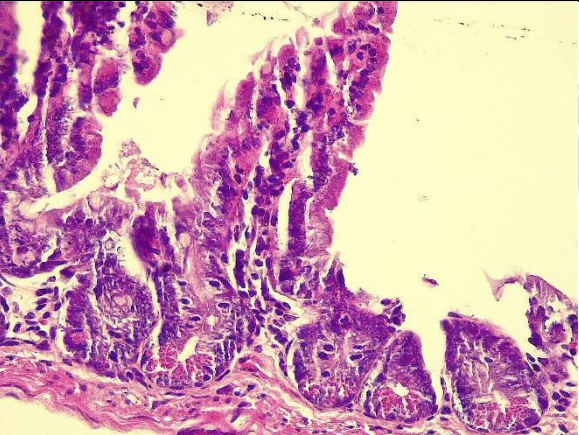
ANATOMOPATOLÓGICO		
GRUPO	# DE RATON	GRADO DE INFLAMACI
3	1	0
3	2	0
3	3	1
3	4	1
3	5	1
3	6	1
3	7	1
3	8	1
3	9	1

ANATOMOPATOLÓGICO		
GRUPO	# DE RATON	GRADO DE INFLAMACI
4	1	3
4	2	2
4	3	3
4	4	3
4	5	2
4	6	3
4	7	2
4	8	2
4	9	3

GRUPO	# DE	Infiltrado de	Erosión	Úlcera	GRADO DE	Otros
1	1	XX	-	-	2	cocos ++
1	2	XX	X	-	3	
1	3	XX	-	-	2	cocos +
1	4	XX	-	-	2	cocos +
1	5	XX	-	-	2	
1	6	XX	-	-	2	
1	7	X	-	-	1	
1	8	X	-	-	1	
1	9	XX	-	-	2	
2	1	X	X		3	
2	2	X	-	-	2	
2	3	XXX	-	-	2	
2	4	XXX	-	-	2	
2	5	X	-	-	1	
2	6	X	-	-	1	
2	7	XX	-	-	1	
2	8	X	-	-	1	
2	9	XX	-	-	2	
3	1	-	-	-	0	
3	2	-	-	-	0	
3	3	X	-	-	1	eosinófilos +
3	4	X	-	-	1	
3	5	X	-	-	1	
3	6	X	-	-	1	
3	7	X	-	-	1	
3	8	X	-	-	1	
3	9	X	-	-	1	
4	1	XXX	XX	-	3	
4	2	XXX	-	-	2	
4	3	XX	X	-	3	
4	4	XXX	X		3	
4	5	XX	-	-	2	
4	6	XXX	X	-	3	
4	7	XXX	-	-	2	
4	8	XX	-	-	2	
4	9	XXX	X	-	3	

ANEXO 6: EVIDENCIA FOTOGRÁFICA DEL ANALISIS ANATOMOPATOLÓGICO DE MUESTRA DE INTESTINO DELGADO

GRUPO 1:

	<p>IMAGEN 1: Arquitectura de la mucosa intestinal de intestino delgado</p>
	<p>IMAGEN 2: Vaso sanguíneo con hematíes e infiltrado leucocitario periférico al vaso.</p>
	<p>IMAGEN 3: infiltrado inflamatorio abundante en vellosidad de mucosa de intestino delgado.</p>

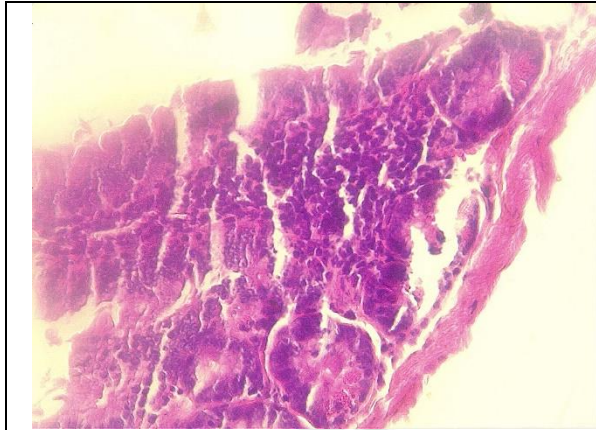


IMAGEN 4: Infiltrado leucocitario a nivel de mucosa de intestino delgado

GRUPO 2

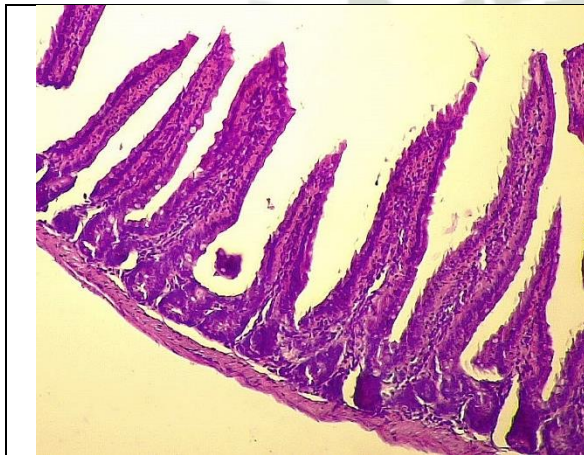


IMAGEN 5: Arquitectura de la mucosa intestinal de intestino delgado

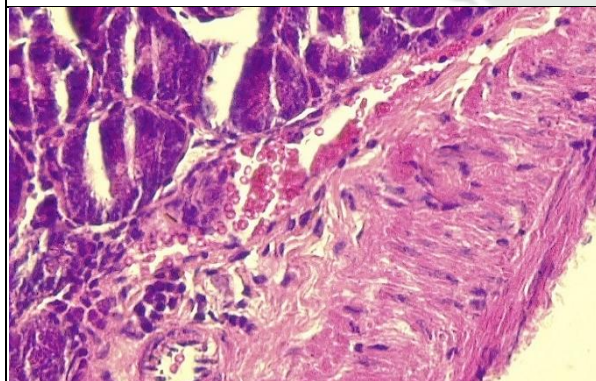


IMAGEN 6: Vaso sanguíneo roto con hematíes e infiltrado leucocitario periférico al vaso.

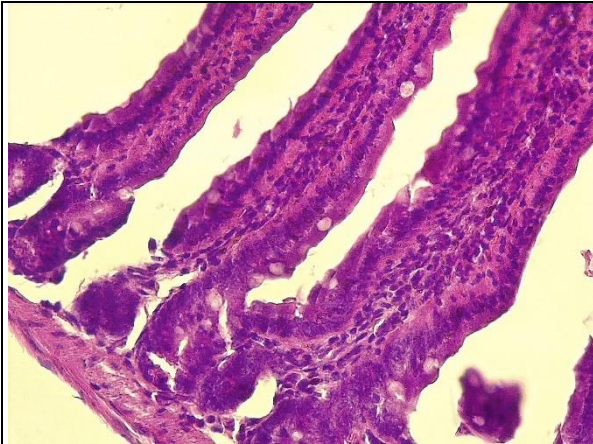


IMAGEN 7: infiltrado inflamatorio abundante en vellosidad de mucosa de intestino delgado.

GRUPO 3

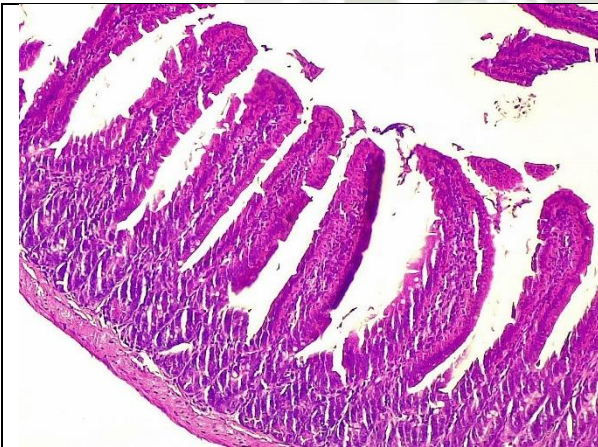


IMAGEN 8: Arquitectura de la mucosa intestinal de intestino delgado

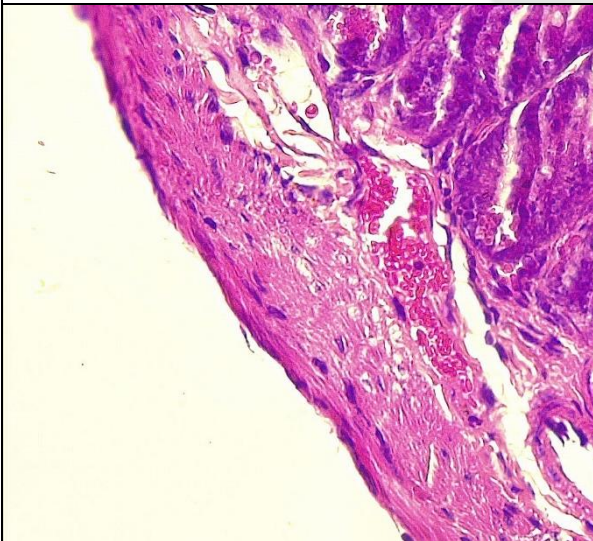


IMAGEN 9: Vaso sanguíneo íntegro con hematíes

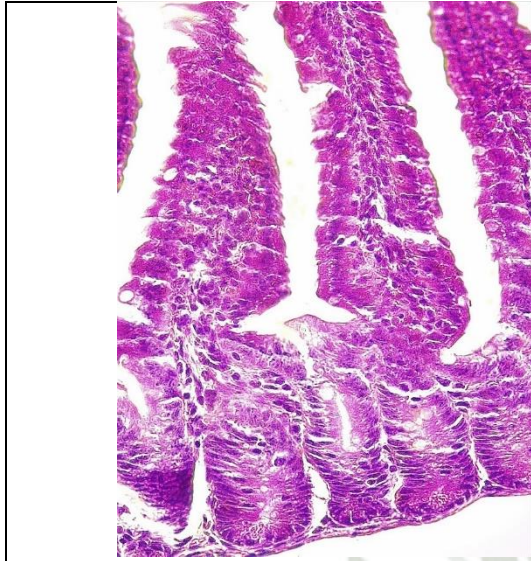


IMAGEN 10: infiltrado inflamatorio leve en vellosidad de mucosa de intestino delgado.

GRUPO 4



IMAGEN 11: Arquitectura de la mucosa intestinal de intestino delgado

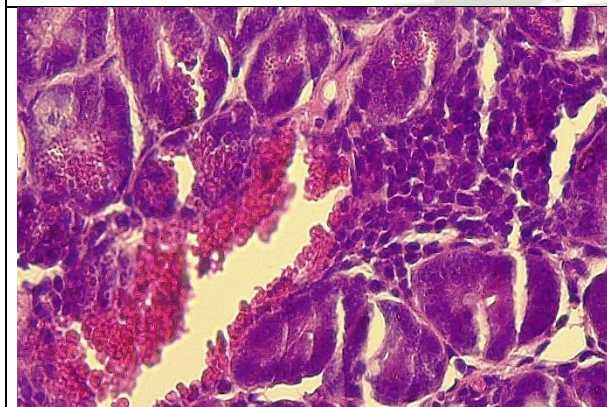


IMAGEN 12: Vaso sanguíneo roto con hematíes e infiltrado leucocitario abundante periférico al vaso.

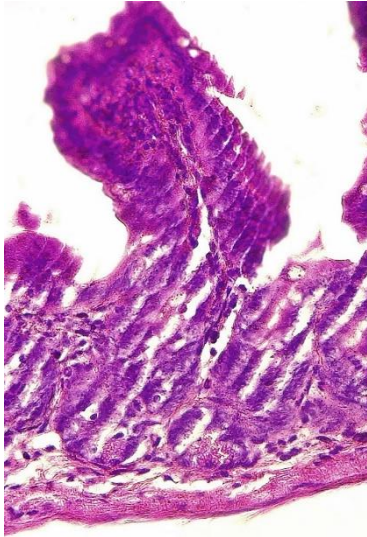


IMAGEN 13: infiltrado inflamatorio abundante en vellosidad de mucosa de intestino delgado con pérdida de la arquitectura íntegra.

