

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
AGRARIA
“ ANTONIO NARRO ”

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL



Evaluación “*in vivo*” de bebidas probióticas
preparadas a base de suero en población infantil

Por:

Victor Manuel González Romero

T E S I S

Presentada como requisito parcial para
obtener el título de:

**Ingeniero en Ciencia y Tecnología
de Alimentos**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
Noviembre de 2004

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ ANTONIO NARRO ”**

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Evaluación “*in vivo*” de bebidas probióticas preparadas a base de suero en población infantil

Por:

Victor Manuel González Romero

T E S I S

Que se somete a consideración del H. Jurado examinador como requisito parcial para obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

APROBADA POR:

M.C. Oscar Noé Reboloso Padilla
Presidente

Dra. Ma. de Lourdes Morales Caballero
Sinodal

M.C. Regino Morones Reza
Sinodal

M.C. Xóchitl Ruelas Chacón
Sinodal

Dr. Ramón F. García Castillo
Coordinador de la División de Ciencia Animal

Buenavista, Saltillo, Coahuila. México. Noviembre de 2004

“El éxito es ese viejo trío: habilidad, oportunidad y valentía.”

-Charles Luckman

DEDICATORIA

A mis padres

Mariana Romero Chavez

Manuel González Borjón

A MIS HERMANAS

Fátima, Marianela y Edith

A mi novia

Sarahí del C. Rangel Ortega

AGRADECIMIENTOS

A Dios Padre por la Vida

A mis padres por el *Inmenso Amor*

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por toda su *bondad* para con sus hijos.

Al personal docente y de apoyo de los Departamentos de Producción Animal, Nutrición y Alimentos, por todos los conocimientos y consejos transmitidos.

Al M.C. *Oscar Noé Reboloso Padilla* por la *asesoría, confianza, amistad y apoyo* que he recibido para la realización de esta investigación.

A la M.C. *Xóchitl Ruelas Chacón* por su confianza y apoyo.

También gracias por el apoyo brindado por la QFB *Martha Jeana Nieto Martínez* y a la QFB *Sandra de la Cruz Aviles* del Laboratorio Estatal de Salud Pública.

Al M.C. *Regino Morones Reza* por su valiosa asesoría en el análisis estadístico.

A la Dra. *Ma. de Lourdes Morales Caballero* por su tenacidad por la enseñanza integral y humana.

A la Esc. Primaria "Miguel Hidalgo" de Buenavista, Saltillo, Coahuila;
Profesores, Padres de familia y Niños sin ellos no hubiera sido posible este
estudio, GRACIAS.

A mis compañeros de generación, en especial a aquellos que me brindaron su
valiosa amistad:

Nancy Lozano, Martha Lilia Meléndez, Bey Enrique Sánchez, Juan Argueta,
Miguel Ángel Machuca, Nemesio Martínez, Víctor Jaimes Peña, Nely I. Ávalos,
Javier Cornejo, Raúl Fajardo, Francisco Hdez, Loreli L. Nanga, José C. Suárez,

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Dedicatoria	
Agradecimiento	
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
I INTRODUCCIÓN.....	1
JUSTIFICACIÓN.....	4
OBJETIVO GENERAL.....	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
II REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2 LA LECHE Y SUS PRODUCTOS.....	5
2.1. Definición.....	5
2.1.1. Composición físico – química.de la leche.....	5
2.1.2. Valor nutricional de la leche.....	7
2.1.2.1. Agua.....	7
2.1.2.2. Hidratos de carbono.....	8
Transformación de la lactosa.....	8
Oligosacáridos de la leche.....	9
2.1.2.3. Proteínas.....	9
Caseínas.....	10

Seroproteínas.....	10
2.1.2.4. Grasas.....	12
2.1.2.5. Vitaminas y Minerales.....	13
2.2 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	14
2.2.1. Características generales: Citomorfológicas, Fisiológicas y Bioquímicas.....	14
2.2.2. Género Streptococcus.....	16
2.2.3. Género Lactobacillus.....	18
2.3 PROBIÓTICOS.....	20
2.3.1. Antecedentes.....	20
2.3.2. Definición.....	20
2.3.3. Bacterias consideradas como Probióticos: Bifidobacteria, L. acidophilus, Lactococcus lactis.....	22
2.4 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS BACTERIAS PROBIÓTICAS.....	25
2.4.1. Manipulación del desarrollo de la microflora intestinal.....	29
2.5 EVOLUCIÓN DE LA MICROFLORA INTESTINAL HUMANA.....	30
2.5.1. Desarrollo de la ecología microbiana del tracto gastrointestinal del recién nacido.....	30
2.5.2. Composición y distribución de la flora intestinal en el adulto.....	33
2.6 BACTERIAS ENTÉRICAS.....	35
2.6.1. Generalidades.....	35
2.6.2. Géneros de enterobacterias importantes.....	38

2.7 LA DIARREA.....	51
2.7.1. Definición.....	51
2.7.2. Fisiopatología.....	51
2.7.2.1 Mecanismos principales de su patogenia:	
citopático, enterotóxico, enteroinvasivo.....	52
2.7.3. Tipos de diarrea: exudativa, osmótica, secretora,	
inflamatoria.....	53
2.7.4. Clasificación clínica de la diarrea: aguda y crónica.....	55
III MATERIALES Y MÉTODOS.....	58
3.1. Lugar.....	58
3.2. Cultivos Iniciadores.....	58
3.3. Materiales.....	58
3.4. Equipo.....	59
3.5. Metodología.....	59
3.5.1. Proceso de producción.....	59
3.5.1.1. Cinéticas de fermentación de los cultivos madre..	61
3.5.1.2. Cinéticas de fermentación de lotes.....	61
3.5.1.3. Recuento de microorganismos viables.....	61
3.5.1.4. Formulación de las bebidas refrescantes	
fermentadas.....	62
3.5.2. Selección de los niños participantes.....	64
3.5.3. Análisis microbiológico del tracto gastrointestinal de los	
niños.....	62
3.5.3.1. Toma y envío de las muestras fecales.....	65
3.5.4. Administración del tratamiento con las bebidas	
probióticas.....	65
3.6. Diseño experimental.....	66

IV	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
	4.1. Control del proceso de producción de la bebida probiótica.....	71
	4.1.1. Curvas típicas de la fermentación en cultivo madre y en lote.....	72
	4.1.2. Estabilidad de la viabilidad bacteriana de la bebida fermentada.....	72
	4.2. Resultados del monitoreo previo.....	73
	4.2.1. Niños seleccionados para el estudio.....	73
	4.3. Diagnóstico microbiológico intestinal de los niños seleccionados.....	74
V	CONCLUSIONES	80
VI	RECOMENDACIONES	82
VII	LITERATURA CITADA	83
VIII	ANEXOS	91
	8.1 Material del monitoreo y muestreo.....	92
	Folleto de presentación de la bebida probiótica.....	92
	Formato de entrevista.....	95
	Resultados de la entrevista.....	97
	Niños seleccionados para el estudio.....	99
	8.2 Análisis de Varianza.....	100
	Cálculo para la prueba de Kruskal – Wallis.....	101
	Prueba de X^2	104
	Intervalo de Confianza para la proporción poblacional.....	105
	Técnica para la fabricación de queso panela.....	106

Técnica para la obtención de una bebida fermentada a base de suero dulce proveniente de la fabricación de queso..... 107

Tabla A

Tabla B

ÍNDICE DE CUADROS

No.	Título	Pág.
1	Indicadores de condición de la vivienda en la ciudad de Saltillo.....	2
2	Propiedades físico – químicas de la leche de vaca.....	6
3	Diferencias de composición del suero dulce y ácido proveniente de la fabricación de queso.....	7
4	Distribución de las proteínas en la leche.....	10
5	Composición de los aminoácidos en las proteínas de la leche.....	12
6	Minerales y vitaminas presentes en la leche.....	13
7	Características de la familia Lactobacteriaceae.....	15
8	Principales especies del género Streptococcus.....	17
9	Principales especies del género Lactobacillus.....	19
10	Propiedades ideales para la utilización de cepas en productos probióticos.....	21
11	Lista parcial de cepas probióticas caracterizadas.....	25
12	Efectos potenciales en la salud establecidos por las bacterias probióticas.....	28
13	Comparación de bacterias encontradas en el interior del genital de una mujer embarazada, heces de recién nacidos, niños y adultos.....	31
14	Características de la familia Enterobacteriaceae.....	37
15	Características metabólicas de la familia Enterobacteriaceae.....	36
16	Clasificación de las cepas de Escherichia coli asociadas con procesos diarreicos.....	40
17	Causas comunes de trastornos diarreicos.....	57
18	Cultivos utilizados en la fabricación de la bebida fermentada con suero lácteo.....	58
19	Composición físico – química del suero dulce de quesería procedente de la fabricación de queso panela.....	60

20	Especificaciones físico – químicas y microbiológicas de una bebida fermentada elaborada a base de suero dulce de quesería.....	60
21	Criterios para la asignación de rangos.....	67
22	Frecuencias observadas.....	69
23	Frecuencias esperadas.....	69
24	Registro de acidez para la graficación de la curva de fermentación.....	72
25	Cuenta de microorganismos viables del producto fermentado después de una semana.....	73
26	Resultados del análisis microbiológico.....	75
27	Proporción (%) de aparición de cada bacteria en cada uno de los tratamientos antes y después de la administración de las bebidas probióticas.....	76
28	Suma de las proporciones por tratamiento de observaciones positivas y negativas obtenidas del cuadro de frecuencias esperadas (E).....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Título	Pág.
1	Síntesis de la lactosa en la ubre a partir de la glucosa y galactosa.....	8
2	Estructura general de las proteínas.....	9
3	Beneficios en la salud por el consumo de productos probióticos.....	26
4	Variación de las poblaciones y especies bacterianas a lo largo del tracto gastrointestinal (GI) humano en adultos en condiciones de no ayuno.....	33
5	Factores relacionados con la diarrea aguda y crónica.....	54
6	Diagrama de flujo del proceso de producción de la bebida probiótica.....	63
7	Técnica de coprocultivo utilizada en el análisis microbiológico.....	64
8	Curvas características de la cinética de fermentación en ambos cultivos probióticos.....	71
9	Resultados de coprocultivo antes y después del tratamiento con la bebida probiótica AB1.....	77
10	Resultados de coprocultivo antes y después del tratamiento con la bebida probiótica OM1.....	77
11	Resultados de coprocultivo antes y después del tratamiento con la bebida probiótica para el grupo Testigo.....	78

RESUMEN

Para evaluar la eficiencia de la bebida probiótica refrescante fermentada con Bacterias Ácido Lácticas (BAL) a base de suero lácteo proveniente de la industria quesera, en el tratamiento y prevención de síntomas diarreicos en infantes de edad escolar, se seleccionaron 30 niños sanos de una escuela primaria de una comunidad desde el mes de Marzo al mes de Junio de 2004, donde inicialmente se entrevistaron a los padres para recabar informes sobre casos diarreicos en sus hijos. En el cuestionario se pedían datos generales como el nombre, edad, género y datos clínicos como el tiempo de evolución de la diarrea, frecuencia, sintomatología, tratamientos, alergias y dieta. En todos los casos se midió el peso y la estatura del niño.

El rango de edad de los niños que participaron era de 6 a 13 años donde el 43.33 % eran niñas y el 56.67 % eran niños. A cada infante se le tomó una muestra fecal rectal con un hisopo "Cary Blair", antes y después del tratamiento para realizar un análisis bacteriológico por coprocultivo y registrar la microflora patógena presente.

Se administró durante un mes una cantidad de 150 ml/día de bebida probiótica sin control de dieta en los tres grupos de estudio, que incluye al grupo testigo. El primer tratamiento se realizó con 12 niños a quienes se les administró la bebida con el probiótico AB1, el segundo grupo fue de 11 niños a quienes se les administró la bebida fermentada con el cultivo OM1 y el tercer grupo de 7 niños fungió como testigo.

Del total de las 30 muestras analizadas se identificaron 7 géneros y 13 especies: *Escherichia coli*, *E. fergusonii*; *Enterobacter sp.*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*; *Citrobacter freundii*; *Klebsiella sp.*, *K. pneumoniae*, *K. oxitoca*; *Kluyvera ascorbata*, *Serratia fonticola*, *S. marcescens* y *Pseudomona aeruginosa*.

Los géneros que predominaron fueron *Escherichia* y *Enterobacter*, los restantes aparecieron en una proporción mucho menor y similar.

De acuerdo a la prueba de Kruskal – Wallis, para determinar si el consumo de las bebidas probióticas influía en la sucesión de las bacterias en forma positiva o negativa después de la administración de las bebidas probióticas se asignaron rangos según el tipo de observación en los resultados de los análisis microbiológicos y fueron: 1 cuando había un cambio en el último análisis microbiológico después del tratamiento respecto al primero, pero éste se conservaba en un estado normal ó en una condición segura sin riesgo a sufrir enfermedades infecciosas con cuadros diarreicos; rango 2 cuando había un cambio positivo; 3 cuando había cambio pero se consideraba negativo o potencialmente riesgoso; 4 cuando la sucesión de bacterias resultantes después del tratamiento se consideraban aún negativas; 5 cuando no había resultados diferentes y éstos se conservaban en normales o sin riesgo y por último el rango 6 que significaba que no hubo cambio en los resultados y que a su vez éstos permanecientes seguían siendo inseguros. Finalmente el resultado fue $H = 3.34$ con una distribución de X^2 a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$, se indica que bajo la hipótesis nula (H_0), no existe diferencia significativa entre los diferentes cambios observados en los resultados microbiológicos con los distintos tratamientos.

Para complementar y corroborar el resultado anterior se utilizaron tablas de contingencia con una distribución de “Ji – cuadrada” en donde $X^2 = 5.28$ se comprobó que las bebidas no tienen efecto y los cambios observados en los resultados clínicos son independientes del empleo o no de las bebidas probióticas.

Al observarse un porcentaje alto de cambios positivos no relacionados estadísticamente con la aplicación de los tratamientos, se determinó el intervalo de 69 % - 96 % (0.69 – 0.96) donde se contiene la proporción con un 95 % de nivel de confianza, de observaciones positivas.

I INTRODUCCIÓN

La producción de leche bovina para el año de 2003 fué de 9, 842, 422 litros, aproximadamente 10 millones. Se reportan también 14.598 ton de queso panela producidos el mismo año por SIAP (2004) que se fabricaron con 112,292.308 litros de leche (rendimiento del queso panela = 13 %) que es apenas el 1.14 % de la producción nacional total anual de leche bovina de los que se obtendrían 97,694.30796 litros de suero dulce (87 %), de los cuáles obtendríamos 0.976 ton de proteínas séricas: α – lactoalbúmina, β – lactoglobulina, seroalbúmina bovina, inmunoglobulina, péptidos proteicos, cenizas y lípidos. Se obtendrían 19, 538.86 dosis de aporte proteico para niños de 6 – 13 años que es de 50 g/ día (IDR) (Badui D. S. 1999).

La lactosa se encuentra en la proporción de 40 – 50 gr/L de leche, que aislada, podría ser aprovechada formando parte en productos dietéticos, como soporte y diluyente de diversos medicamentos en farmacia, y como componente de los medios de cultivo de mohos y actinomices en la industria de los antibióticos, en la producción de ácido láctico por fermentación para diversas aplicaciones en la industria alimenticia, farmacéutica, textil, curtidos, plásticos, etc. (Alais, C. 1986)

Según la CANILEC (Cámara Nacional de la Industria Lechera) la cual está conformada por 310 afiliaciones de industria formal y abastece el 86 % de la demanda en el país, la cual registró una producción de 6,800 millones de litros para el 2003. Contribuyendo en un 13 % al producto interno bruto (PIB) de la industria alimentaria. El consumo aparente para el último año fue de 14, 170 millones de litros de leche. La producción de leche en polvo para el año 2003 fué de 150, 835 ton. (Liconsa utilizó 90 000 ton de leche en polvo).

Las condiciones de la vivienda en la ciudad de Saltillo es mayor a 50 % en calidad, amplitud y en servicios básicos como se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro 1. Indicadores de condición de la vivienda en la ciudad de Saltillo

Número de casos ¹	Centro Urbano ²	Indicador de calidad ³	Indicador de amplitud ⁴	Indicador de servicios básicos ⁵
4	Saltillo Zc	51.2	54.5	79.9

1. Es la referencia de los centros urbanos estudiados
2. Zc – Zona conurbada
3. Se refiere al % de viviendas que cuentan con techo de concreto, paredes de tabique y pisos de mosaico o madera.
4. Se refiere al % de viviendas que cuentan con más de dos cuartos y menos de 6 habitantes. (No considera la cocina exclusiva como cuarto).
5. Se refiere al % de viviendas que contaban con agua en su interior, drenaje a red pública o fosa séptica y con energía eléctrica.

Fuente: CITIGROUP BANAMEX, 2001.

Según la CONAPO, Coahuila es una de las entidades con un muy bajo índice de marginación (FAO, 2003).

Las enfermedades diarreicas son una de las causas más comunes de mortalidad en niños de países en desarrollo y son responsables de tres a cinco millones de muertes al año. En México se ha mantenido estable pero mostrando una tendencia ascendente hacia el final de la década de los noventa (Mota-Hernández F, 2001). La mortalidad en el año de 2002 por enfermedades infecciones intestinales en niños en edad escolar (5 – 14 años) se posicionó en la onceava causa de muerte, siendo del 1.8 % y para niños en edad preescolar (1 – 4 años) ascendió como primera causa de muerte teniendo un 9.8 % (INEGI/SSA, 2002). Siendo evidente la necesidad de atender este problema,

que es uno de los motivos de consulta frecuente y cotidiano en el primer nivel de atención.

El uso de probióticos ayuda a prevenir el estreñimiento y diarrea, controlar el crecimiento de flora nociva, favorecer el incremento de bacterias benéficas. Reducir sustancias tóxicas y estimular el sistema inmunológico, fortaleciendo la resistencia a infecciones (González U. M., 2004).

El suero de queso es un efluente de difícil manejo y un poderoso contaminante de las aguas por su alta demanda biológica de oxígeno (50,000 ppm). La contaminación de una planta productora de quesos es comparada con la contaminación que produciría una población de seiscientas personas. A pesar de que la proteína de suero es de mejor calidad que la caseína, en los países en desarrollo es desechado o utilizado para el consumo de cerdos desperdiciando así el alto valor nutricional de sus proteínas: α – lactoalbúmina y β – lactoglobulina que constituyen el 80 % de la proteína presente en el suero, las cuáles presentan mayor cantidad de aminoácidos azufrados (cisteína y metionina) que se encuentran insuficientes en la caseína; este factor les añade un valor biológico de 1.0 superior al 0.8 de la caseína (MONOGRAFÍAS, 2004).

JUSTIFICACIÓN

Por lo anterior, el presente trabajo pretende revelar el efecto del uso de bacterias ácido lácticas caracterizadas como probióticas con la técnica de análisis microbiológico: coprocultivo; en niños de edad escolar para la prevención o reducción de la incidencia de cuadros diarreicos causados por infecciones bacterianas. Se utilizará el suero dulce proveniente de la industria quesera como sustrato y vehículo para el desarrollo de las bacterias probióticas, además, aprovechar el alto valor nutricional del mismo que de otra manera se desecharía, contribuyendo al ya deteriorado medio ambiente.

OBJETIVO GENERAL

- ◆ Evaluar “in vivo” las propiedades terapéuticas de dos productos probióticos (cultivos AB1 y OM1) sobre el control y balance de la flora intestinal de niños.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Activar los cultivos liofilizados AB 1 y OM 1 y registrar su cinética.
- Seleccionar a niños con problemas diarreicos de zonas marginadas de alto riesgo.
- Obtener un estudio clínico bacteriológico: coprocultivo, y registrar la ecología enterobacteriana presente antes y después del tratamiento.
- Administrar los tratamientos a los grupos:
 - a) AB1 b) OM1 c) Testigo
- Comparar los resultados de los tratamientos a b y c.
- Disminuir los agentes bacterianos causantes de cuadros diarreicos.

- Evaluar la eficiencia de los tratamientos con las bebidas probióticas en la disminución de la prevalencia de enterobacterias patógenas promotoras de enfermedades gastrointestinales.
- Mantener un balance saludable de la microflora intestinal.

II REVISIÓN DE LITERATURA

2 LA LECHE Y SUS PRODUCTOS

2.1. DEFINICIÓN

La leche de vaca para consumo humano, es el producto proveniente de la secreción natural de las glándulas mamarias de las vacas sanas. Se excluye el producto obtenido 15 días antes del parto y 5 días después de éste o cuando tenga calostro (NOM-091-SSA1-1994).

2.1.1. COMPOSICIÓN FÍSICO – QUÍMICA DE LA LECHE

La composición varía ampliamente, dependiendo de diversos factores entre los que destacan: especie, raza e individuo, etapa de lactancia, edad, enfermedades (en particular las enfermedades de la ubre) y nutrición. Estas diferencias son en parte de origen genético y en parte se deben a factores fisiológicos y ambientales.

La leche es un producto nutritivo complejo que posee más de 100 sustancias que se encuentran ya sea en solución, suspensión o emulsión en agua. Por ejemplo:

- La caseína, se encuentra dispersa en una suspensión coloidal, estas partículas se llaman micelas con un diámetro que varía de 40 a 300 nm y un peso molecular de 200 a 2800 millones de daltones; en un ml de leche existen de 5000 a 15 millones.

- La grasa y las vitaminas liposolubles se encuentran en forma de emulsión.

- La lactosa, proteínas séricas, sales minerales y otras sustancias son hidrosolubles.

Cuadro 2. Propiedades físico – químicas de la leche de vaca

Componente	Composición g/L	Estado físico de los componentes
Agua	905	Agua libre (disolvente) + agua ligada (3.7 %)
Glúcidos: lactosa	49	Solución
Lípidos	35	Emulsión de los glóbulos grasos (3 a 5 μ)
Materia grasa propiamente dicha		
Lecitina (fosfolípidos)	34	
Parte insaponificable (esteroles, carotenos, tocoferoles)	0.5	
	0.5	
Prótidos	34	Suspensión micelar de fosfocaseinato de cal (0.08 a 0.12 μ)
Caseína	27	
Prótidos “solubles”(globulinas, albúminas)	5.5	Solución (coloidal)
Sustancias nitrogenadas no proteicas	1.5	Solución (verdadera)
Sales	9	Solución o estado coloidal (P y Ca) (Sales de K, Ca, Na, Mg, etc.)
del ácido cítrico (en ácido)	2	
del ácido fosfórico (P ₂ O ₅)	2.6	
del ácido clorhídrico (NaCl)	1.7	
Componentes diversos (vitaminas, enzimas, gases disueltos)	trazas	
Extracto seco (total)	127	
Extracto seco desengrasado	92	
PROPIEDADES FÍSICAS:		
Densidad de la leche completa	1.032	
Densidad de la leche descremada	1.036	
Densidad de la materia grasa	0.940	
Poder calórico (por litro), calorías	700	
pH	6.6 – 6.8	
Conductibilidad eléctrica, mhos	45 X 10 ⁻⁴	
Tensión superficial (dinas/cm/15°)	53	
Viscosidad absoluta (15°)	0.0212 – .0354	
Viscosidad relativa (específica)	1.6 – 2.15	
Índice de refracción	1.35	
Punto de congelación	- 0.55 °	
Calor específico	0.93	

Fuente: Alais C., 1986.

2.1.2. VALOR NUTRICIONAL DE LA LECHE

2.1.2.1. AGUA

El valor nutricional de la leche como un todo es mayor que el valor individual de los nutrientes que la componen debido a su balance nutricional único. La leche tiene un contenido aproximado de agua del 90% constituyendo al suero lácteo: Líquido obtenido de la coagulación de la caseína de la leche, mediante la acción de enzimas coagulantes de origen animal, vegetal o microbiano, por la adición de ácidos orgánicos o minerales de grado alimentario; acidificación por intercambio iónico hasta alcanzar el punto isoeléctrico de la caseína (NOM-035-SSA1-1993), la diferenciación entre uno y otro se deriva por su pH, el suero dulce, proviene de la mayoría de los quesos madurados, y el suero ácido es un subproducto por ejemplo del llamado queso cottage.

Cuadro 3. Diferencias de composición del suero dulce y ácido proveniente de la fabricación de queso

<i>Componentes</i>	<i>Suero dulce</i> %	<i>Suero ácido</i> %
▪ Sólidos totales	6.5	5.2
▪ Lactosa	4.9	4.3
▪ Proteína	0.8	0.6
▪ Nitrógeno no protéico (% del total)	22.0	27.0
▪ Ácido láctico	0.15	0.75
▪ Cenizas	0.56	0.46
▪ pH	6.2	4.6

Fuente: Badui D. S., 1999.

La cantidad de agua en la leche es regulada por la lactosa que se sintetiza en las células secretoras de la glándula mamaria. El agua que va en la leche es transportada a la glándula mamaria por la corriente circulatoria.

2.1.2.2. HIDRATOS DE CARBONO

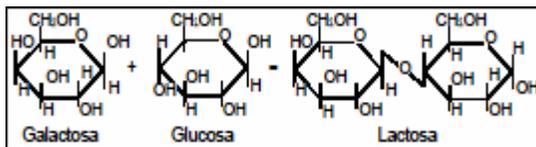


Figura 1. Síntesis de la lactosa en la ubre a partir de la glucosa y galactosa.

El principal hidrato de carbono en la leche es la lactosa (Figura 1). A pesar de que es un azúcar, la lactosa no se percibe por el sabor dulce. La concentración de lactosa en la leche es relativamente constante y promedia

alrededor del 5% (4.8%-5.2%). A diferencia de la concentración de grasa en la leche, la concentración de lactosa es similar en todas las razas lecheras y no puede alterarse fácilmente con prácticas de alimentación (Wattiaux M. A, 2004).

La lactosa es una hexobiosa (galactósido -1 – 4 – glucosa), $C_{12}H_{22}O_{11}$, P.M. = 342 formada por la unión de una molécula de β – galactosa y una molécula de glucosa α ó β . El grupo aldehídico de la primera está unido al enlace y el segundo está libre. Esta se sintetiza únicamente de glucosa, las células secretoras la absorben y convierten parte de esta en galactosa con ello proveen de las unidades necesarias para la producción de la lactosa. En los rumiantes la mayoría de los carbohidratos de la dieta se rompen y se forman ácidos grasos volátiles como acético, propiónico y butírico. El ácido propiónico es convertido en glucosa que se usa posteriormente en la síntesis de la lactosa (Perez J. P., 1984).

Transformación de la lactosa

La lactosa puede experimentar fermentaciones muy variadas como la homoláctica (industria láctea) utilizándose bacterias ácido lácticas productoras que producen dos moléculas de lactato por cada molécula de glucosa (hasta el 90 % del sustrato disponible). En la heteroláctica (productos vegetales) se produce menos cantidad de lactato en un 50 %, se produce 30 % de etanol y 17 %) de CO₂.

Oligosacáridos de la leche

Son de gran importancia por su actividad biológica: Los sacáridos no nitrogenados: contienen glucosa, galactosa y una metilpentosa: la mucosa. Ginogalactosa y la alolactosa con mezclas de estos sacáridos.

Los sacáridos que contienen un azúcar nitrogenado: N – acetil – glucosamina, poseen actividad biológica como factor de crecimiento del *Lactobacillus bifidus*. La leche de vaca posee escasa cantidad de estas sustancias; si el valor de la leche humana se expresa con 100 %, se tendría para el calostro de vaca 40 % y para la leche de vaca de un 2 a 4 %. Esta es una de las razones de la superioridad de leche materna (Alais, 1986).

2.1.2.3. PROTEÍNAS

La concentración de proteína en la leche varía de 3.0 a 4.0% (30-40 gramos por litro). El porcentaje varía con la raza de la vaca y en relación con la cantidad de grasa en la leche.

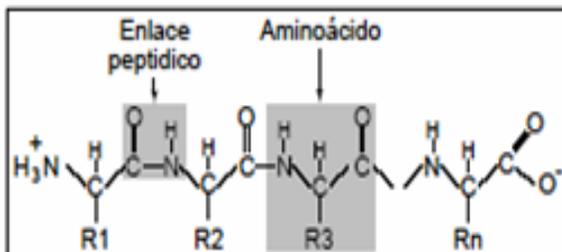


Figura 2. Estructura general de las proteínas

Las proteínas se clasifican en dos grandes grupos: caseínas (80%) y proteínas séricas (20%) debido al proceso de fabricación de queso, que consiste en la separación del cuajo de

las proteínas séricas luego de que la leche se ha coagulado bajo la acción de la renina.

Caseínas

El comportamiento de los diferentes tipos de caseína (α , β y κ) en la leche al ser tratada con calor, diferente pH (acidez) y diferentes concentraciones de sal, proveen las características de los quesos, los productos de leche fermentada y las diferentes formas de leche (condensada, en polvo, etc.).

Cuadro 4. Distribución de las proteínas en la leche

	Total de proteínas (%)	Peso molecular	Número de aminoácidos	Punto isoeléctrico	Variantes
Caseínas	80				
α_{s1}	34	23 612	199	4.1	A, B, C, D
α_{s2}	8	25 228	207		
β	25	23 980	209	4.5	A ¹ , A ² , A ³ , B, C, D
κ	9	19 005	169	4.1	A, B
γ	4			5.8	A ¹ , A ² , A ³ , B
Proteínas del suero	20				
β – lactoglobulina	9	18 263	162	5.3	A, B, C, D
α – lactalbúmina	4	14 174	123	5.1	A, B
proteosa peptona	4	4 000 – 200 000			
inmunoglobulinas	2	150 000 – 1X10 ⁶		4.5 – 8.3	
seroalbúmina	1	69 000		4.7	

Fuente: Badui D. S., 1999.

Seroproteínas

Son compactas, globulares, con un peso molecular entre 14 000 - 1 000 000 de daltones y son solubles en un intervalo de pH muy amplio

(incluso a pH muy bajo, siempre y cuando no se hayan desnaturalizado por el calor).

Constan por lo menos de ocho fracciones diferentes, entre las cuales destacan:

- ◆ **β – lactoglobulina**, que suma aproximadamente el 45 % del total de las proteínas del suero, ésta no se encuentra en la leche materna, es considerada como la responsable de las reacciones alérgicas que se observan en infantes alimentados con leche de vaca; por lo que en fórmulas lácteas se elimina.
- ◆ **α – lactalbúmina** segunda proteína de importancia en el suero, principal portador de grupos sulfhídricos, tiene actividad biológica ya que es parte constitutiva del sistema enzimático requerido para la síntesis de la lactosa, por lo que también se conoce como proteína B de dicho sistema, es de bajo peso molecular y tiene un alto contenido de triptófano.
- ◆ **inmunoglobulinas**, que contribuyen a las propiedades antibacterianas naturales de la leche que no se han sometido a tratamientos térmicos suman aproximadamente el 10 % del total de proteínas del suero, en promedio de 0.6 g/l en la leche de vaca, 2 % de las proteínas totales, son las primeras en desnaturalizarse durante el calentamiento de la leche; provienen de la sangre animal, constan de moléculas de glucoproteínas con un alto contenido de grupos azufrados y con actividad biológica de anticuerpo con los diferentes tipos designados como IgM, IgA, IgG₁ e IgG₂.

- ◆ **albúminas bovinas** equivalente a las presentes en el suero sanguíneo, contienen un alto número de cistinas (17 / mol) y un grupo sulfhidrilo, que es fácilmente desnaturizable aún en temperaturas bajas.
- ◆ **proteosas – peptonas**, diferenciadas del demás grupo de proteínas por no precipitar por calentamiento a 95 – 100 ° C, contienen glúcidos en proporciones notables, hasta el 6 %, y fósforo; pertenecen a la proteína soluble de la “membrana” de los glóbulos grasos.

Cuadro 5. Composición de los aminoácidos en las proteínas de la leche

Aminoácidos	Caseínas				Proteínas del suero				Proteínas Totales
	α_{s1} - B	β - A ¹	K - A	γ - A ¹	β - Lg - A	α - La - B	Albúmina	Inmuno - globulinas	
Ác. Aspártico	7.3	4.3	7.3	3.9	10.2	17.1	9.4	8.1	7.4
Treonina	2.1	4.0	8.0	3.9	4.5	5.0	4.9	8.9	4.7
Serina	6.0	5.8	6.0	4.7	3.4	4.3	3.5	9.5	6.0
Ác. Glutámico	21.13	21.1	18.3	20.1	17.9	11.9	14.4	10.7	23.9
Prolina	7.0	13.8	10.2	15.6	4.3	1.4	4.1	8.4	11.3
Glicina	2.2	1.2	0.6	1.1	1.0	2.4	1.4	4.0	2.0
Alanina	2.7	1.5	5.2	1.7	5.5	1.5	5.0	3.8	3.5
Cisteína	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	5.5	2.7	1.8
Cistina (1/2)	0.0	0.0	1.1	0.0	2.3	5.8			
Valina	4.6	7.8	5.7	8.2	5.5	4.2	5.0	8.1	7.0
Metionina	2.8	3.3	1.4	3.8	2.9	0.9	0.7	0.8	2.5
Isoleucina	5.3	4.7	7.1	3.9	6.3	6.4	2.2	2.6	6.5
Leucina	8.1	10.4	4.8	10.5	13.8	10.4	10.6	8.3	10.0
Tirosina	7.0	2.7	7.7	3.2	3.6	4.6	4.6	6.0	5.2
Fenilalanina	5.0	5.5	3.1	6.4	3.3	4.2	5.9	3.5	4.9
Triptófano	1.6	0.8	1.0	1.0	2.1	5.3	0.5	2.4	1.4
Lisina	7.6	5.9	6.1	6.2	10.7	10.9	11.2	6.0	7.9
Histidina	2.9	3.4	2.2	4.0	1.5	2.9	3.3	1.8	2.7
Arginina	4.0	2.6	4.1	1.5	2.6	1.1	5.3	3.7	3.7

Fuente: Badui D. S., 1999.

2.1.2.4. GRASA

Normalmente, la grasa (o lípidos) constituye desde el 3.5 hasta el 6,0% de la leche, variando entre razas de vacas y con las prácticas de alimentación.

Cada glóbulo se encuentra rodeado de una capa de fosfolípidos, que evitan que los glóbulos se aglutinen entre sí repeliendo otros glóbulos de grasa

y atrayendo agua. Siempre que esta estructura se encuentre intacta, la leche permanece como una emulsión.

La mayoría de los glóbulos de grasa se encuentran en la forma de triglicéridos formados por la unión de glicerol con ácidos grasos. La grasa de la leche contiene principalmente ácidos grasos de cadena corta (cadenas de menos de ocho átomos de carbono) producidos de unidades de ácido acético derivadas de la fermentación ruminal.

2.1.2.5. VITAMINAS Y MINERALES

La leche es una fuente excelente para la mayoría de los minerales requeridos para el crecimiento del lactante.

La digestibilidad del calcio y fósforo es generalmente alta, en parte debido a que se encuentran en asociación con la caseína de la leche. Como resultado, la leche es la mejor fuente de calcio para el crecimiento del esqueleto del lactante y el mantenimiento de la integridad de los huesos en el adulto.

Otro mineral de interés en la leche es el hierro. Las bajas concentraciones de hierro en la leche no alcanzan a satisfacer las necesidades del lactante, pero este bajo nivel pasa a tener un aspecto positivo debido a que limita el crecimiento bacteriano en la leche.

Cuadro 6. Minerales y vitaminas presentes en la leche

Minerales	mg/100 ml	Vitaminas	µg/100 ml¹
K	138	Vit. A	30.0
Ca	125	Vit. D	0.06
Cl	103	Vit. E	88.0
P	96	Vit. K	17.0
Na	58	Vit. B1	37.0
S	30	Vit. B2	180.0
Mg	12	Vit. B6	46.0

Minerales trazas²	< 0.1	Vit. B12	0.42
		Vit. C	1.7

¹ µg = 0.001 gramo

² Incluye Co, Cu, F, Mn, Mb, Zc, Se, I y otros.

Fuente: Wattiaux M. A., 2004.

2.2 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

2.2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES: Citomorfológicas, fisiológicas y bioquímicas.

- **Citomorfológicas:** Bacterias esféricas, estreptococos; alargadas, lactobacilos. Las condiciones del medio y la coloración pueden modificar su condición. Son inmóviles, no esporuladas, gram positivas y catalasa negativas.
- **Fisiológicas:** Anaerobias facultativas o microaerófilos, poco crecimiento en la superficie de los medios de cultivo usuales; crecimiento fácil en profundidad. Exigentes en nutrición nitrogenada y vitamínica, así, el medio debe aportar una mezcla compleja de aminoácidos y factores de crecimiento, especialmente de las vitaminas B. Los disacáridos (lactosa, sacarosa, maltosa) son mejores que las hexosas de las que están formados. El tipo de ácido láctico producido difiere dependiendo de la especie de la que provenga, dextrógiro (D) ó levógiro (L).
- **Bioquímicas:** Carecen de la citocromo – oxidasa puesto de manifiesto por la reacción de la bencidina, no reducen los nitratos, no existe crecimiento con las sales de amonio como única fuente nitrogenada, la actividad proteolítica, en general es débil y no se manifiesta más que lentamente.

Cuadro 7. Características de la familia Lactobacteriaceae

Tribu	Anaerobiosis	Género	Tipo de fermentación	Grupo	Especies principales	Observaciones
Streptococaceae	Facultativa	Diplococcus	Homo		D. Pneumoniae	parásitos
		Streptococcus	Homo	Piógeno	S. pyogenes, agalactiae, uberis	patógenos
			Homo	Láctico	S. lactis, cremoris, diacetilactis	fermentos
	Estricta	Pediococcus	Homo	Termófilo	S. thermophilus, bovis	lácticos
		Leuconostoc	Hetero	enterococcus	S. faecalis, liquefaciens P. cerevisiae L. citrovorum, Kefir	especies de los mostos fermentos lácticos
		Peptostreptococcus	Hetero		Ps. Anaerobius, foetidus	parásitos patógenos
Lactobacilleae	Facultativa	Lactobacillus	Homo	Mesófilo Termófilo	L. casei, plantarum, leichmanii L. lactis, helveticus, bulgáricus, acidophilus, bifidus, L. termophilus, delbruckii	
			Hetero	Mesófilo Termófilo	L. brevis, pastorianus L. fermenti, caasicum	Fermentos lácticos
	Estricta	Enterobacterium Catenobacterium Ramibacterium Cillobacterium			Parásitos patógenos	

Fuente: Alais C., 1986.

Los géneros más importantes son: Streptococcus, Leuconostoc y Lactobacillus. Los géneros restantes no fermentan la lactosa o lo hacen de una manera irregular, produciéndolo en poca cantidad.

2.2.2. GÉNERO STREPTOCOCCUS

Bacterias lácticas mesófilas homofermentativas pertenecientes al grupo serológico N. Producen de 0.8 a 1 % de ácido láctico en la leche tornasolada ya que tienen la mayor actividad reductora.

Estos estreptococos son los agentes habituales de la coagulación de la leche abandonada a la temperatura ambiente; constituyen los fermentos lácticos cultivados entre 20 ° - 30 ° C, zona de óptimo crecimiento. Se desarrollan aún a 10 ° C, o menos, pero no a 45 °.

Cuadro 8. Principales especies del género Streptococcus

	Láctico			Termófilo	Plógeno	Enterococo	Heterofermentativo (<i>Leuconostoc</i>)	
	S. cremoris	S. lactis	S. diacetylactis	S. termophilus	S. galactiae	S. faecalis	L. citrovorum	L. lactis
Cultivo a 10 °	+	+	+	-	-	+	+	+
Cultivo a 37 °	-	+		+	+	+	-	+
Cultivo a 45 °	-	-	-	+	-	+	-	-
Supervivencia a 63 °/30 min	-	-	-	+	-	+	-	+
Fermentación gaseosa (CO ₂), de glucosa	-	-	-	-	-	-	+	+
Reducción rápida de la leche tornasolada (1)	+	+	+	-	-	+	-	-
Producción de acetoina	-	-	+	-	-	-	+	+
			(Citratos)				(azúcares)	(azúcares)
Producción de NH ₃ (Hidroliza la arginina)	-	+	+	-	+	+	-	-
Crecimiento en presencia de NaCl:								
2 %	-	+	+	-		+	+	
4 %	-	+	+	-		+	-	
6.5 %	-	-	-	-	-	+	-	-
Azúcares fermentados (2)								
Pentosas	-	-	-	-	-	+	-	+
Sacarosa	-	+	+	+	+	+	-	+
Maltosa, manitol, salicina	-	+	+	-	+	+	-	
Resistencia a la penicilina	-	-	-	-		+	-	-
Grupo serológico (Lancefield)	N	N	N	?	B	D	?	?
Carácter patógeno	-	-	-	-	+	+	-	

(1) Reducción antes de la coagulación. (2) Todas estas especies fermentan la glucosa, la galactosa y la lactosa.

Fuente: Alais C., 1986.

2.2.3. GÉNERO LACTOBACILLUS

Tienen forma alargada; la relación longitud – diámetro es muy variable, acidifican la leche menos rápido que los estreptococos; en este género se encuentran los mayores productores de ácido láctico, hasta de 2.8 %. Los lactobacilos soportan hasta valores de pH de 3.5. Actividad caseolítica acusada, por la presencia de proteinasas activas. En la leche cruda son mucho menos abundantes que los estreptococos siendo más dominantes en diversos tipos de quesos de 24 horas ($10^9/g$) fabricados a temperaturas $> 40^\circ C$, mantienen un pH alrededor de 5.1. Sus usos industriales se extienden entre otros en las leches fermentadas y en productos vegetales.

Cuadro 9. Principales especies del género Lactobacillus

		Homofermentativos						Heterofermentativos		
		Termófilos				Mesófilos		Termófilo	Mesófilo	
		Helveticus	Jugurti	Bulgaricus	Lactis	Acidophilus	Casei	Plantarum	Fermenti	Brevis
Cultivo a 15 °		-	-	-	-	-	+	+	-	+
Cultivo a 45 °		+	+	+	+	+	-	-	+	-
Resistencia a	60 °/90 min	+		-	+	-	-	-	-	-
	65°/30 min	-		-	+	-	-	-	-	-
Acido (%) en la leche		2.7	2.7	1.7	1.7	0.8	1.2 – 1.5	0.3 – 1.2	0.5	0.5
Tipo de ácido láctico		DL	DL	D	D	DL	L	DL	DL	DL
Producción de	CO ₂ (azúcares)	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	NH ₂ (arginina)	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Cultivo en presencia de	NaCl 2%	-		-	+	+	+	+	+	+
	NaCl 4%	-		-	-	-	+	+	+	+
	Teepol 0.4 %						-	+	-	+
Exigencias nutritivas a)		RP	RP	R	RC	RFC	PF	-	T	TF
Fermentación de pentosas b)		-	-	-	-	-	-	+/-	-	+
Fermentación de otros azúcares c)		1 (4)	(4)	-	1, 2, 3, 4	1, 2, 3, 4, (5), 6, 7	1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 0	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 0	1, (4, 5), 8	1, 5
Hidrólisis de la esculina		-	-	-	-	-	+	+	-	+/-
Grupo sexológico (Sharpe)		A	A	E	E	?	B, C	D	F	E

a) Factores de crecimiento: R, riboflavina,P, piridoxal; C, cianocobalamina (B₁₂); F, ácido fólico; T, tiamina.

b) Arabinosa y xilosa.

c) Todas estas especies fermentan la glucosa, la galactosa y la lactosa. Los otros azúcares fermentados se designan mediante una cifra: 1, maltosa; 2, salicina; 3, sacarosa; 4, trealosa; 5, melibiosa; 6, amigdalina; 7, celobiosa; 8, rafinosa; 9, manitol; 0, sorbitol. Las cifras entre paréntesis indican un resultado variable según las cepas.

Fuente: Alais C., 1986.

2.3 PROBIÓTICOS

2.3.1. ANTECEDENTES

Las leches fermentadas (LF) se han consumido por la provisión de una amplia gamma de beneficios a la salud; relacionando los productos con un sabor agradable ligeramente ácido, y con su periodo de conservación en comparación con el de la leche. En las décadas recientes se ha puesto mayor interés en los efectos benéficos potenciales de las LF, incrementando su variedad de presentaciones y de la cantidad que se consume alrededor del mundo que fue de 41 millones de unidades diarias de productos frescos Danone en el mundo para el año de 1997 (Saloff C. J. - Coste, 1997c).

2.3.2. DEFINICIÓN

Un probiótico se define como un suplemento alimenticio microbiano vivo que afecta benéficamente al hospedero, mejorando su balance en la flora intestinal; (Urbina E. C., 2004) otra definición sería: "los probióticos corresponden a una preparación de un producto que contiene microorganismos viables en suficiente número, los cuales alteran la microflora (por implantación o colonización) en un compartimiento del huésped provocando efectos beneficiosos sobre la salud del mismo. Esta definición hace hincapié en la presencia de microorganismos viables, en número suficiente para provocar los efectos beneficiosos sobre la salud, a través de una alteración positiva de la microflora por colonización del intestino" (Reboloso, 2002).

Un producto probiótico debe tener al final una cuenta microbiana mínima viable de 10 millones de bacterias/gramo (González U. M., 2004). El rango que se utiliza en la industria ha sido de 10^5 a 10^{12} células/g (100,000 a 1, 000, 000, 000,000). Se requiere de un considerable número de bacterias porque alrededor del 90 % de ellas son eliminadas por el ácido del estómago (donde el

pH está entre 1 – 2). El alimento en el estómago ayuda a la protección de los microorganismos, por lo tanto se debe ingerir probióticos a la hora de comer (CRDC, 2001).

Cuadro 10. Propiedades ideales para la utilización de cepas en productos probióticos.

Propiedades	Objetivo y método
Especificidad de las cepas	Fuente u origen debe ser revelado
Resistencia al pH	Resistentes a los efectos del ácido gástrico y biliar
Adhesión y colonización	Varias cepas modelo han sido utilizados por su adhesión (e. g. cultivos celulares, moco, segmentos intestinales). Colonización en estudios humanos
Exclusión competitiva	Cepas modelo con adhesión y exclusión competitiva de patógenos “ <i>in vitro</i> ” e “ <i>in vivo</i> ”
Regulación inmune	“ <i>in vitro</i> ” en estudios con humanos
Seguridad	Garantizada mediante estricta inspección antes y después de la comercialización
Propiedades tecnológicas	Sistemas para el mantenimiento de la estabilidad y actividad dentro y fuera del proceso de producción.
Evaluación sensorial	Examen sensorial del producto y productos finales
Aceptación por el consumidor	Estudios al consumidor con las formulas de los productos
Evaluar la eficiencia	Intervenir con estudios clínicos humanos con las fórmulas finales; al menos dos estudios independientes para mostrar la eficiencia en la población y la seguridad en todos los grupos de consumidores.

Fuente: Saarela M. y col., 2002.

2.2.4. BACTERIAS CONSIDERADAS COMO PROBIÓTICOS: Bifidobacterias, *L. acidophilus*, *Lc. lactis*

En todo el mundo existen más de 400 tipos de leches fermentadas, en nuestro país se fabrican industrialmente yogurt, yakult consumido hasta en 120 mil litros diarios y otros productos similares, jocoque (Buttermilk) y jocoque árabe o labne, leches fermentadas con búlgaros (Kefir); siendo el yogurt el más importante , ya su consumo se estima hasta en 160 mil ton anuales. Todos los productos anteriores han sido utilizados como vehículos para las bacterias con características probióticas pero solo algunas especies como las bifidobacterias, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp.* y *L. acidophilus* han sido utilizadas ampliamente para su adición como probióticos en Europa en un yogurt nombrado “Yogurt AB”. En el caso de *Lactococcus (Lc) lactis* subsp *lactis* y *Lc. lactis* subsp *cremoris* han sido utilizadas en la elaboración de jocoque a nivel industrial las cuáles estas últimas no han sido estudiadas en cuanto a su potencial como probiótico excepto a la insinuación por la producción de polisacáridos extracelulares que podrían tener algún efecto (García – Garibay M., 2004), además en la fabricación de quesos se ha utilizado el género *Lc* en cultivos iniciadores junto con cepas del género *Leuconostoc (Ln). mesenteroides* subsp. *cremoris* y *Ln. lactis* el cual estimula el crecimiento de estas últimas por su actividad proteolítica (Menéndez S. y Rodríguez – Otero J. L., 2004).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) pertenecientes a la familia de las Lactobacteriaceae caracterizadas en su mayoría por su alta producción de ácido láctico incluyen las cepas con propiedades benéficas como las bifidobacterias y lactobacilos, las cuales están también entre los microorganismos predominantes en niños saludables se les puede encontrar en diversos “hábitat” aparte de los productos lácteos se les puede encontrar en los productos vegetales: ensilados, granos, jugos y mostos en

fermentación, etc. Se encuentran presentes en el aparato digestivo del hombre y de los animales, y en las cavidades naturales (boca y vagina).

Bifidobacterias

Bacteria ácido láctica heterofermentativa, anaerobia estricta, situada en el género *Lactobacillus*. Fermenta las pentosas; productora de al menos un 50 % de ácido láctico, más otros compuestos tales como el ácido acético, CO₂ y etanol. Estas favorecen la producción de vitaminas del complejo B y ácido fólico, inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos y reduce los niveles de colesterol (Moreno M. R. y col., 2004).

Lactobacillus acidophilus

Algunos de los beneficios documentados por la ingesta de esta bacteria son la disminución del colesterol, la prevención de infecciones intestinales, y la reducción en el riesgo de cáncer de colon, puede inhibir el crecimiento de *Helicobacter pylori* relacionado con el desarrollo de la úlcera péptica (Saloff C. J. - Coste, 1997a).

Lactococcus lactis subsp lactis

Tiene una actividad antagónica al producir una bacteriocina (péptido biológicamente activo): la nisina, usada en la industria alimenticia como conservador biológico (acción bactericida) que por ser proteína al biodegradarse no produce compuestos secundarios.

El complejo modo de acción de las bacteriocinas sugieren que los péptidos se unen a la membrana citoplasmática a través de uniones electrostáticas con los fosfolípidos cargados negativamente, luego se insertan a la membrana con una reorientación que depende del potencial de la membrana,

influenciado por el pH y la composición fosfolipídica, consecuentemente, forman agregados proteicos que resultan en la formación del poro con la consecuente salida de iones (principalmente: K y Mg), pérdida de la fuerza motriz de protones (“FMP”, esenciales en la formación de ATP, transporte activo y movimiento bacteriano), salida de ATP y aminoácidos. Por lo tanto se inhibe la síntesis de macromoléculas y la producción de energía, dando como resultado la muerte celular.

Sin embargo, la nisina (péptido de 34 aminoácidos de peso molecular menor a 5 kDa) que descrita en 1928 es la mejor caracterizada y utilizada como conservador en productos lácteos, reconocida por la FDA como Generalmente Reconocida como Segura (GRAS por sus siglas en inglés), que previene la descomposición ocasionada por bacterias Gram (+), especialmente de los géneros Clostridium, Staphylococcus, Bacillus y Listeria; no requiere de un receptor unido a la membrana de la célula blanco para la formación de poros y la disipación de la FMP como la mayoría de las bacteriocinas ya que ésta reconoce la composición fosfolipídica de la célula (González M. B. E., 2003).

Cuadro 11. Lista parcial de cepas probióticas caracterizadas

Nombre y clave de la cepa	Industria proveedora
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM®	Rhodia Inc. (Madison)
<i>L. acidophilus</i> DDS	1 Nebraska Cultures, Inc. (Lincoln, Neb.)
<i>L. acidophilus</i> SBT	2062a Snow Brand Milk Products Co., Ltd. (Tokyo, Japan)
<i>L. acidophilus</i> LA LA-5	1 Chr. Hansen, Inc. (Milwaukee, Wis.) vendida en Europa
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Yakult (Tokyo Japan)
<i>L. casei</i> Immunitas	Danone (Paris France)
<i>Lactobacillus fermentum</i> RC	14 Urex Biotech (London, Ontario, Canada)
<i>Lactobacillus johnsonii</i> La1 (también como Lj1)	Nestlé (Lausanne Switzerland)
<i>Lactobacillus paracasei</i> CRL 431	Chr. Hansen Inc. (Milwaukee)
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299V	Probi AB (Lund Sweden)
<i>Lactobacillus reuteri</i> SD2112 (same as MM2)	Biogaia (Raleigh N.C.)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GGa	Valio Dairy (Helsinki Finland)
<i>L. rhamnosus</i> GR	1 Urex Biotech (London, Ontario, Canada)
<i>L. rhamnosus</i> 271	Probi AB (Lund Sweden)
<i>L. rhamnosus</i> LB21	Essum AB (Umeå Sweden)
<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118	University College (Cork Ireland)
<i>Lactobacillus lactis</i> L1A	Essum AB (Umeå Sweden)
<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb	12 Chr. Hansen, Inc. (Milwaukee, Wis.)
<i>Bifidobacterium longum</i> BB536 ^a	Morinaga Milk Industry Co., Ltd. (Zama City, Japan)
<i>B. longum</i> SBT-2928 ^a	Snow Brand Milk Products Co., Ltd. (Tokyo, Japan)
<i>Bifidobacterium breve</i> cepa de Yakult	Yakult (Tokyo Japan)

^a Cepas que han tenido utilización en alimentos por su categoría de saludables en Japón
Fuente: Sanders, M. E., 1999.

2.4 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS BACTERIAS PROBIÓTICAS Y SUS EFECTOS EN LA SALUD

Dadas las diversas funciones y las complejas actividades intrínsecas de la microflora intestinal, podría concluirse que la ingestión de grandes cantidades de bacterias vivas a través del consumo de las leches fermentadas, llevaría a ejercer cierto efecto en la composición o la actividad de la microflora y, por lo tanto, en la salud del huésped (Saloff C. J. - Coste, 1997a).

Las bacterias endógenas podrían estar agrupadas tanto como patógenos potenciales o como promotoras de la salud. Las cepas con propiedades benéficas incluyen entre otras las bifidobacterias y lactobacilos, los cuales se encuentran predominando en la microflora de niños sanos.

La normalización de especies específicas saludables de la microflora endógena del tracto intestinal forma las bases de la terapia con probióticos. La introducción oral de probióticos puede afectar y reducir la alta permeabilidad anormal del intestino y alterar la microecología, mejorando las funciones de la barrera inmunológica intestinal y aliviando la respuesta inflamatoria intestinal.

La respuesta del sistema inmunológico específica ha sido medida mediante la secreción de inmunoglobulina en la sangre, la concentración de linfocitos B y T, y algunas citoquinas (ACTIMEL, 2004).

Aunque los mecanismos de acción de los probióticos en la prevención de alergias está únicamente iniciando a relucir, los efectos son probablemente mediante la adhesión a la mucosa intestinal a su superficie y la generación de citoquinas anti inflamatorias, estas podría ser la hipótesis para la prevención temprana de enfermedades atópicas en niños, que podría reducir el riesgo de desarrollo de alergias alimentarias y asma. Evidentemente que los probióticos pueden reducir los síntomas de alergias en existencia de enfermedades atópicas también acumulado por cepas específicas y sus usos en la infancia temprana (Saarela M. y col., 2002).

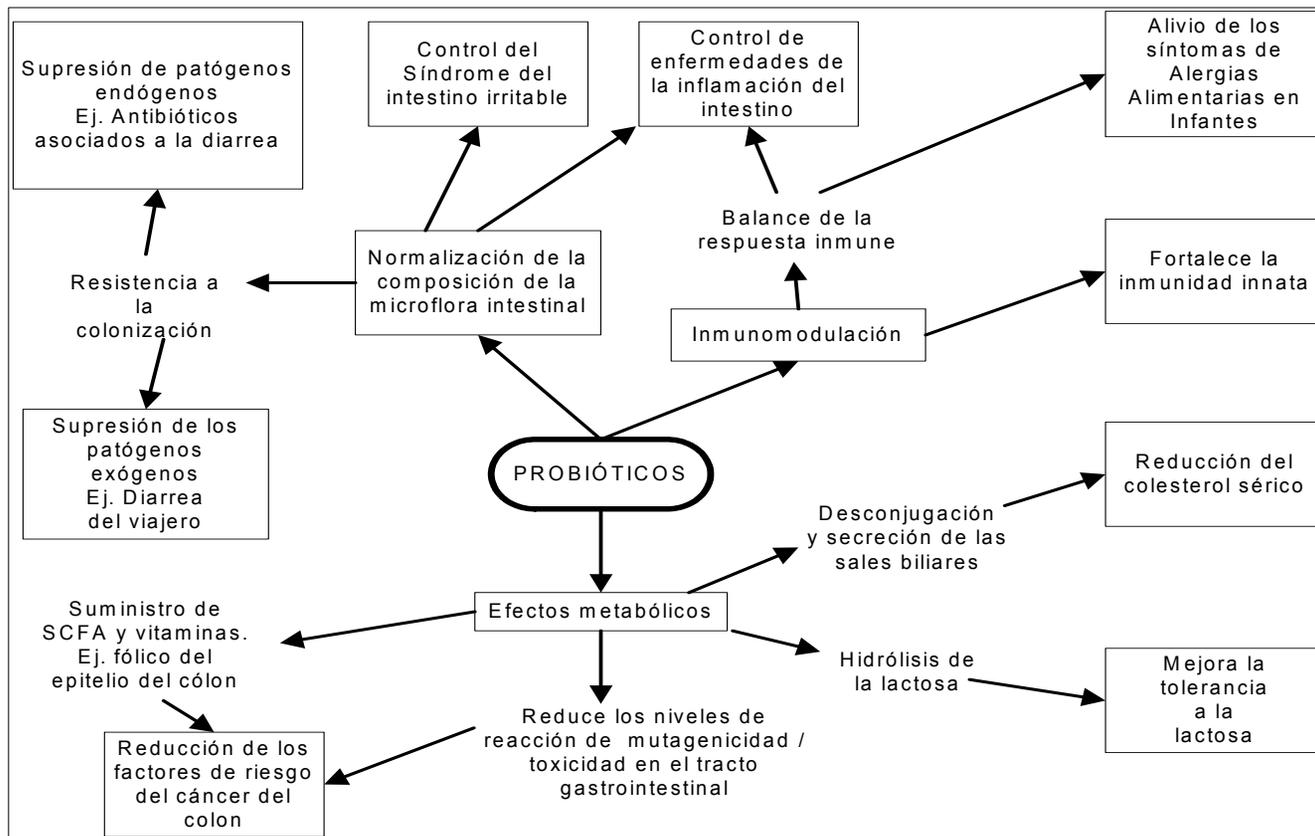


Figura 3. Beneficios en la salud por el consumo de productos probióticos.

Fuente: Saarela M. y col., 2002

**Cuadro 12. Efectos potenciales en la salud, establecidos
por las bacterias probióticas**

Beneficio a la salud	Mecanismo Postulado
Ayuda a la digestión de la lactosa	Bacterias productoras de lactasa (β - D - galactosidasa) que hidroliza la lactosa
Resistencia a patógenos entéricos	Resistencia a la colonización Alteración de las condiciones intestinales haciéndolo menos favorable para los patógenos Reducción de pH por el ácido láctico y por la producción de cadenas cortas de ácidos grasos (acetato, butirato, propionato) son muy tóxicos para los microorganismos porque atraviesan la membrana bacteriana en la forma no ionizada y se acumulan en la forma ionizada en el interior Alteración de toxinas uniendo sitios Influencia sobre las poblaciones de la flora intestinal Adherencia a la mucosa intestinal, interfiriendo con la adherencia patógena Aumenta la regulación de la producción de la mucina intestinal, interfiriendo con los patógenos Plegando las células epiteliales
Efecto anticancerígeno del colon	Bloqueo mutagénico Desactivación carcinogénica Inhibición de la producción de enzimas carcinógenas de los microbios del colon Respuesta inmunológica Influencia secundaria en la concentración de las sales biliares
Sobre crecimiento de la microflora del intestino delgado	Influencia en la actividad de sobre población de la flora, reduciendo toxinas Incremento en la producción de metabolitos (peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas). Alteración de las condiciones intestinales haciéndolos menos favorables para las actividades de las poblaciones microbianas
Modulación del sistema inmune	Fortaleciendo la defensa específica contra infecciones y tumores. Potenciando el efecto en los antígenos específicos del sistema inmune Realiza la secreción de la IgA
Alergias	Prevención de la translocación del antígeno dentro del torrente sanguíneo
Lípidos en la sangre, enfermedades del corazón	Asimilación del colesterol dentro de las células bacterianas Incremento de la excreción de sales biliares debido a la desconjugación por la hidrólisis de la sal biliar Efecto antioxidativo
Efecto antihipertensivo	Acción de la peptidasa sobre las proteínas de la proporcionando tripeptidos los cuáles inhiben la angiotensión 1 convirtiéndolos en enzimas Los componentes de la pared celular actúa como angiotensor (vasoconstrictor) convirtiéndolos en enzimas inhibitorias
Infecciones urogenitales	Adhesión al tracto de las células urinarias y vaginales Resistencia a la colonización Producción del Inhibidor (H_2O_2 , biosurfactantes)
Infección causada por <i>Elicobacter pylori</i>	Producción de inhibidores del <i>H. pylori</i> (ácido láctico y otros)
Encefalopatía hepática	Inhibidor de la ureasa - producida por la flora intestinal

Fuente: Sanders, M. E., 1999.

2.4.1. MANIPULACIÓN DEL DESARROLLO DE LA MICROFLORA INTESTINAL

La manipulación del desarrollo de la microflora se puede conseguir controlando los factores externos que tienen un efecto directo sobre la composición característica de la microflora tal como la dieta y medicamento. La adición de oligosacáridos a las formulas infantiles, las cuales tienen como propósito promover el incremento de bifidobacteria en el colon y una reducción en el pH fecal, es un ejemplo. Sin embargo, en ausencia de cualquiera de estos factores, el patrón general de la microflora en cualquier individuo tiende a permanecer medianamente constante, y los individuos tienden a mostrar un patrón característico.

El cambio en la dieta es uno de las formas de cambiar la microflora. Mientras que los prebióticos pueden tener un efecto indirecto al proveer sustancias preferidas para especies bacteriales endógenas particulares, los probióticos pueden alterar la flora del colon tanto directa como indirectamente, ya sea produciendo organismos nuevos, activos y viables dentro del lumen y /o indirectamente al introducir cambios en la flora intestinal (ACTIMEL, 2004).

Numerosos factores influyen la estabilidad o cambios en la microflora. Esto incluye al pH intestinal, la interacción de la microflora, la temperatura del medio, factores psicológicos, peristaltismo, ácidos biliares, secreciones, sistema inmune y tratamientos con medicamentos (Mackie R. I., 1999).

2.5 EVOLUCIÓN DE LA MICROFLORA INTESTINAL HUMANA

2.5.1. DESARROLLO DE LA ECOLOGÍA MICROBIANA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DEL RECIÉN NACIDO

La microflora del intestino materno es una fuente para la colonización del intestino del recién nacido (antes estéril) este comienza inmediatamente después del nacimiento adquiriendo un balance semejante entre bacterias aeróbicas y anaeróbicas proceso facilitado por el contacto con el entorno estableciéndose aquellas bacterias apropiadas para el niño, compuesta primordialmente por enterococos, *E. coli* no patógena, bifidobacterias y bacteroides (ACTIMEL, 2004).

El contenido gástrico después de 5 – 10 min de vida de un bebé recién nacido es similar al cervix de sus madres. También, inmediatamente después de nacer, la nasofaringe del 62% de los bebés contienen bacterias que coinciden con las de la vagina de las madres inmediatamente después del parto (Mackie R. I., 1999).

Después del parto, el bebé sigue continuamente exponiéndose a los nuevos microbios que entran al tracto gastrointestinal con los alimentos. Esto inicia con la leche materna, la cual contiene $> 10^9$ microbios / L en madres saludables. Los grupos bacterianos que más frecuentemente se encuentran incluyen a los estafilococos, estreptococos, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, micrococos, *Propionibacterium* y bifidobacterias.

El factor bifidus (oligosacárido) suministrado por la leche de la mujer propicia el crecimiento del *Lactobacillus bifidus* en el intestino del bebé, el cuál produce grandes cantidades de ácido láctico a partir de lactosa, con el consecuente aumento de la acidez; en estas condiciones de pH, se inhibe el desarrollo de microorganismos patógenos que pueden afectar seriamente al

infante; este bacilo desaparece al cabo de algunos meses y es remplazado por el *L. acidophilus* (Badui S. D. 1999).

Las bifidobacterias están entre las bacterias predominantes en la flora intestinal desde la temprana infancia hasta la vejez. Sin embargo, el número de bifidobacterias disminuye al paso de los años y la composición de las especies/cepas cambia desde la infancia a adulto y vejez (Saarela M., 2002).

Después de unos pocos días después del nacimiento, coliformes y streptococos dominan la microflora presente. Las bacterias anaerobias estrictas aparecen un poco tiempo después. Clostridios y lactobacilos podrían también estar presentes en ciertos puntos dentro de un periodo corto de tiempo. El exterior y otros factores importantes controlan cuáles de las bacterias ingeridas podrán establecerse y cuál será el orden de sucesión de las cepas colonizadoras (Mackie R. I., 1999).

Cuadro 13. Comparación de bacterias encontradas en el interior del genital de una mujer embarazada, heces de recién nacidos, niños y adultos.¹

Grupo Bacteriano	Interior del genital de una mujer embarazada ²	Heces ³		
		Recién nacido	Infante	Adulto
Aerobios facultativos				
Bacilli	Moderado	Bajo	Bajo	Bajo
Corynebacterias	Moderado	Bajo	Bajo	Bajo
Enterobacterias	Bajo	Moderado	Moderado	Moderado
Enterococos	Bajo	Moderado	Moderado	Moderado
Lactobacilos	Moderado	Bajo	Moderado	Moderado
Micrococos	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
Propionibacteria	Moderado	Moderado	Moderado	Moderado
Estafilococos	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
Estreptococos	Moderado	Moderado	Moderado	Moderado
Rango (Log₁₀ UFC)	7.7 – 8.6	8.2 – 9.1	9.8 – 11.3	6.9 – 8.8
Anaerobios				
Bacteroides	Moderado	Alto	Alto	Alto
Bifidobacterias	Moderado	Alto	Alto	Alto
Clostridias	Bajo	Bajo	Moderado	Moderado
Eubacterias	Moderado	Moderado	Alto	Alto
Fusobacterias	Moderado	Moderado	Alto	Alto
Peptostreptococos	Moderado	Moderado	Alto	Alto
Ruminococos	Moderado	Bajo	Moderado	Moderado
Veillonellas	Moderado	Moderado	Moderado	Moderado
Rango(Log₁₀ (UFC)	8.3 -8.8	7.8 – 9.3	9.8 – 11.3	10.5 – 11.5

¹ Conteo viable resumido: **alto** ($\geq \text{Log } 10^9 \text{ UFC}$), **moderado** ($\text{Log } 10^{6-8}$) y **bajo** ($\leq \text{Log } 10^5 \text{ UFC}$).

² Números reportados como $\text{Log } 10 \text{ UFC/ml}$ ó gr de secreción.

³ Números reportados como $\text{Log } 10 \text{ UFC/gr}$ de heces (h/h)

Fuente: Mackie R. I., 1999.

2.5.2. COMPOSICIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LA FLORA INTESTINAL EN EL ADULTO

El tracto gastrointestinal de los humanos adultos contiene más de 400 especies diferentes de bacterias. Llegando a ser el peso total de microflora en el tracto humano hasta de 1 Kg (Pierre y Corbett, 2004).

La mayor concentración de microorganismos y actividad metabólica puede encontrarse en el intestino grueso. En el tracto superior (estómago, duodeno y yeyuno) hay un esparcimiento de microflora $> 10^5$ UFC/ml de contenido. Para el íleon la concentración bacteriana gradualmente incrementa encontrándose 10^{10} a 10^{11} UFC/g en el colon. También se encontró que las bacterias dominantes numéricamente, en heces, fueron los Bacteroides y los grupos Clostridium coccoides – Eubacterium rectal (representando cerca del 50 % de las comunidad bacteriana).

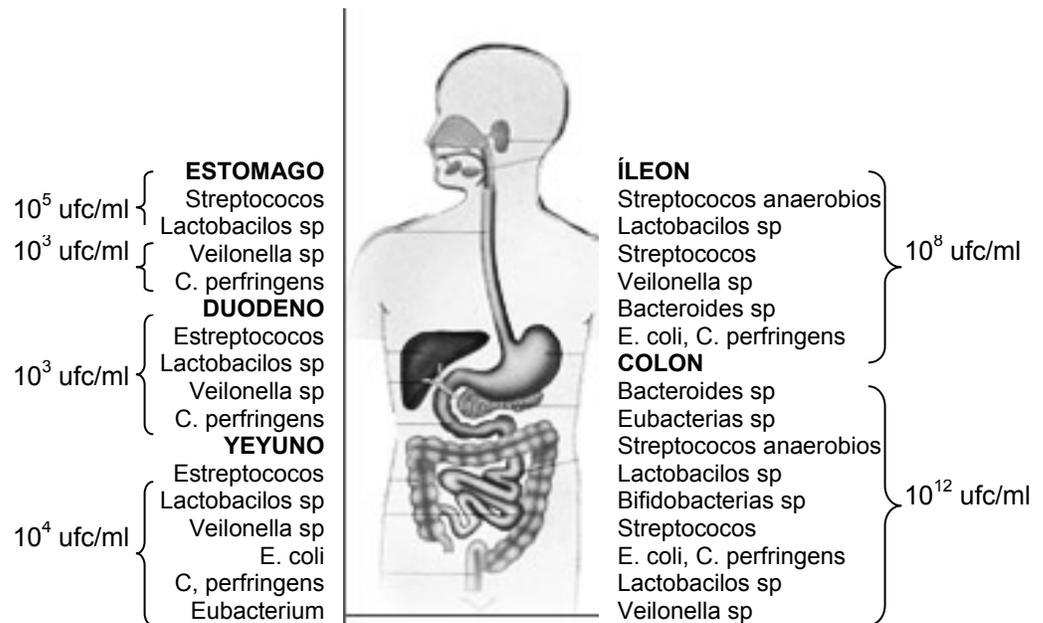


Figura 4. Variación de las poblaciones y especies bacterianas a lo largo del tracto gastrointestinal (GI) humano en adultos en condiciones de no ayuno.

Fuente: Adaptación de ACTIMEL, 2004.

Mientras uno se aproxima al intestino delgado inferior, se incrementa el número de bacterias, tanto Gram (+) como Gram (-), anaerobias estrictas o no. En el ileon distal predominan los anaerobios Gram (-), y cruzando hacia el colon el número y variedad de anaerobios estrictos se incrementa dramáticamente ya que es un medio muy poblado hasta 10^{11} UFC/g de heces fecales frescas.

Existen diferencias entre las diferentes secciones del colon, ya que el colon proximal tiene acceso a mayor cantidad de nutrientes y, por lo tanto, es metabólicamente más activo que el colon distal.

Los cambios en cuanto a la composición y el funcionamiento de la microflora pueden ocurrir con el paso de los años, pero este concepto es especulativo. De acuerdo a estudios anteriores, un pequeño descenso en la *Bífidobacteria*, y un incremento de *Clostridios*, *Lactobacilos*, *Streptococci* y *Enterobacteriaceae* parecen asociadas al paso de los años. En otro análisis de la población de Abkhasia, personas muy ancianas (por encima de los 90 años de edad) tenían niveles altos de Lactobacilos y Bífido- bacterias $> 10^8$ (ACTIMEL, 2004).

A pesar de que los humanos tienen un patrón de composición general común, todos los individuos tienen su propia microflora característica. Las bacterias que se presentan en mayor cantidad se conocen como dominantes, en concentraciones de 10^8 - 10^{11} /g, mientras que aquellas consideradas subdominantes están presentes en concentraciones de 10^6 - 10^8 bacterias/g (Saloff C. J. - Coste, 1997b).

2.6 BACTERIAS ENTÉRICAS

2.6.1. GENERALIDADES

Enterobacterias, nombre común de la familia *Enterobacteriaceae* que son organismos ubicuos de distribución mundial, se encuentran en el suelo, agua, vegetación y formando parte de la microbiota normal del intestino de casi todos los animales incluyendo al humano al que puede causar enfermedad (ENCARTA, 2004).

Poseen un metabolismo anaeróbico facultativo con requerimientos nutricionales muy sencillos. El *Bergey's manual* las coloca dentro de las gamma Proteobacterias.

Pertenecen a distintos géneros y están caracterizadas por ser bacilos rectos, móviles por flagelos peritricos, o inmóviles, capsulados o no; gram negativos de crecimiento fácil en los medios comunes de laboratorio, con producción de nitritos a partir de nitratos, indofenoloxidasa negativos, las especies que poseen flagelos son móviles y el resto son inmóviles.

Se han descrito al menos 27 géneros y 7 grupos entéricos con más de 110 especies. Estos géneros se han clasificado en función de la homología del ADN, propiedades bioquímicas, reacciones serológicas, susceptibilidad a bacteriófagos específicos y patrones de sensibilidad a los antibióticos.

La capacidad para fermentar la lactosa y el tiempo empleado en hacerlo sirven para diferenciar los géneros. Los que no realizan la fermentación son patógenos, los fermentadores son saprofitos (ENCARTA, 2004).

Tienen la facultad de desarrollarse a muy diferentes temperaturas (algunas especies se desarrollan de 10 ° - 40 ° C y *Escherichia coli* puede

crecer hasta a 44 ° C), y por su resistencia a los antibióticos que se encuentran ocasionalmente en la leche (Alais C., 1986).

Se dividen en base a ciertas características metabólicas y contenido de guanina y citosina, en cinco grupos primarios o tribus y doce géneros, como se muestra enseguida:

Cuadro 14. Características de la familia Enterobacteriaceae

Tribus	Género	Especies
Escherichiae	Escherichia	<i>coli</i>
	Edwardsiella	<i>tarda</i>
	Citrobacter	<i>freundii</i> <i>intermedius</i>
	Salmonella	<i>typhi</i> <i>paratyphi (A)</i> <i>schottmuelleri (B)</i> <i>hirshfeldii (C)</i> <i>cholerae – suis</i> <i>Typhamurium</i> <i>Arizonae</i> <i>Enteritidis, etc.</i>
	Shigella	<i>dysenteriae</i> <i>flexneri</i> <i>sonnei</i> <i>boydii</i>
Klebsielleae	Klebsiella	<i>pneumoniae</i> <i>ozaenae</i> <i>rhinoscleromatis</i>
	Enterobacter	<i>aerogenes</i> <i>cloacae</i>
	Hafnia	<i>alvei</i>
	Serratia	<i>marcescens</i>
Proteae	Proteus	<i>vulgaris</i> <i>mirabilis</i> <i>morganii</i> <i>rettgeri</i> <i>inconstans</i>
Yersinieae	Yersinia	<i>pestis</i> <i>pseudotuberculosis</i> <i>enterocolitica</i>
Erwinieae	Erwinia	<i>amylobora, etc.</i>

Fuente: Divo A., 1983.

Cuadro 15. Características metabólicas de la familia Enterobacteriaceae

	Producción 1			Enzimas			Gelatina 7	Poder Patógeno 8
	Indol 2	Acetoína 3	H ₂ S 4	Ureasa	Desaminasa 5	Decarboxilasa 6		
1) Fermentan activamente la lactosa:								
- <i>Escherichia</i>	+					+/-		+/- (M)
- <i>Cloaca</i>		+				+/-		
- <i>Klebsiella</i>		+		+		+/-		+/(M/F)
2) Fermentan lentamente la lactosa:								
- <i>Citrobacter</i>			+					
- <i>Arizona</i>			+			+	+	+(M)
3) No utilizan la lactosa:								
- <i>Salmonella</i>			+			+		+(F)
- <i>Shigella</i>						+		+(F)
- <i>Serratia</i>	+/-	+				+	+	
- <i>Hafnia</i>		+/-				+		+(M)
- <i>Proteus</i>	+		+/-	+	+		+/-	?
- <i>Providencia</i>	+				+			+(M)

1. Todas las especies producen gas a partir de la glucosa, a excepción de las *Shigella* y algunas especies de *Serratia* y *Providencia*.
2. Por descomposición de triptófano.
3. Reacción de Vosges – Proskauer positiva.
4. H₂S procedente de la cistina.
5. Especialmente de la fenilalanina, con producción de ácidos cetónicos.
6. Decarboxilasas de los aminoácidos básicos, con producción de diaminas tóxicas.
7. Licuefacción.

M: Bacterias moderadamente patógenas.

F: Bacterias fuertemente patógenas.

+/-: Característica variable según las cepas (para mayor claridad del cuadro, solamente se indican las positivas y variables; en ausencia de signo, la característica es negativa). NOTA: Todas las especies son móviles (peritricas), con excepción de las *Shigella* y *Klebsiella*.

Fuente: Alais C., 1986.

2.6.2 GÉNEROS DE ENTEROBACTERIAS IMPORTANTES

GÉNERO ESCHERICHIA

Escherichia coli

Bacilos de 1 a 3 μ X 0.5 μ , que se presentan solos, o en pares, en cadenas cortas, agrupados; en general móviles por flagelos peritricos aunque existen variantes inmóviles no flageladas, no forman esporas, generalmente no capsulados y gram negativos.

Es aerobio y anaerobio facultativo, temperatura óptima de crecimiento es de 37 ° C, tiene propiedad de desarrollar un límite bastante amplio de temperatura y el pH favorable es de 7.0. Algunas cepas son productoras de hemolisina y otras de pigmento, no licua la gelatina.

Es relativamente resistente permaneciendo vivo durante algún tiempo fuera del organismo, en especial en condiciones húmedas y en aguas contaminadas. Es destruido por el calor a 60 ° C durante una hora. Los antisépticos lo destruyen con relativa facilidad y su serología es bastante heterogénea.

Este bacilo es habitante normal del intestino del hombre donde ayuda al desdoblamiento de los carbohidratos y combate la implantación de bacterias de la putrefacción, Una comparación entre la E. coli cepa Nissle del año de 1917 no patogénica y mesalazina (un aminosalicilato) en el tratamiento contra la colitis ulcerativa, demostró que en 120 pacientes afectados que recibieron una de las dosis por 12 semanas existe un mejoramiento equitativo con los dos tratamientos durante el periodo de estudio, este y otros estudios similares demuestran la eficacia de tratamientos alternativos con esta cepa (Saarela M., 2002).

Escherichia coli es capaz de desempeñar un papel patógeno en el intestino o fuera de él. En el primer caso, en adultos y niños ocasiona enteritis aguda benigna y, a veces diarreas de tipo disenteriforme.

Los mecanismos de patogenicidad de ciertos serotipos de Escherichia coli relacionados con procesos diarreicos (Giono C. S., 1994) son: a) adherencia b) producción de proteínas bacterianas (toxinas), c) Invasión y reproducción bacteriana dentro del citoplasma de las células epiteliales del intestino (permitiendo a las bacterias evadir los mecanismos de protección del hospedero una vez que se encuentran en el interior de la célula).

El origen de estas afecciones es generalmente endógena y no exógena, la salida del germen del canal intestinal y su paso a la circulación se debe a lesiones en las paredes del intestino, al aumento apreciable de la virulencia del germen o a la baja resistencia del organismo atacado, especialmente en la infancia y la vejez.

Cuadro 16. Clasificación de las cepas de Escherichia coli asociadas con procesos diarreicos

Grupo	Síndromes clínicos	Síndromes epidemiológicos	Serogrupos "O" más comunes	Asociación con enterocitos	Toxinas elaboradas	Fisiopatología	DNA asociado
Enterotoxigénico (ETEC)	Diarrea acuosa	Diarrea en niños en países en desarrollo. Diarrea del viajero (adultos).	8, 15, 20, 25, 27, 63, 78, 80, 85, 115, 128, 148, 159	Se adhiere por medio de fimbrias CFAI, CFAll	Termolábil (LT) ↑ Adenosina-5'-(AMPc) y/o termoestable (ST) ↑ Guanosina-5'-monofosfato cíclico (GMPc)	↑ secreción de H ₂ O y electrolitos por las células de las criptas intestinales → ↓ abs. de las vellosidades	30 – 75 mDa (plásmido)
Enteroinvasiva (EIEC)	Diarrea con moco y sangre (disentería)	Afecta adultos principalmente, a veces brotes por alimentos contaminados	28, 112, 124, 136, 143, 144, 147, 152, 164	Invade y se multiplica en enterocitos; inflamación por PMN (polimorfonucleares) y macrófagos		Afecta el borde de cepillo del enterocito. Ya libre en el citoplasma, se multiplica e invade a las células vecinas	120 - 140 mDa (plásmido)
Enterohemorrágica (EHEC)	Diarrea aguda y crónica en niños	Brotos de alimentos contaminados	157	Se adhiere al enterocito por fimbrias	Citotoxinas Shiga - like I y II (STX I y II)	A nivel de la síntesis de proteínas, lisis celular	Fagos lisogénicos
Enteropatógena (EPEC)	Diarrea aguda y crónica en niños	Brotos de diarrea en guarderías, diarrea epidémica y esporádica en comunidades, es rara en adultos	26, 55, 86, 111, 114, 119, 125, 126, 127, 128, 142	Se adhiere íntimamente a enterocitos por pilus BFP (bundle-forming Pilus) "factor de virulencia",		Polimerización de la actina del citoesqueleto "esfacelación", → destrucción de microvellosidades ? Los cambios bioquímicos relacionados ↑ secreción de H ₂ O y electrolitos del espacio intraluminal	55 – 60 mDa
Enteroagregativa (EAEC)	-	-	-	?	Toxina ST de E. coli enteroagregativa (EAST 1)	Acortamiento de las vellosidades, hemorragia, ulceración y necrosis en asa ligada de rata,	2 proteínas de ↑ p.m. 1 codificada por un plásmido (Pet) y 2 codificada en el genoma con actividad de proteasa (Pic)

* Un sexto grupo no esclarecido: E. coli de adherencia difusa (DAEC)

Fuente: Adaptado de: GIONO C. S., 1994 y CORTEZ, O. L. A., 2002.

Las afecciones causadas van seguidas de un estado inmunitario general, pero los anticuerpos resultantes no alcanzan el intestino ni el aparato urinario donde el germen puede prosperar sin ningún obstáculo. En los recién nacidos los anticuerpos para este enterobacilo son bajos o nulos por haber un paso transplacentario muy limitado, lo que los hace susceptibles a numerosas afecciones por este microorganismo. En el adulto existen altas concentraciones de anticuerpos.

Escherichia fergusonii

Esta cepa perteneciente al grupo 10 de la familia Enterobacteriaceae fue una de las distinguidas bioquímicamente junto con la *Enterobacter taylorae* aisladas principalmente de heces de un espécimen clínico humano saludable por lo que se considera como flora normal del tracto gastrointestinal. *E. fergusonii* es (+) para indol, rojo de metilo, lisina descarboxilasa, orinitina descarboxilasa y motilidad; VP negativo, fermenta algunos de los azúcares y alcoholes polihidroxilados de uso en bacteriología entérica (Farmer J. J. III, 1985).

GÉNERO ENTEROBACTER

Está formado por organismos bacilares cortos, móviles o inmóviles, que deben su movilidad a flagelos peritricos, gram negativos, fermentadores de glucosa y lactosa.

Comprende dos especies *Enterobacter aerógenes* y *Enterobacter cloacae*, que se encuentran en las heces de hombre y animales, suelo, agua y productos lácteos. A veces se encuentran asociados con infecciones urinarias pero su importancia práctica se encuentra en la potabilidad del agua de consumo.

Por sus características similares a *Escherichia coli* y su presencia en el agua al realizarse un examen bacteriológico de las aguas destinadas al consumo es necesario precisar el caso de presencia de bacterias fermentadoras de la lactosa, si se trata del bacilo coli o de un enterobacter, ya que la presencia de este último no siempre indica contaminación fecal.

GÉNERO CITROBACTER

Integrado por gérmenes bacilares móviles, gram (-), con fermentación de la lactosa o sin ella a veces en un tiempo muy largo y utilizan el citrato como fuente única de carbono.

Contienen una gran variedad de antígenos O, K y H, y mantienen relación cruzada con otros géneros de enterobacterias. Se estiman como habitantes normales del intestino, encontrándose ocasionalmente en procesos sépticos e intoxicación de alimentos.

GÉNERO KLEBSIELLA

Comprende un determinado número de bacterias capsuladas fermentadoras de la lactosa, de forma bacilar corta, inmóviles, no formadoras de esporas y gram (-). Es abundante en la naturaleza. Los miembros de este género están biológicamente relacionados con gérmenes entéricos, pero su acción patógena natural los asemeja a los microorganismos causantes de afecciones respiratorias.

Klebsiella pneumoniae (bacilo de Friedländer, pneumobacilo). Bacilos cortos de 1 a 2 μ X 0.5 μ de grueso, de bordes redondeados que se presentan solos o en parejas son capsulados aun cuando provienen de cultivos, no esporulados, inmóviles y gram (-), con tendencia a la coloración bipolar. La

actividad bioquímica es de acción variable en los azúcares, indol y rojo de metilo negativo, VP variable y citrato positivo. Sus propiedades metabólicas lo sitúan como aerobio y anaerobio facultativo, sin embargo en la anaerobiosis estricta su crecimiento es pobre. Su temperatura óptima de desarrollo es a 37 ° C. Es resistente a los agentes exteriores durante algún tiempo pero es destruido por calor a 55 ° C/30 min.

La ocurrencia de diarrea después de un tratamiento con antibióticos ocurre en un 20 %, esto se da por la disminución de la microflora endógena y el desarrollo de microorganismos patógenos oportunistas como *Klebsiella oxitoca* y *Clostridium difficile* (Tuohy K. M., 2003).

GÉNERO KLUYVERA

Este género se redefinió en 1981 aunque en 1980 se había descrito un biotipo de enterobacteria intermedio entre *Citrobacter* y *Enterobacter*, el denominado “CDC grupo 8” que luego se clasificó dentro de aquel grupo bacteriano. Inicialmente se aislaban del medio ambiente y también de muestras clínicas donde en donde en éstas últimas se le atribuía un papel meramente colonizante, ha sido posteriormente cuando se han ido reseñando evidencias en cuadros clínicos en los que se atribuye un papel relevante como patógeno primario. El primer caso fue de colecistitis aguda y el segundo también colecistitis aguda efisematosa atribuida a *K. cryocrescens*. En la actualidad parece más claro que *Kuyvera* puede actuar en personas inmunocompetentes (Batista N. y col., 2004),

GÉNERO PSEUDOMONAS

Formado por células bacterianas delgadas de forma bacilar, móviles en su mayor parte por flagelos polares, no esporulados, gram (-) y de fácil desarrollo en los medios comunes de cultivo. El hombre puede ser infectado por

la especie *Pseudomonas aeruginosa*, la cual, es un patógeno oportunista por excelencia causante principal de las infecciones intrahospitalarias (Infecciones nosocomiales).

Pseudomonas aeruginosa, (bacilo piocianico, bacilo del pus azul). Bacilos de 1 a 2 μ X 0.3 μ , aparecen solos, en parejas o cadenas cortas. No forman esporas ni poseen cápsula, móviles por uno o tres flagelos polares, gram (-), presentan gránulos que se tiñen definitivamente con el método de Neisser. La actividad bioquímica acidifica solo la glucosa sin formación de gas, nitrito positivo, indol negativo, alcaliniza la leche tornasolada en la cual produce un coágulo blando seguido de peptonización rápida y reducción del indicador, H₂S variable. No descarboxila la ornitina ni la lisina, pero sí deshidroliza la arginina. Metabólicamente es aerobio, temperatura óptima 37 ° C, pH 6.8 a 7.2. licua rápidamente la gelatina, hemoliza la sangre y es oxidasa positivo. Ejerce acción bactericida sobre gérmenes gram (+) y (-) a través de sus pigmentos, siendo el más activo el amarillo, y el de la bacteriocina. Es algo menos sensible a los agentes químicos que otros organismos gram (-). Se destruye por calor a 55 ° C en una hora. Tan pronto disminuye la concentración de los antisépticos donde se guardan termómetros, sondas, etc., empieza a germinar con frecuencia insospechada. Este microorganismo fue tomado por mucho tiempo como saprófito apatógeno o parásito de escasa virulencia, ha sido observado como invasor secundario y comprobado en otros como responsable primario. En el aparato intestinal está asociado con la diarrea epidémica de los niños (de tipo disentérico) en cuyas heces es el bacilo predominante; en las vías urinarias es causa de infecciones cada vez más comunes en asociación con enterobacterias patógenas para este sistema. Puede asociarse con brotes de gastroenteritis en poblaciones rurales por escasa vigilancia sanitaria en poblaciones rurales por escasa vigilancia sanitaria en los depósitos de agua para consumo. Es muy abundante en la naturaleza, suelo y aguas estancadas, aguas cloacales, piel de personas y animales, conducto intestinal del hombre, etc. Su alta virulencia a pesar de su poco poder patógeno, tiene su origen en

sobre infecciones motivadas por destrucción del agente infectante primario por acción de agentes antimicrobianos y a los cuales *Ps. aeruginosa* no muestra ninguna sensibilidad.

GÉNERO SERRATIA

Serratia sp., las especies de este género se han aislado en casos de diarreas y afecciones urinarias humanas, es uno de los agentes causales de infecciones nosocomiales (intra – hospitalarias). Es un bacilo gram negativo, anaeróbico facultativo, oxidasa negativo, que crece abundantemente sobre agar sangre, agar chocolate y agar McConkey, produciendo colonias que pueden ser pigmentadas, especialmente *Serratia marcescens* y *Serratia rubias*, las cuales producen un pigmento rojo muy característico llamado prodigiosina (Henneberg W. 1971).

Serratia marcescens Abundante en la naturaleza, se ha encontrado en muestras de secreción bronquial, forma colonias lactosa negativo en el agar McConkey y puede ser B-hemolítica en el agar sangre.

La clasificación actual del género *Serratia*, nos habla de 8 especies: *Serratia entomophila*, *Serratia ficaria*, *Serratia fonticola*, grupo *Serratia liquefaciens* (*liquefaciens*, *proteamaculans* y *grimesii*), *Serratia marcescens* y *Serratia marcescens* biogrupo 1, *Serratia odorífero* biogrupos 1 y 2, *Serratiaplymuthica* y *Serratia rubidae*. (Duarte I., 2001)

GÉNERO SALMONELLA

La salmonelosis es una infección de importancia en salud pública debido al impacto socioeconómico que ocasiona tanto en los países en desarrollo como en los desarrollados. Es una enfermedad transmitida en forma indirecta cuando la materia fecal de los pacientes o de los portadores contaminan el agua potable o los alimentos los cuales estos últimos causan la mayor parte de los brotes que afectan a centenares de personas y, aunque puede ser causada

por cualquiera de los casi 2 500 serotipos que existen hasta hoy, los que se aíslan con mayor frecuencia en México son *Salmonella* enteritidis y *S. typhimurium* (Gutierrez – Cogco L. y col., 2000).

Es un bacilo gram (-), anaerobio facultativo, flagelos peritricos, con dimensiones de 2 a 3 μm de largo y 0.6 μm de diámetro. Produce abundante H_2S en agar TSI o en agar de Kligler, excepto los serotipos: *S. typha*, *S. choleraesuis*, *S. paratyphi A*, *S. sendai*, *S. abortusequi*, *S. gallinarum* y *S. berta*. Es positiva al MR y negativa al VP, no produce indol y el malonato solo es utilizado por algunos serotipos. Fermenta la glucosa, pero no la lactosa, es catalasa positiva y oxidasa negativo y reduce los nitratos a nitritos.

Las salmonelas sobreviven en la mayoría de los alimentos y generalmente se multiplican en ellos, pueden propagarse durante el transporte de animales infectados (agravándose la excreción con el estrés) y confinamiento en corrales antes del sacrificio, es común la contaminación fecal de la canal, la cual se propaga a todos los procedimientos afines, durante la elaboración, el almacenamiento y preparación final de alimentos puede haber contaminación cruzada de estos con productos crudos de origen animal.

Las salmonelas son relativamente resistentes a varios factores ambientales. Crece entre temperaturas entre 8 y 45 ° C, es sensible al calor y no sobrevive a temperaturas > 70 ° C. Son resistentes a la deshidratación por años, sobre todo en las heces, el polvo y otros materiales secos para consumo humano y animal. En años recientes se ha demostrado que basta una concentración de entre 3 a 10 células/g de alimento para causar enfermedad.

El mecanismo responsable de la secreción de líquidos no se ha establecido, la respuesta inflamatoria consecutiva a la invasión bacteriana se produce por la liberación de prostaglandinas que estimulan la producción de AMP cíclico que inhibe la absorción de Na y K y aumenta la secreción de Cl,

bicarbonato y agua. El desarrollo de lesiones en el epitelio intestinal se localiza en el íleon terminal y el colon.

En la fiebre tifoidea, los microorganismos atraviesan la pared del intestino delgado, donde son tomados rápidamente por los macrófagos en cuyo citoplasma no sólo sobreviven sino que también se multiplican. Los organismos son llevados por los macrófagos a los ganglios linfáticos mesentéricos donde continúan su proliferación, posteriormente se liberan en el conducto torácico y en el torrente sanguíneo. Luego son transportadas al sistema reticuloendotelial del hígado, bazo y médula ósea, continuando con su multiplicación intracelular. Cuando esta población intracelular alcanza una masa crítica, las bacterias invaden el torrente sanguíneo y es en esta segunda bacteriemia, que es breve, cuando se presentan los síntomas y signos de tifoidea y marca el fin del periodo de incubación. Afectando finalmente a la vesícula biliar, se localizan localmente y a partir de allí pasan a la luz intestinal de manera que en una etapa tardía de más de tres semanas son eliminadas en la materia fecal (Divo A., 1983).

GÉNERO SHIGELLA

Forma bacilar de 1 a 3 μ x 0.6 μ , se presentan solos y a veces en parejas inmóviles no capsulados, sin formación de esporas y gram (-), crecen bien en los medios comunes de laboratorio; no producen H₂S ni utilizan al citrato como fuente de carbono. De acción variable sobre los azúcares, pero sin producción de gas. Son aerobios y anaerobios facultativos, la temperatura óptima de crecimiento es de 37 ° C y el pH adecuado es de 7.6 – 7.8. Shigella (Sh), no forma catalasa ni el manitol que si lo hacen otras especies.

Son destruidos por el calor a 55 ° C/1h y por fenol 1/100 en 30 min. En las heces donde abundan otros microorganismos, mueren pronto; en cambio, conservados adecuadamente en solución tamponada glicerizada viven varios

días. En la tierra y no expuestos a la acción directa de la luz solar sobreviven hasta 12 días.

En general puede decirse que las shigelas poseen una proteína somática de acción enterotóxica, aunque de distinto grado de nocividad según la especie, y que solo *Sh. dysenteriae* produce una sustancia tóxica, no excretada por el germen, pero que se difunde por el medio de cultivo una vez que hay autólisis de la célula bacteriana, capaz de ocasionar lesiones nerviosas e intestinales; por ello se denomina neuroenterotoxina que es considerada como una exotoxina, es de naturaleza proteica, forma anticuerpos, es destruida por calor entre 60 °C a 100 °C. En el hombre provoca la disentería bacilar o shigelosis, afección intestinal caracterizada por evacuaciones diarreicas profusas mucosanguinolentas con pus, acompañadas de dolores abdominales y tenesmo. *Sh. flexneri* es causa del 80 % de los casos y es cosmopolita al igual que *Sh. sonnei* y *Sh. dysenteriae* con un 10 % de los casos, esta se encuentra en determinadas regiones del globo terráqueo. En general, la enfermedad es común y corre en individuos de todas las edades, siendo mayor su acción en niños menores de dos años.

El reservorio es el hombre enfermo, el portador convaleciente y el portador sano y la fuente de infección las heces que contaminan los alimentos, las bebidas y objetos. El germen entra por la boca con la ingestión de agua, leche y alimentos también por objetos contaminados por las manos o excreciones. El periodo de incubación suele ser de 24 a 48 h y puede durar hasta siete días. No existe inmunidad natural, sino que la susceptibilidad es general. La infección va seguida de una inmunidad ligera y de corta duración. A partir del sexto día aparecen en la sangre anticuerpos específicos que persisten durante algún tiempo (Divo, 1983).

GÉNERO YERSÍNIA

Este género está ampliamente distribuido en la naturaleza y posee reservorios acuáticos y animales, siendo el cerdo el reservorio más importante de las cepas patógenas para la especie humana. El ser humano se infecta mediante la ingestión de agua o alimentos contaminados o mediante la inoculación directa de los microbios en las transfusiones de derivados sanguíneos que contengan eritrocitos. En el tracto digestivo, *Y. enterocolítica* puede causar gastroenteritis aguda, enterocolitis, linfadenitis mesentérica e ileítis terminal. Los cuadros de septicemia no son frecuentes, pero pueden aparecer tanto en los pacientes normales como en los inmunodeprimidos, por ingestión del patógeno o por transfusión sanguínea.

Sólo las cepas virulentas, poseen plásmidos que les permiten la adaptación a una temperatura de 37 °C, expresando una serie de proteínas que no lo hacen a 25 °C, y que facilitan la adhesión, invasividad, capacidad antifagocítica y modulación de la respuesta inmune.

Cuando se ingieren cepas virulentas, éstas colonizan el tracto intestinal, atraviesan la mucosa y penetran en el interior de las células presentadoras de antígenos de las placas de Peyer. En esta localización provocan micro abscesos, ulceración del epitelio suprayacente y respuesta inflamatoria. La infección se extenderá posteriormente a los ganglios linfáticos mesentéricos, donde puede causar abscesos de gran tamaño.

Y. enterocolítica crece bien en los medios comúnmente utilizados en los laboratorios para el aislamiento de enterobacterias solo que fermenta lentamente la lactosa en el medio MacConkey, apareciendo como lactosa (-) o de color muy pálido. En medios con sacarosa o xilosa (Hektoen y xilosa-lisina-desoxicolato, XLD), sí son fermentadas, aparece con el mismo aspecto que la flora intestinal normal (color salmón en el primero y amarillo en el segundo).

Y. enterocolítica crece más lentamente que el resto de las enterobacterias a 37 ° C, por lo que en los cultivos de las heces puede pasar desapercibida, oculta por el crecimiento de la flora fecal normal. En este sentido, se aumenta la sensibilidad del cultivo si las heces se cultivan por duplicado, a 37 y 25°C, o bien si los cultivos a 37 ° C se reincuban otras 24 horas a 25 ° C (Gadea, I. y Soriano F., 2004).

GÉNERO PROTEUS

Bacilos rectos de 1 a 3 μ X 0.5 μ, que se presentan solos o en cadenas, en pequeños y grandes grupos, móviles por medio de flagelos peritricos (existen variantes no flageladas) no forman esporas ni cápsulas y gram -. Crecen bien en los medios comunes. No fermentan la lactosa, descomponen la urea y forman H₂S. Son abundantes en la naturaleza en especial en materia orgánica animal en descomposición; carnes podridas, también en aguas cloacales y conducto intestinal de hombre y animales.

Actividad bioquímica variable según la especie. Son destruidos por el calor a 60 °C/1 h y por el ácido fénico al 1:100/30 min.

En el hombre es agente causal de infecciones en el aparato urinario. En ciertos procesos intestinales hay aumento apreciable en la cantidad de microorganismos en las heces y de aquí que se considere como germen secundario de varias infecciones, la bacteriemia es la infección más grave causada por estos gérmenes. Proteus morganii se aísla frecuentemente de las heces de niños enfermos con diarrea de verano. Las infecciones corresponden a pobres o escasas condiciones higiénicas de los alimentos contaminados, influenciando la temperatura ambiental en el desarrollo microbiano en los alimentos como en la modificación de la defensa orgánica natural del conducto intestinal (Divo A., 1983).

GÉNEROS EDWARDSIELLA, HAFNIA Y ERWINIA

Son agentes miembros del grupo catalogado como bacilos Coliformes y son de interés para el aseguramiento de higiene en la fabricación de alimentos, la bacteria Edwardsiella tarda, que es un habitante intestinal de las culebras, se ha aislado en casos de diarreas y afecciones urinarias humanas, el género Hafnia, es un germen intestinal y común en la naturaleza, no tiene significación patológica como tampoco las especies de Erwinia que afectan a las plantas, si bien se han encontrado en heridas cutáneas infectadas (Divo. A, 1983).

2.7. LA DIARREA

2.7.1. DEFINICIÓN

La diarrea se define como la presencia de heces acuosas, poco compactas y frecuentes. Estas pueden variar; desde heces sueltas o pastosas hasta heces muy acuosas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la diarrea como un número no menor de tres defecaciones líquidas en un periodo de 24 horas (NLM, 2004).

2.7.2 FISIOPATOLOGÍA

La principal consideración en la diarrea es una anomalía del transporte del agua y electrolitos a través de la mucosa intestinal, con una ruptura de su ciclo enterosistémico y balance de agua negativo.

La diarrea se produce cuando la cantidad de agua excede la capacidad máxima de reabsorción por parte del colon, bien por aumento del flujo de líquidos que le llega o bien por lesión de éste (Quintana P. L., 2000).

La enfermedad diarreica es un síndrome de etiología multicausal en la que el evento primario suele ser la interacción del organismo con agentes infecciosos virales, bacterianos y parasitarios; donde los virus no suelen inducir respuesta inflamatoria, en las infecciones por bacterias enteroinvasoras pueden presentarse evacuaciones con moco y sangre, además de leucocitos en las heces.

Los eventos secundarios corresponden a las consecuencias del daño producido por estos agentes al organismo, particularmente al epitelio digestivo, en forma de pérdidas anormales de agua y sales, en la alteración de la digestión y absorción de nutrientes (como la intolerancia a la lactosa) y, secundariamente, en la afectación del estado nutricional y el desarrollo de alergia alimentaria (Larrosa - Haro A. y col., 2002).

2.7.2.1. MECANISMOS PRINCIPALES DE LA PATOGENIA: CITOPÁTICO, ENTEROTÓXICO Y ENTEROINVASIVO.

CITOPÁTICO. La colonización de los enterocitos y posteriormente su descamación por la agresión de los microorganismos inducen un reemplazamiento rápido por las células de las criptas cuya función principal es secretora y que no adquieren su maduración absorptiva. Las vellosidades quedan acortadas, las criptas alargadas, disminuyendo la superficie de absorción. Afecta al intestino delgado, provocándose un defecto de absorción por los enterocitos inmaduros. Se puede asociar a diarrea osmótica. Los gérmenes principales son los virus, principalmente el rotavirus. Otros virus implicados son adenovirus, astrovirus, coronavirus, parvovirus, etc. también los criptosporidium pueden producir patogenicidad por este mecanismo.

ENTEROTÓXICO. El enterocito funciona al revés con una importante secreción y muy mala absorción al estimularse el sistema adenilciclasa. La diarrea persistirá hasta que los enterocitos afectados no se descamen. No

existe lesión histológica en este tipo de diarreas, manteniendo la vellosidad su conformación anatómica. Los principales gérmenes implicados son *Vibrio cholerae*, *E. coli* enterotoxigénico, *Bacillus cereus*, etc.

ENTEROINVASIVO. Existe una invasión por los microorganismos de la mucosa con inflamación y ulceración que incluso pueden ser sistémicas. Afecta principalmente al colon perdiendo su capacidad extra de reabsorción de agua. Los microorganismos conocidos son *Shigella*, *E. coli* enteroinvasivo, salmonellas, *Yersinia enterocolítica*, *Campylobacter jejuni* y *Entamoeba histolytica* (Quintana P. L., 2000).

2.7.3. TIPOS DE DIARREA: POR ALTERACIÓN DE LA MOTILIDAD, OXIDATIVA, OSMÓTICA, SECRETORA E INFLAMATORIA

Diarrea por **ALTERACIÓN DE LA MOTILIDAD:** Se debe a una hipermotilidad de uno o más segmentos del intestino, es típica del síndrome de intestino irritable, hipertiroidismo y diabetes mellitus.

En toda diarrea por el aumento de H₂O intraluminal sucede un incremento en la motilidad lo cuál provoca deficiencias en la absorción, los mecanismos no están bien aclarados, pueden intervenir el sistema nervioso entérico, sustancias neurohumorales, simpático nervioso extrínseco y musculatura lisa intestinal.

Diarrea **EXUDATIVA:** Existen lesiones en la mucosa intestinal a través de las que se produce exudación de componente mucoso y sanguinolento. Se presenta en enfermedades inflamatorias del intestino e infecciones por *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella*.

Diarrea **OSMÓTICA:** Se debe al aumento del componente no absorbible en el tubo digestivo, aumentando la concentración osmolar y jalando, líquido del componente vascular, intracelular y extracelular (intersticio y vascular). También es resultado de una excesiva pobreza de absorción de solutos de la actividad

osmótica en el tracto intestinal, el cual causa un aumento de movimiento de fluido en el lumen intestinal diluyendo los iones inorgánicos. Acelerando la detención de la admisión de las sustancias nocivas, causantes de la diarrea. La mala digestión de la lactosa es un ejemplo clásico de la diarrea osmótica (Saloff C. J. - Coste, 1995).

- Causas exógenas: Laxantes (Mg^{+2} , lactulosa, PEG), Antiácidos (Mg^{+2}), alimentos (sorbitol, manitol, etc), medicamentos (colchicina, colestiramina, neomicina)
- Causas endógenas: Enfermedades malabsortivas (congénitas o adquiridas).

Diarrea **SECRETORA**: Se produce porque los enterocitos aumentan la secreción de electrolitos al lumen intestinal jalando consigo agua, estimulados por el secretagogo que se observa en los procesos tóxicos como el cólera y puede ser a un nivel luminal (enterotoxina); local o sistémico produce un incremento en AMPc intracelular del enterocito, apertura de canales de cloro, secreción de H_2O hacia el lumen, e inhibición de la absorción.

- Causas exógenas: intervienen laxantes (fenolftaleínas, antraquinonas, etc), medicamentos (diuréticos, colinérgicos, etc), tóxicos (arsénico, OH, mariscos, café, hongos), toxinas ingeridas (*Staphylococcus aureus*, etc), alergia intestinal sin inflamación,
- Causas endógenas son: enterotoxinas bacterianas (*V. cholerae*, *E. Coli*), laxantes endógenos (ácidos-hidroxilados), tumores productores de hormonas, congénitas.

Diarrea **INFLAMATORIA** sucede al producirse un daño en el enterocito. Las causas suelen ser de origen **infeccioso**: Invasoras (bacterias, virus, parásitos), producción de citotoxinas (bacterias); **inflamatorias** (autoinmunes); **tóxicas**; **vasculares** e **idiopáticas**.

La infección por colonización y adherencia; o invasión y entrega de citotoxinas provoca:

- Respuesta inflamatoria: celular, humoral, fagocítica, incremento en la secreción intestinal, mayor motilidad
- El daño al epitelio (enterocitos) provocando alteración en la permeabilidad,
- El daño grave en el Intestino delgado provoca exudación desde vasos y capilares en el, produce atrofia vellositaria e hiperplasia de las criptas
- En el colon, colonocitos atenuados (inmaduros), criptas regenerativas irregulares e hiperplásticas; menor cantidad de disacaridasas, menor cantidad de proteasas epiteliales, escasos transportadores acoplados, azúcar- Na^+ , aminoácidos- Na^+ , decremento de transportadores de absorción de NaCl , mantiene la capacidad de secretar Cl^- y HCO_3^- , y efectos sistémicos (mediadores inflamatorios), (ALVAREZ L. M. 2004).

2.7.4. CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LA DIARREA: AGUDA Y CRÓNICA

La DIARREA AGUDA puede acarrear modificaciones en las actividades normales de las enzimas y flora intestinal, y puede repentinamente agravar los síntomas (Figura 5) y desarrollar diarrea crónica.

La DIARREA CRÓNICA, particularmente en infantes, niños pequeños, y en mayores puede ocasionar severas implicaciones nutricionales y medicas incluyendo, deshidratación, pérdida de electrolitos, cambios en la mucosa intestinal, y mal nutrición.

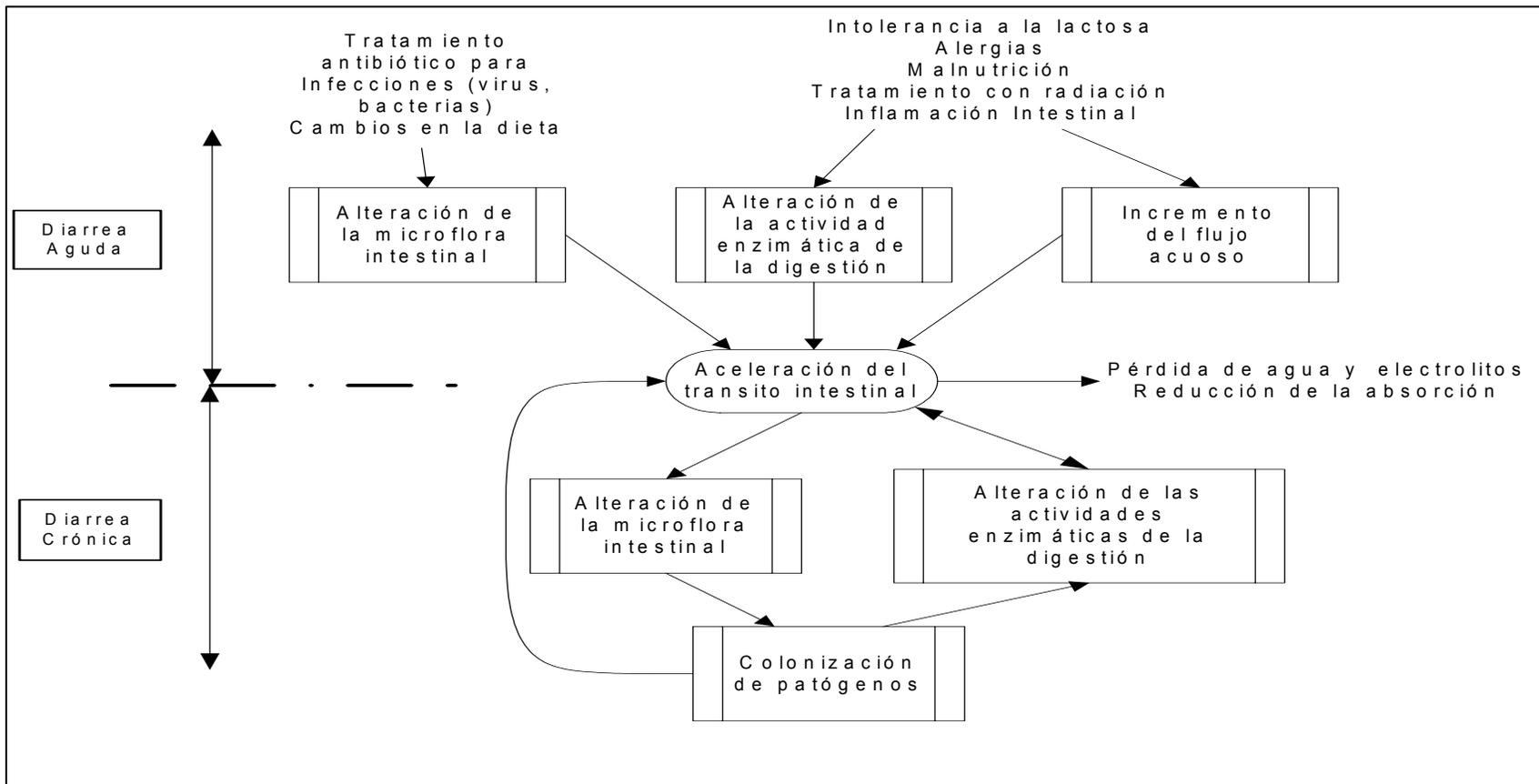


Figura 5. Factores relacionados con la diarrea aguda y crónica

Fuente: Saloff C. J. – Coste, 1995.

Puede ser aguda cuando dura menos de siete días ó crónica (continua o prolongada) cuando este tipo de heces se presentan durante más de cuatro semanas. La diarrea aguda habitualmente es debida a una intoxicación alimentaria por virus o bacterias.

Los casos de niños menores de un año y de ancianos debilitados que padecen una diarrea aguda se denominan de alto riesgo, por el peligro que supone la pérdida de líquidos.

Cuadro 17. Causas comunes de trastornos diarreicos

Frecuentes	Dieta, antibióticos, laxantes, gastroenteritis, disentería leve, giardiasis.
Menos Frecuentes	Alergias, Apendicitis, Enfermedad Diverticular del Colon, Cáncer Intestinal.
Síndromes de mala - absorción	Enfermedad celiaca o de esprúe, tropical o no, fibrosis quística, enfermedad de wipple.
Enfermedades producidas por parásitos	Giardia lamblia, Entamoeba histolítica, Belantidium coli, Ascaris lumbricoides, Estrongiloides estercoralis, Necator y anquilostoma, Tricocefalos.
Enfermedades intestinales inflamatorias	Colitis ulcerativa, Ileitis, Síndrome del Colon Irritable, Gastrectomía, Radioterapia, Inmunodeficiencia.

Fuente: Reader's Digest Selecciones, 1984; NLM, 2004; ENCARTA, 2003.

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR

El estudio se efectuó en las instalaciones del Taller y Laboratorio de Productos Lácteos del Departamento de Producción Animal de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, con la colaboración del Laboratorio Estatal de la Secretaría de Salud Pública de Saltillo, Coahuila en lo que respecta a los estudios clínicos.

3.2 CULTIVOS INICIADORES

En el estudio se utilizaron dos tipos de cultivos liofilizados comerciales denominados AB1 y OM1:

Cuadro 18. Cultivos utilizados en la fabricación de la bebida fermentada con suero lácteo

CLAVE	ESPECIES	PROVEEDOR
AB1	<i>L. acidophilus, Bifidobacterium sp.</i>	Cultivo Sacco Lyofast
OM1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Lacti – Lab de México S. A. de C. V.

3.3 MATERIALES

Se emplearon reactivos y material de vidrio de uso común de laboratorio, tanto para el proceso de fabricación como para el análisis microbiológico.

3.4 EQUIPO

- Autoclave All American, Modelo 1941-X
- Balanza Analítica Ohaus, Modelo EO2140
- Balanza Semianalítica Ohaus, Modelo TS 120
- Cuenta Colonias Québec, Modelo 3325
- Estufa Blue M, Modelo 5W – 17 - TA
- Incubadora Blue M, Modelo 100 A
- Mufla Lindbeg, Modelo 518944
- Mufla Thermolyne, Modelo 1500
- Refrigerador American, Modelo RC – 270
- Medio de transporte “Cary Blair” EUROTUBO[®] Modelo 0318
- Antisuero “SEROBAC” BIO RAD[®] Modelo E-01-01

3.5 METODOLOGÍA

3.5.1. PROCESO DE PRODUCCIÓN

Para la obtención de la bebida probiótica se trabajó en base a las especificaciones y procedimientos obtenidos por Sánchez H. (2002). Del proceso de fabricación del queso panela se obtiene el suero para después fermentarlo con los cultivos iniciadores de acuerdo a las técnicas descritas en los anexos 8.5 y 8.6.

Cuadro 19. Composición físico – química del suero dulce de quesería procedente de la fabricación de queso panela

Componente %	Reboloso, 1995	Spreer, 1991
Humedad	91.78	93 – 94
Extracto seco	8.22	6 – 7
Proteína (N x 6.38)	0.84	0.8 – 1
Grasa	0.27	--
Cenizas	0.70	0.5 – 0.7
Lactosa	6.42 **	4.5 - 5
Ácido Láctico	0.11	Trazas
pH	6.93	6.45
Densidad a 15 ° C (gr/cm³)	1.027	--

** Obtenidos por diferencia

Fuente: Sánchez H., 2002.

Cuadro 20. Especificaciones físico – químicas y microbiológicas de una bebida fermentada elaborada a base de suero dulce de quesería.

ESPECIFICACIONES *	
Humedad	84.09
Extracto seco	15.89
Proteína	0.81
Grasa *	ND
Cenizas	0.23
Lactosa	3.54
° Brix a 20 ° C	18.93
Densidad (gr./cm³)	1.07
pH a 18 ° C	3.64
% de Acidez	0.62 - 0.67
UFC/ml (dil. 10⁻⁴ - 10⁻⁵)	10 ⁶ – 10 ⁸
Viabilidad bacteriana	21 d/4±1 °C

ND: No determinables

* Sabores: naranja, manzana y fresa.

Fuente: Sánchez H., 2002.

3.5.1.1. Cinéticas de fermentación de Cultivos Madre

Para potencializar y eficientar la fermentación por lotes, se obtuvo el cultivo madre inoculando de $7.5 - 8.6 \times 10^{-2}$ g de cultivo liofilizado en un litro de suero pasteurizado a $94^\circ \text{C}/1$ minuto y enfriado a temperatura de incubación de $38 \pm 1^\circ \text{C}$ durante un periodo oscilante entre 14 – 16 horas en ambos cultivos empleados. Aleatoriamente se registró la acidez cada hora para observar la cinética de fermentación. Al obtener 62 – 67 ° D se concluyó la misma para trasladarlo a refrigeración a $4 \pm 1^\circ \text{C}$.

3.5.1.2. Cinéticas de fermentación de lotes

Para la fabricación del producto, a cada lote de suero previamente pasteurizado a $94^\circ \text{C}/1$ min se inoculó el cultivo revitalizado del cultivo madre al 4 % a una temperatura de $35 \pm 2^\circ \text{C}/48 \pm 2$ h por un tiempo promedio oscilante entre 14 – 16 horas, deteniendo la fermentación entre 62 – 67 ° D según resultados obtenidos por Sánchez H. (2002). Durante el proceso se registró la acidez para así obtener la curva o cinética de fermentación.

3.5.1.3. Recuento de microorganismos viables

Con esta prueba, se evaluó la estabilidad de la viabilidad bacteriana del producto preparado con sabor a mango durante el lapso de una semana siendo el periodo durante el cual se administró el total de la bebida fermentada donde se mantuvo a una temperatura de refrigeración de $4 \pm 1^\circ \text{C}$.

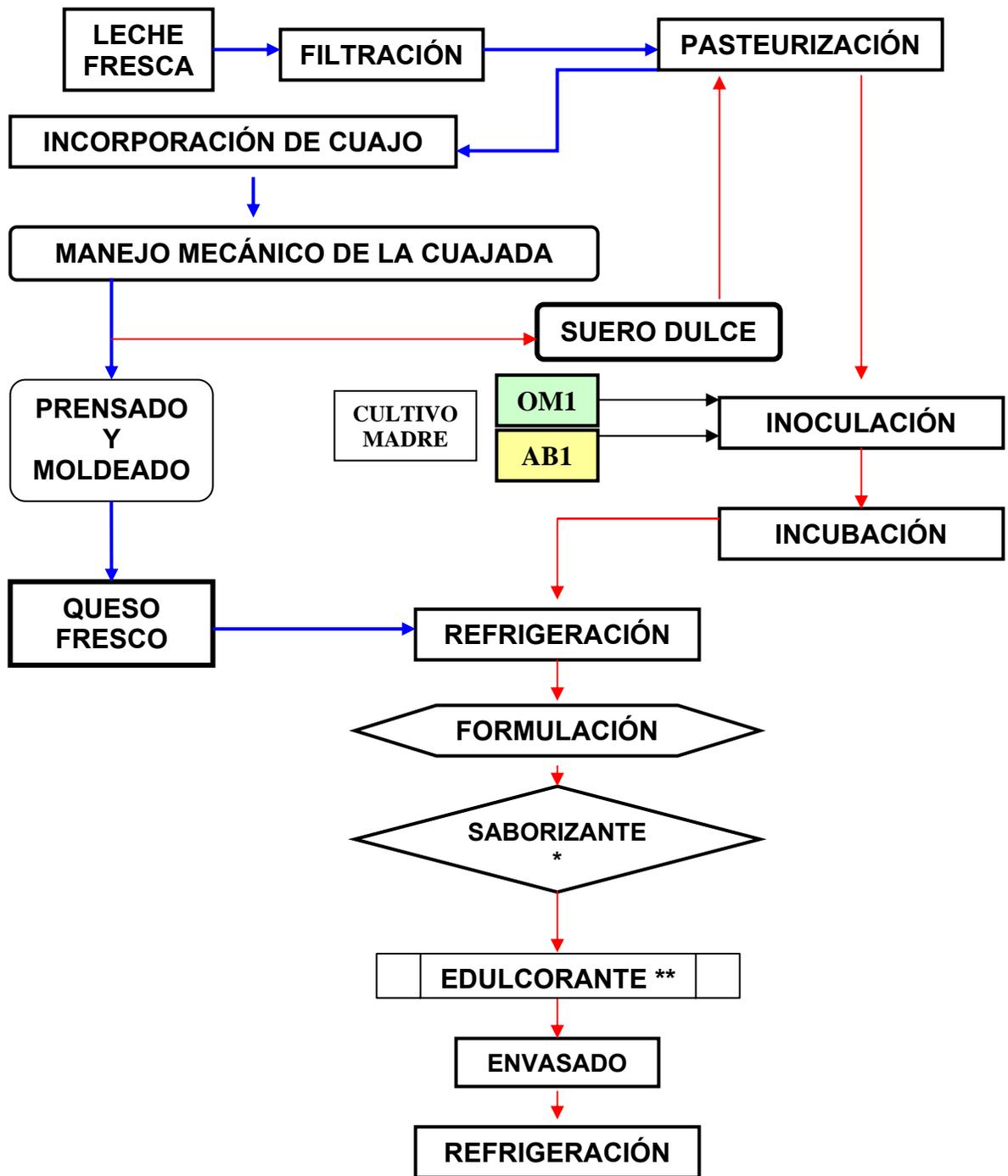
Se trabajó bajo la NOM-110-SSA1-1994 “Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico” utilizando el agar cuenta estándar (ACE), preparada de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

Para la preparación del agua peptonada al 0.5 %, se disuelve completamente la peptona y se distribuye en tubos de ensaye con 9 ml y en matraces con 90 ml para posteriormente esterilizarlos en autoclave a 121 ° C/15 min.

Se prepararon diluciones decimales hasta 10^{-6} , solo las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} se sembraron en cajas Petri (previamente esterilizadas a 170 – 175 °C/2 h) en atmósfera parcial de CO₂, con temperatura de 35 ± 2 ° C/48 ± 2 h para mesófilos aerobios. Se realizó el conteo de UFC a las 48 horas según la Norma oficial mexicana “Métodos para la cuenta de bacterias aerobias en placa” (NOM-092-SSA1-1994).

3.5.1.4 Formulación de las bebidas refrescantes fermentadas

Con los respectivos lotes de suero fermentados con cada cultivo iniciador se empleó la formulación obtenida por Sánchez H. (2002) en una evaluación sensorial por métodos afectivos. Se emplearon sabores concentrados sin distinción al 1 % de: mango, uva, naranja y fresa de la marca comercial DEIMAN ® con adición de azúcar de mesa al 15 %; esto debido a que en el estudio realizado por Sánchez H. (2002) se obtiene que el uso de uno u otro saborizante no afecta el periodo de estabilidad bacteriana de las bebidas fermentadas.



* Mango, Uva, Naranja, Fresa 1 %

** Sacarosa 15 %

Figura 6. Diagrama de flujo del proceso de producción de la bebida probiótica

3.5.2. Selección de los niños participantes

Para seleccionar a los niños participantes en el presente estudio de una edad escolar (6 – 12 años) se visitó la escuela primaria “Miguel Hidalgo” ubicada en la comunidad de Buenavista, Saltillo, Coahuila, dentro del perímetro de la Universidad, en donde los 45 inscritos, en su mayoría, tienen su domicilio particular en la misma comunidad o en comunidades aledañas.

Se informó a los padres de familia de la escuela “Miguel Hidalgo” sobre el fin del estudio (anexo 8.1.1.) y se les realizó una entrevista (anexo 8.1.2.) para monitorear la existencia o no de casos diarreicos en sus hijos, recabándose también datos generales (nombre, edad y género) incluyendo, datos clínicos como el tiempo de evolución de la diarrea, frecuencia, sintomatología, tratamientos, alergias y dieta. En todos los casos se hizo medición de peso y estatura. Consecuentemente se encuestó personalmente a los niños para qué corroboraran con las respuestas de los padres así como la toma de peso y altura.

3.5.3. Análisis microbiológico del tracto gastrointestinal de los niños

Para observar la flora bacteriana presente en la porción inferior del intestino se optó por la aplicación de la técnica de

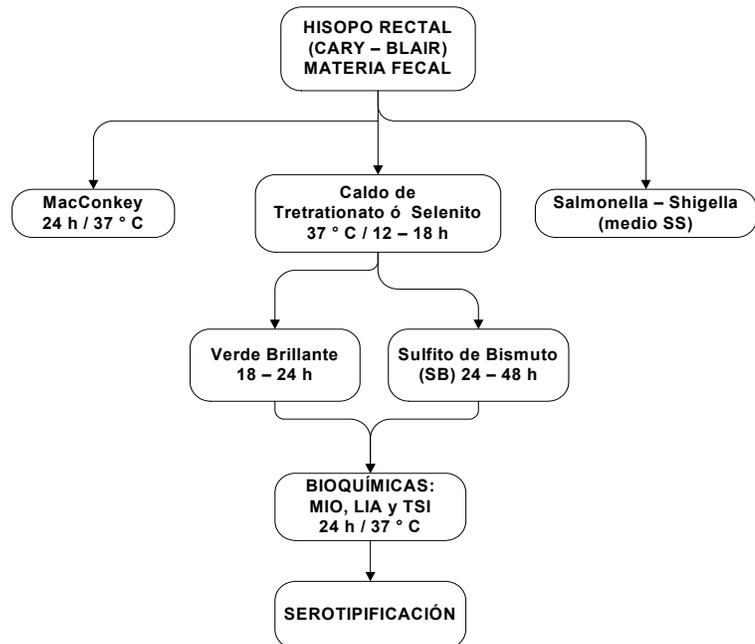


Figura 7. Técnica de coprocultivo utilizada en el análisis microbiológico

Fuente: Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Coahuila, 2004.

coprocultivo que a continuación se describe:

3.5.3.1. Toma y envío de las muestras fecales

Antes y después del tratamiento se tomó una muestra fecal a cada niño participante en el estudio con un hisopo estéril “Cary Blair” para evitar la desecación (INDRE, 2004).

Se anexó el formato de identificación para cada muestra para después enviarlo de inmediato al laboratorio donde se realizó el análisis bacteriológico coprocultivo, para examinar la microflora intestinal presente.

Con los datos recopilados se analizó el porcentaje de aparición de cada una de las especies de bacterias identificadas respecto a su total por cada tratamiento.

3.5.4. Administración del tratamiento con las bebidas probióticas

Una vez tomada la muestra se procedió a la administración de una cantidad media de 150 ml / día durante un lapso de 30 días de la bebida probiótica para cada tratamiento uno fermentado con el cultivo AB1 (T_1) con $r = 12$; el otro con OM1 (T_2) con $r = 11$ utilizado por Sánchez H. (2002); excepto el grupo testigo (T_3) de cada tratamiento quienes no consumieron ninguna bebida.

3.6 Diseño experimental

El procedimiento de análisis estadístico utilizado fué un método de estadística no – paramétrica por el hecho de no tener valores cuantitativos en los resultados microbiológicos de laboratorio, por lo que la exactitud de las inferencias sobre la población en estudio se reduce. Con la estadística no paramétrica se pueden probar hipótesis tales como sí: la distribución en la población es continua, si las poblaciones tienen la misma forma, si las distribuciones son simétricas respecto del mismo punto. Sin embargo estas hipótesis nunca determinan por completo la distribución de la población como en el caso de la curva normal (Downie N. M. y Heath R. W., 1973).

◆ Prueba de rangos de Kruskal – Wallis

Es un análisis de varianza de tipo no paramétrico de elevada eficiencia y se emplea para comprobar si k muestras independientes son de poblaciones diferentes. Si hay diferencias genuinas de población o simples variaciones aleatorias, semejantes a las esperadas entre distintas muestras aleatorias de la misma población. A continuación se resume el procedimiento para el ANVA de la clasificación por rangos para éste método.

1. Se ordenan todas las observaciones de las k grupos en una sola serie, asignando rangos de 1 a N , el puntaje más pequeño es reemplazado por el rango 1, el siguiente en tamaño por el rango 2 y el más grande por el rango N , N es el número de observaciones independientes en las k muestras. A continuación se muestran los criterios para la asignación de rangos a las observaciones en los análisis microbiológicos:

Cuadro 21. Criterios para la asignación de rangos

CUESTIÓN	CLAVE de RANGO	CRITERIO
¿Hay cambio en la conformación de bacterias aisladas después del tratamiento?	1	Sí, pero sigue conservándose en normal
	2	Sí, hubo cambio positivo
	3	Sí, pero fue negativo o potencialmente riesgoso
	4	Sí, pero se conserva negativo o potencialmente riesgoso
	5	No, sigue permaneciendo normal
	6	No, pero sigue permaneciendo negativo o potencialmente riesgoso

2. Se determina el valor de R (la suma de los rangos) para cada k grupos de rangos.

3. Si una gran proporción de las observaciones están ligadas, se calcula el valor H con la fórmula (b), de otra manera se usará la formula (a).
4. El método para determinar la significación del valor observado de H depende del tamaño de k y del tamaño de los grupos:
 - a. Si $k = 3$ y si $n_1, n_2, n_3 \leq 5$, se utilizará la Tabla A (consultar apéndice) que puede usarse para determinar la probabilidad asociada conforme a H_0 de una H tan grande como la observada.
 - b. En los otros casos, la significación de un valor tan grande como el valor observado de H puede determinarse por medio de la Tabla B (consultar apéndice) con: $gl = k - 1$
 - c. Si la probabilidad asociada con el valor observado de H es igual o menor que el nivel de significancia, α , previamente fijado, se rechaza H_0 y se acepta H_1 .

5. Regla de decisión:

Cuando $n_j > 5$ y el valor observado de H es igual o mayor que el valor de χ^2 “*Ji – cuadrada*” dado en la tabla B del apéndice en el nivel de significancia fijado previamente y para el valor observado de $gl = K - 1$, H_0 puede rechazarse en ese nivel de significación. H_0 = Las poblaciones tienen la misma distribución, H_1 = Las poblaciones tienen diferente distribución

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k \frac{R_j^2}{n_j} - 3(N+1) \quad (a)$$

Donde

H = contraste H de Kruskal - Wallis

k = número de muestras (total de repeticiones de los análisis microbiológicos)

n_j = número de casos en la muestra de orden j (número de observaciones hechas en cada tratamiento)

$N = \sum n_j$, el número de casos de todas las muestras combinadas

R_j = suma de rangos en la muestra de orden j (sumatoria de los valores asignados en cada tratamiento)

$\sum_{j=1}^k$ = indica sumar las k muestras (columnas)

Ajuste de H (observaciones ligadas):

$$H = \frac{\frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k \frac{R_j^2}{n_j} - 3(N+1)}{1 - \frac{\sum T}{N^3 - N}} \quad (b)$$

Donde: $T = t^3 - t$ (cuando t es el número de observaciones ligadas en un grupo de puntajes ligados)

N = número de observaciones en las k muestras juntas, esto es,

$$N = \sum nj$$

$\sum T$ indica sumar en todos los grupos de ligas

◆ X^2 de Pearson en tablas de contingencia mayor a 2×2 .

De manera complementaria utilizando los criterios del método anterior se utilizó la “Ji – cuadrada” que se emplea en el contraste de hipótesis de la diferencia de las respuestas de dos ó más grupos ante un determinado estímulo, los datos se anotan en tablas de contingencia donde la nulidad de la hipótesis afirma que no existe relación alguna entre las variables por lo que son independientes en la población. (Downie N. M. y Heath R. W., 1973)

Cuadro 22. Frecuencias Observadas (O)

a	b	c	d	e	R
f	g	h	i	j	S
k	l	m	n	e	W
M	N	O	P	Q	T

Cuadro 23. Frecuencias Esperadas (E)

MR/T	NR/T	OR/T	PR/T	QR/T	R
MS/T	NS/T	OS/T	PS/T	QS/T	S
MW/T	NW/T	OW/T	PW/T	QW/T	W
M	N	O	P	Q	T

$$X^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

$$v = gL = (r-1) (c - 1)$$

donde:

c = número de columnas

r = número de filas

- ◆ Intervalos de confianza para la proporción poblacional de una distribución binomial

La estima por intervalo a la proporción verdadera P de las variables 1: si hubo un cambio después del tratamiento pero se conserva en normal, 2: si hubo un cambio positivo después del tratamiento y 5: no hubo cambio después del tratamiento pero permanece en normal, al nivel de confianza $(1-\alpha)(100\%)$, con una tolerancia al error de tamaño α de probabilidad.

La ecuación es:

$$P \pm Z_{\alpha} \sqrt{\frac{pq}{n}} \quad \begin{array}{l} q= 1- p \\ p=x/N \end{array}$$

donde:

P = proporción de ocurrencia de las variables de los rangos positivos: 1,2 y 5 de los resultados microbiológicos

$q=1-p$: proporción de no – ocurrencia de la variable en la muestra

n : número de elementos en la muestra

Z_{α} : valor crítico obtenido de la tabla de probabilidad de la normal estándar (variable z) tal que $P(Z \geq Z_{\alpha}) = \alpha$

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Control del proceso de producción de la bebida probiótica

Se fabricaron las bebidas de acuerdo a las especificaciones obtenidas por Sánchez H. (2002) de donde se obtuvieron los procedimientos y formulaciones.

4.1.1. Curvas típicas de la fermentación en cultivo madre y en lote

De acuerdo a los monitoreos en las fermentaciones (cuadro 24) se obtuvieron las siguientes cinéticas donde se observa un comportamiento de crecimiento similar en los dos cultivos lo que indica buena respuesta en el medio a base de suero dulce.

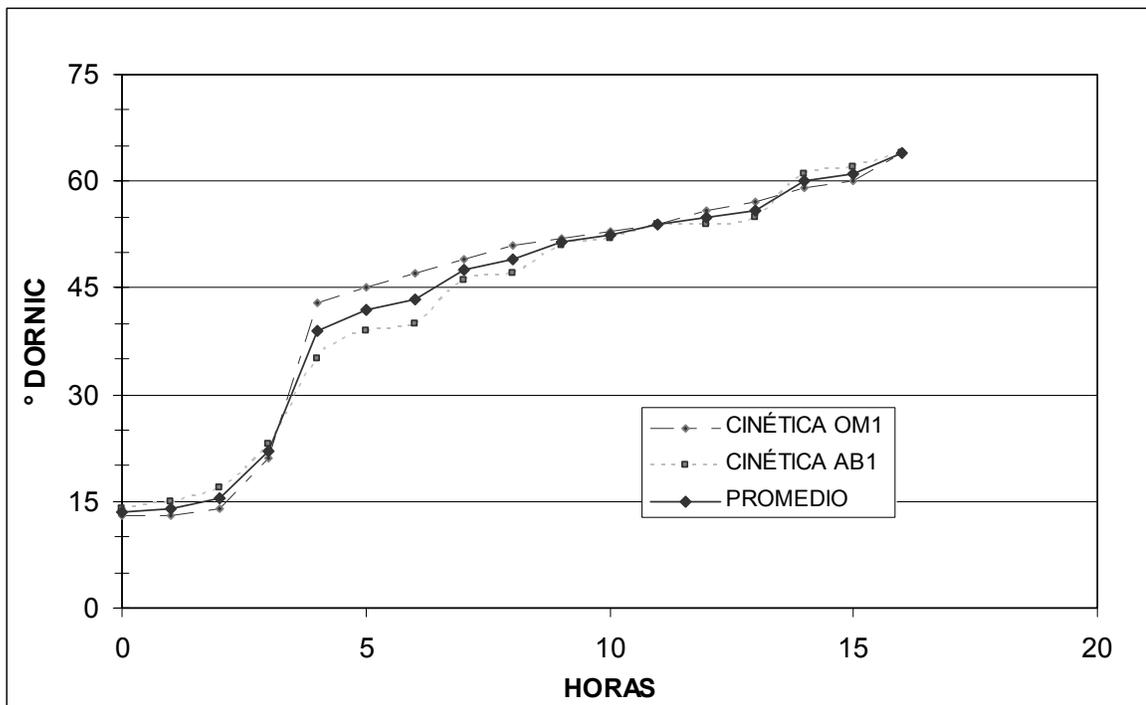


Figura 8. Curvas características de la cinética de fermentación en ambos cultivos probióticos.

En lo que respecta a los resultados obtenidos por Sánchez H. (2002) el tiempo de fermentación para llegar al porcentaje de acidez óptimo de 0.62 – 0.67 se incrementó al doble. Esto se puede explicar por el uso de bacterias diferentes por lo que pueden tener un diferente comportamiento en la producción de acidez. El cuadro 24 muestra los registros de las cinéticas de fermentación (% de acidez) tanto para la activación de los cultivos y su posterior fermentación en lote.

Cuadro 24. Registro de acidez para la graficación de la curva de fermentación.

HORA	OM1 ° D	AB1 ° D	PROMEDIO
0	13	14	13.5
1	13	15	14
2	14	17	15.5
3	21	23	22
4	43	35	39
5	45	39	42
6	47	40	43.5
7	49	46	47.5
8	51	47	49
9	52	51	51.5
10	53	52	52.5
11	54	54	54
12	56	54	55
13	57	55	56
14	59	61	60
15	60	62	61
16	64	64	64
17	65	66	65.5

* Promedio de tres observaciones

° D = Grados Dornic

4.1.2. Estabilidad de la viabilidad bacteriana de la bebida fermentada

Los resultados que se muestran en el siguiente cuadro muestran que durante el lapso de siete días en el que se administró el total del lote, la bebida se mantiene estable de acuerdo al estudio de estabilidad realizados por

Sánchez H. (2002) donde muestra una viabilidad microbiana óptima del producto de hasta 21 días para su consumo como un producto probiótico

Cuadro 25. Cuenta de microorganismos viables del producto fermentado después de una semana

CUENTA ESTANDAR				
Dilución	Primer día		1ª semana	
	AB1	OM1	AB1	OM1
10^{-4}	-----	1.6×10^7	4.7×10^6	5.89×10^7
10^{-5}	1.05×10^7	1.35×10^6	3.605×10^8	1.19×10^8

Al realizar este conteo se constata la efectividad de las fermentaciones, suspendiendo la incubación de los 62 – 67 ° D indicador obtenido por Sánchez H. (2002) y se afirma la aptitud del funcionamiento del suero como vehículo para la fabricación de productos probióticos.

4.2. Resultados del monitoreo previo

4.2.1. Niños seleccionados para el estudio

De los 45 niños inscritos en la escuela primaria el 78 % expresó haber tenido algún tipo de defecaciones “tipo” diarreica, aparentemente sin ninguna sintomatología relacionada a alguna causa clínica, el 100 % dijo tener una dieta variada, sin tratamiento con antibióticos.

Se analizaron los datos registrados y se seleccionaron los niños potenciales que manifestaron verbalmente padecer casos de diarrea de algún tipo (anexo 8.1.3.) para posteriormente hacerles un estudio clínico con el apoyo del Laboratorio Estatal de Salud Pública.

De acuerdo a los resultados se seleccionaron 30 niños = 66.66 %, incluyendo edades desde 6 a 13 años en los distintos tratamientos, teniendo

una participación general del 57 % por parte de los niños, e individualmente por cada tratamiento tenemos que en el T1 (AB1) participaron 1:1 (6,6) por cada género; T2 (OM1) el 27 % (3,8) participante correspondió a las niñas; T3 (testigo) las niñas participan en un 57 % (4,3). En el anexo 8.1.4 se muestran la identidad de los niños participantes.

4.3 Diagnóstico microbiológico intestinal de los niños seleccionados

La recopilación de datos obtenidos de los resultados del análisis microbiológico realizado antes y después de los tratamientos se muestra enseguida:

Cuadro 26. Resultados del análisis microbiológico

No.	TRATAMIENTO AB1				TRATAMIENTO OM1				TRATAMIENTO TESTIGO			
	CLAVE	EDA	C1	C2	CLAVE	EDA	C1	C2	Clave	EDA	C1	C2
1	P2	7	E. coli / Enterobacter sp	E. coli / Enterobacter sp	P7	7	E. coli / Enterobacter sp	Klebsiella oxitoca	P8	6	E. coli	E. coli
2	P5	7	E. coli / Enterobacter sp	E. coli / Enterobacter sp	S1	7	E. coli	E. coli	P1	7	E. coli / E. fergusonii	E. coli / Enterobacter sp
3	P3	8	E. coli / Enterobacter sp	E. coli	T6	9	E. coli / Kluyvera ascorbata	Enterobacter sp / Kluyvera ascorbata	T8	9	E. coli	E. coli
4	S2	8	E. coli	E. coli	T2	9	E. coli	E. coli	C10	10	E. coli	Klebsiella sp / E. coli
5	P6	9	E. coli / Enterobacter agglomerans	E. coli / Enterobacter agglomerans	T10	9	E. fergusonii	E. coli	Q3	10	E. coli / Enterobacter sp	E. coli / Enterobacter sp
6	T1	9	Citrobacter freundii	E. coli	C3	10	E. coli / Enterobacter cloacae	Pseudomonas aeruginosa	Sx6	11	E. coli / Enterobacter sp	E. coli / Enterobacter sp
7	T5	10	E. coli	E. coli	C8	10	E. coli / Enterobacter sp	E. coli	Q6	12	Klebsiella pneumoniae	Klebsiella pneumoniae
8	T7	10	E. coli	E. coli	C6	11	E. coli	E. coli / Serratia marcescens				
9	T3	11	Klebsiella pneumoniae	Klebsiella pneumoniae	Q2	11	Citrobacter freundii	E. coli				
10	C1	11	E. coli	E. coli	Sx2	12	E. coli	E. coli				
11	Q1	12	E. coli / Serratia forticola	E. coli	Sx5	12	E. coli	E. coli				
12	Sx6	12	E. coli / E. fergusonii	E. coli / Enterobacter sp								

AB1 = Bebida fermentada con: *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* sp.

OM1 = Bebida fermentada con: *Lc. lactis* subsp. *lactis*

TESTIGO = Ninguna bebida

CLAVE: La inicial indica el grado perteneciente (Primero, Segundo, etc.) y el número consecuente se refiere al número correspondiente al de la lista de control oficial de la escuela.

C1 = Resultados del coprocultivo efectuado antes de administrar las bebidas probióticas

C2 = Resultados del coprocultivo realizado después de un mes de administración de la bebida probiótica.

De los datos anteriores se deriva la siguiente concentración de datos:

Cuadro 27. Proporción (%) de aparición de cada bacteria en cada uno de los tratamientos antes y después de la administración de las bebidas probióticas

No.	Tratamientos Bacterias	AB1				OM1				TESTIGO			
		C1	%	C2	%	C1	%	C2	%	C1	%	C2	%
1	Escherichia coli	10	55.55	10	66.66	9	60.0	8	61.55	6	60	6	54.55
2	Escherichia fergusonii	1	5.55	0	0	1	6.66	0	0	1	10	0	0
3	Enterobacter sp.	3	16.7	3	20	2	13.33	1	7.69	2	20	3	27.27
4	Enterobacter cloacae					1	6.66	0	0				
5	Enterobacter agglomerans	1	5.55	1	6.67								
6	Citrobacter freundii	1	5.55	0	0	1	6.66	0	0				
7	Serratia marcescens					0	0	1	7.69				
8	Serratia fonticola	1	5.55	0	0								
9	Klebsiella sp									0	0	1	9.09
10	Klebsiella pneumoniae	1	5.55	1	6.67					1	10	1	9.09
11	Klebsiella oxitoca					0	0	1	7.69				
12	Kluyvera ascorbata					1	6.66	1	7.69				
13	Pseudomona aeruginosa					0	0	1	7.69				
		18		15		15		13		10		11	

De los datos del cuadro anterior podemos observar que el género *Escherichia coli*, el cual también es sintetizador de vitaminas del complejo B, puede ser parte hasta en un tercio de la microflora encontrada en heces humanas según CRDC (2001) y todas ellas fueron caracterizadas como normales mediante una prueba de serotipificación, así también *Enterobacter sp.*, ocupa un lugar predominante entre los demás géneros y los géneros restantes se encuentran en menor proporción con una homogeneidad de aparición entre los tratamientos, en la mayoría de éstos últimos microorganismos es donde se centran los de importancia médica siendo implicados o no en antecedentes con infecciones diarreicas. Del cuadro 27 se derivan las siguientes gráficas ilustrativas:

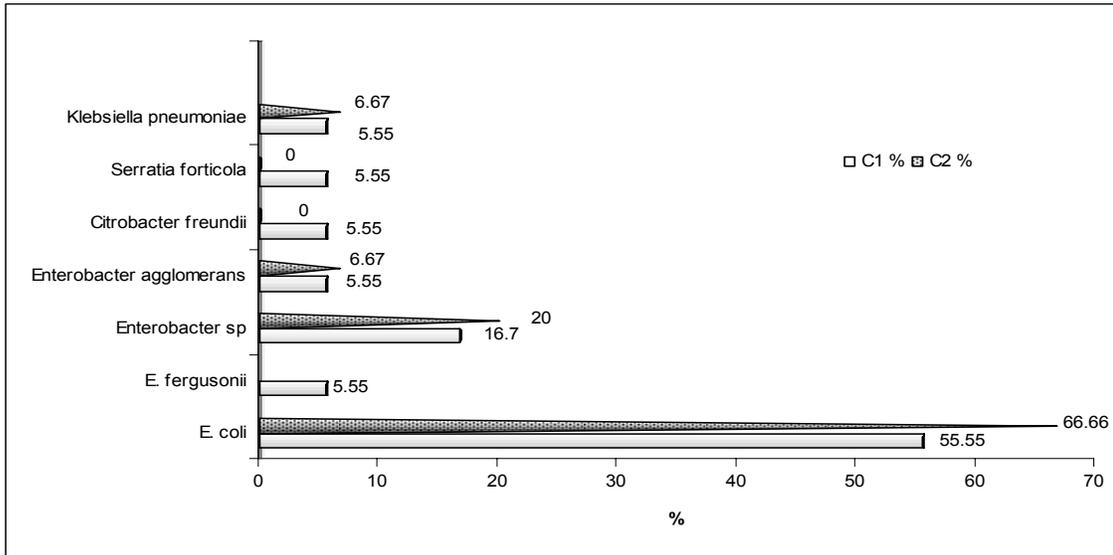


Figura 9. Resultados de coprocultivo antes y después del tratamiento con la bebida probiótica AB1

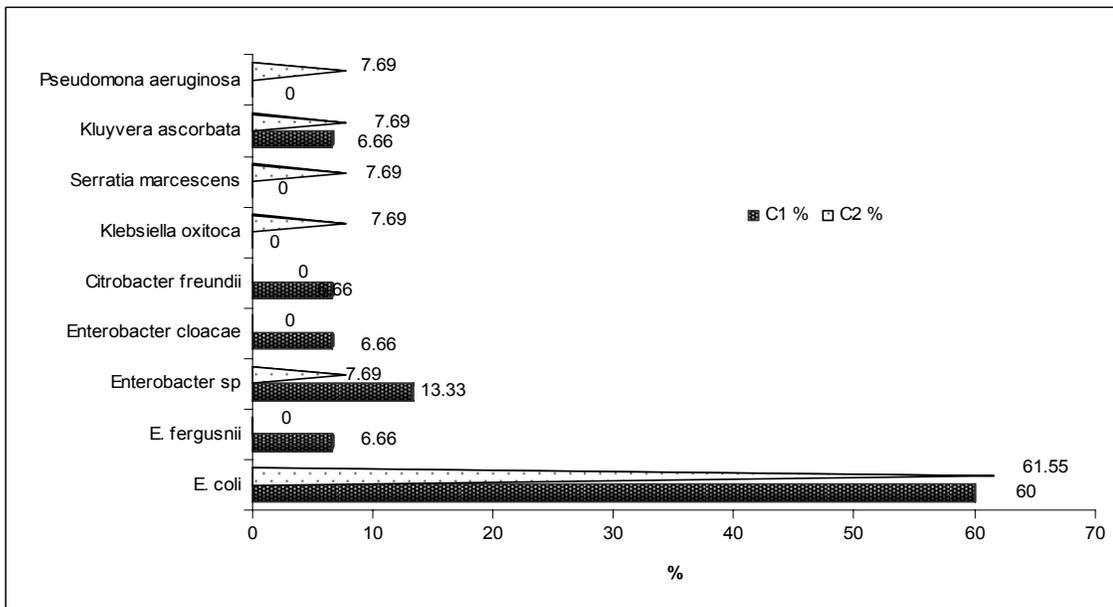


Figura 10. Resultados de coprocultivo antes y después del tratamiento con la bebida probiótica OM1

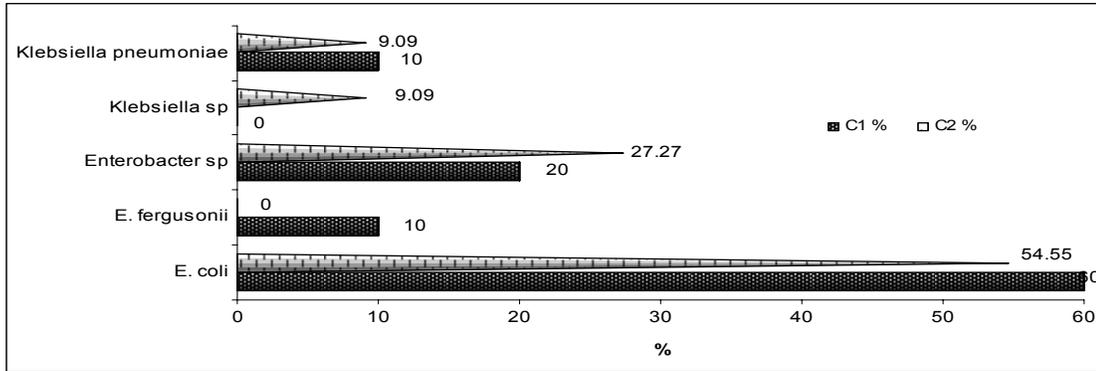


Figura 11. Resultados de coprocultivo antes y después del tratamiento con la bebida probiótica para el grupo testigo

Para conocer si la administración de las bebidas probióticas influyeron en la aparición de una u otra bacteria en los análisis microbiológicos (cuadro 26) y su respectiva interpretación debido al riesgo de sufrir o sobrevenir el suceso de una infección que diera lugar a cuadros diarreicos se utilizó el método de Kruskal – Wallis donde de cada uno de los niños se obtuvo una interpretación denominado “rango” para la calificación de los cambios ocurridos sobre las bacterias detectadas con la técnica de coprocultivo antes y después del tratamiento.

En el anexo 8.2.1 se obtuvo el contraste $H = 3.34$ a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ (7.82) con 3 grados de libertad en una distribución de “Ji – cuadrada” X^2 indicando bajo la hipótesis nula (H_0) que no hay diferencia significativa entre los diferentes cambios observados en los resultados microbiológicos con los distintos tratamientos.

Con la prueba de “Ji – cuadrada de Parson” (X^2) del anexo 8.3 se corroboró al mismo nivel de significancia $\alpha = 0.05$ (15.51) con 8 grados de libertad, como las bebidas no tienen efecto y los cambios observados en los resultados clínicos son independientes estadísticamente del empleo o no de las bebidas probióticas.

Cuadro 28. Suma de las proporciones por tratamiento de observaciones positivas y negativas obtenidas del cuadro de frecuencias esperadas (E)

TRATAMIENTO \ CRITERIOS	% OBSERVACIONES +	% OBSERVACIONES -
AB1 T ₁	83.33	16.67
OM1 T ₂	83.18	16.82
Testigo T ₃	83.13	16.87
Promedio	83.22	16.78

En el cuadro anterior se puede observar un alto porcentaje de observaciones positivas obtenidas de las observaciones dentro de los rangos 1 (Sí, hay cambio pero sigue conservándose en normal), 2 (Si hubo un cambio positivo) y 5 (No hubo cambio pero sigue conservándose en normal) del cuadro de frecuencias esperadas del anexo 8.3 por lo que se obtuvo con una distribución binomial (anexo 8.4) el intervalo de confianza (0.69 – 0.96) con un 95 % de nivel de confianza (1.96) donde se encuentra la verdadera proporción que contiene las observaciones positivas.

Esto nos dice que al realizar una repetición del estudio con iguales tratamientos e igual lapso de tiempo y bajo las mismas condiciones tomando aleatoriamente una muestra fecal para después realizarle un análisis microbiológico se obtendrá con un intervalo de confianza entre el 69 % - 96 % de observar nuevamente una observación positiva con un nivel de confianza de 95 %.

V CONCLUSIONES

- Se logró la activación de las bacterias probióticas AB1 *L. acidophilus* y *Bifidobacterium sp.*, y el cultivo OM1 *Lc. lactis subsp. lactis* en un tiempo promedio de 16 horas con un porcentaje de acidez mínimo de 0.62 para obtener las bebidas probióticas a base de suero dulce proveniente de la industria quesera.
- Se registraron las cinéticas de fermentación para conocer las curvas de crecimiento de las bacterias ácido lácticas AB1 y OM1. Esto para controlar y estandarizar el proceso de fermentación en cultivo madre y en lote.
- Se seleccionaron 30 niños de edad escolar de 6 – 13 años de una comunidad marginada con algunas deficiencias de índole sanitario lo que puede facilitar diversos focos de riesgo a infecciones: corrales para animales cercas de las unidades habitacionales, servicios básicos deficientes como: fosas sépticas descuidadas, disponibilidad de agua potable pobre, material de las viviendas variable (anexo 8.1.4). Donde las encuestas previas nos indicaron un 78 % aparente de casos de diarrea de algún tipo (anexo 8.1.3).
- Se obtuvieron muestras fecales para la realización de análisis microbiológicos y registrar la ecología gastrointestinal antes y después de la administración de las bebidas probióticas (ver cuadro 26).
- Se les administraron 150 ml de bebida probiótica a los dos grupos de niños durante un lapso de 30 días los tratamientos: T1 (cultivo: AB1), T2 (cultivo: OM1) y Testigo (ninguno).
- Los cambios observados de la microflora gastrointestinal mediante la técnica de coprocultivo y las limitaciones implicadas por la misma, de índole

cualitativa, estadísticamente, indican que la ingesta de las bebidas probióticas no tienen efecto alguno en la aparición de una u otra bacteria.

- Aún así, se tuvo un porcentaje considerable de cambios positivos de 83.33 % en la ecología bacteriana al final del estudio, lo que nos sugiere un balance saludable de la microflora intestinal.
- La obtención de datos cualitativos nos obligan a hacer hipótesis generalizadas de la población en estudio y de la utilización de diseños no paramétricos que reducen la minuciosidad estadística comparada con la utilización de datos continuos.
- Las observaciones positivas no relacionadas estadísticamente a la ingesta de las bebidas probióticas sugieren que se requiere de una técnica más precisa para poder evaluar cuantitativamente el efecto de los probióticos en humanos.

VI RECOMENDACIONES

Para mejorar el estudio del efecto de la ingesta de productos probióticos sobre la microflora intestinal es necesario la utilización de técnicas con resultados cuantitativos como podría ser el uso de marcadores bioquímicos como serían entre otros los presentes en las heces.

Podría ser el caso que se pueda repetir el estudio con un lapso de tiempo superior en la administración de las bebidas con un número de repeticiones mayor e iguales en cada tratamiento para reducir el error.

Para lograr un mayor control sobre los entes “in vivo” como es la dieta y tipo de flora es recomendable la utilización de animales axénicos (sin biota) o con una flora similar a la de los humanos, como los ratones o ratas libres de gérmenes que se inoculan con microflora humana (heteroxénico), los cuáles pueden proveer una oportunidad para estudiar diversas características de la microflora humana, como son sus actividades enzimáticas.

Por otro lado se recomienda realizar un estudio con la adición de la lactulosa, que favorece el desarrollo de los lactobacilos, y la inulina y galacto y fructoligosacáridos, que favorecen el desarrollo de las bifidobacterias. En esta línea se puede desarrollar el producto como un simbióticos que consisten en las combinaciones de probióticos y prebióticos, o bien, para la aceleración de la cinética de fermentación en cultivo madre o en lote.

VII LITERATURA CITADA

ACTIMEL 2004. *Probióticos y las defensas naturales* [En línea]
www.actimel.com.ar/profesionales/monografia/probioticos.html [Consulta:
10/04/2004, 5:46 p.m.]

ALAIS C. 1986. Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera. 6^{ta} impresión.
Edit. CECOSA. México,

ALVAREZ L. M., 2004. Fisiología de la diarrea. Departamento de
Gastroenterología Escuela de Medicina Pontificia universidad Católica de Chile
[Recurso en la web]

BADUI D. S. 1999. Química de los Alimentos. Longman de México En su:
Leche. México, Longman de México Editores S. A. de C. V., Pearson Educación
p. 581 – 611

BATISTA N. Y COL 2004. *Colecistitis aguda por Kluyvera ascorbata* [En línea]
[http://db.doyma.es/cgi-
n/wdbcgi.exe/doyma/mrevista.pubmed_full?inctrl=05Z106&rev=28&vol=20&num
=7&pag=370](http://db.doyma.es/cgi-n/wdbcgi.exe/doyma/mrevista.pubmed_full?inctrl=05Z106&rev=28&vol=20&num=7&pag=370) [Consulta: 25/10/2004, 12:22 p.m.]

BLANCO L. S. *Diarrea*. 2004. [En línea]
<http://www.geocities.com/dctrsergio.geo/gastro/diarrea.html>
[Consulta: 18/09/2004, 4:23 p.m.]

CITIGROUP BAMAMEX 2004. Examen de la situación económica de México
ESTUDIOS ECONÓMICOS Y SOCIALES ENERO • NÚMERO 937• VOLUMEN
LXXX Pág. 24

CORTEZ, O. L. A. 2002. Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco, México salud pública de México / vol.44, no.4, julio-agosto, Pág. 297-302

CRDC 2001 *FF&N of Microbial Origin Probiotic Foods General: Food Technology* 55(11) 46-53 [En línea] [http:// www.crdc-probiotics.ca](http://www.crdc-probiotics.ca) [Consulta: 21/04/2004, 3:00 p.m.]

DIVO A. 1983 *Microbiología Médica. Bacteriología, Inmunología, Virología y Micología*. 3ª ed. Edit. INTERAMERICANA S. A. de C. V. D. F. México.

DOWNIE N. M. Y HEATH R. W. 1973. *Métodos estadísticos aplicados* Harpe & Row Publishers Inc. ®, por HARLA S. A. de C. V. México, D. F. pág. 212-231

DUARTE I. 2001. *Serratia marcescens Análisis de 432 aislamientos Hospital Nacional de Niños Rev. méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica)* v.36 n.1-2 San José [En línea] <http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1017-854620> [Consulta: 08/09/2004, 04:41 a.m.]

ENCARTA 2003. [Programa computacional] Microsoft ® Microsoft Corporation 1993-2002

ENCARTA 2004. *Enterobacterias* [Programa computacional] Biblioteca de Consulta Microsoft ® Microsoft Corporation. 1993-2003

FAO 2003 *Perfiles Nutricionales por Países - MÉXICO* Agosto, Rome, Italy [Recurso disponible en la página web de la FAO]

FARMER J. J. III y col. 1985. *Escherichi fergusonii and Enterobacter taylorae, Two New Species of Enterobacteriaceae Isolated from Clinical Specimens* Journal of Clinical Microbiology, Jan, p. 77 – 81 Aceptada el 17 de Septiembre de 1984

GADEA, I. Y SORIANO F. 2004. *Yersinia enterocolítica: Aspectos prácticos*. Control de Calidad SEIMC Departamento de Microbiología. Fundación Jiménez Díaz. Madrid [Consulta: 18/09/2004,2:59 p.m.]

GARCIA – GARIBAY M. 2004 *Leches fermentadas como vehículos de probióticos* Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México. [En línea] http://www.medinet.net.mx/conapeme/revistas/Suplemento%20Nutricion/leches_fermentadas.htm [Consulta: 08/11/04, 1:15 pm]

GIONO C. S. 1994. Diagnóstico de Laboratorio de Infecciones Gastrointestinales (INDRE). México.

GONZÁLEZ M. B. E. 2003 *Bacteriocinas de Probióticos*. Revista Salud Pública y Nutrición Vol 4 No.2 Abril-Junio [En línea] <http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/actual.html> [Consulta: 10/04/2004 5:22 p.m.]

GONZÁLEZ U. M. Y COL. 2004 (En: Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica III, Veracruz, Veracruz, México). Cartel: 6.1.11. Gelatina probiótica. Instituto Tecnológico de Veracruz.

GUTIERREZ – COGCO L. Y COL. 2000. Serotipos de Salmonella identificados en los servicios de salud de México. Salud Pública México, Noviembre-Diciembre; 42 (6):490-495 Aceptada el 22 de Agosto del 2000

HENNEBERG W. 1971. Elementos de microbiología lactológica 6ta Ed. Edit. Acibia, Zaragoza, España.

INDRE 2004. *Hisopo Rectal y Materia Fecal. Toma, manejo y envío de muestras*

[En línea] <http://www.salud.gob.mx/indre/muestra.htm> [Consulta: 24/07/2004, 10:32:47 a.m.]

INEGI/SSA. 2002. Dirección General de Información en Salud Principales causas de mortalidad en niños en edad escolar y preescolar. México,

LARROSA - HARO A. Y COL. 2002. Utilidad del estudio de las heces para el diagnóstico y manejo de lactantes y preescolares con diarrea aguda. Salud Pública de México / vol.44, no.4, julio-agosto Pág. 328-334 Aceptado el 11 de febrero de 2002

MACKIE R. I. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract Am J Clin Nutr; 69 (suppl): 1035S – 45S. Printed in USA. © American Society for Clinical Nutrition

MENÉNDEZ S. Y RODRÍGUEZ – OTERO J. L., 2004 *Leuconostoc* en quesería. Aula de Productos Lácteos. Instituto de Investigación y Análisis de Alimentos. Universidad de Santiago de Compostela y *M. Hermida* Laboratorio de Mouriscade (Pontevedra) Pág. 67 - 70

MONOGRAFÍAS 2004. *Evaluación de sorbetes y bebidas elaboradas a base de concentrado proteico del suero de queso* [En línea] <http://www.monografias.com/trabajos12/suero/suero.shtml> [Consulta: 18/02/2004, 1:04 a.m.]

MORENO M. R. Y COL. 2004. Obtención de algunos parámetros en la elaboración de una bebida funcional con Bifidobacterias utilizando aguamiel. En: Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica (III, Veracruz, Veracruz, México). Cartel: 6.1.2. Instituto Tecnológico de Veracruz.

MOTA - HERNÁNDEZ F. 2001. Pronóstico de la diarrea por Rotavirus. Salud Pública Méx.; 43:524-528

NLM 2004. *Diarrea* [En línea]

<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003126.htm#Causas%20comunes> [Consulta: 12/03/04, 9:03 p.m.]

NOM-035-SSA1-1993 Bienes y Servicios. Quesos de Suero. Especificaciones Sanitarias. Dirección General de Normas. [Recurso disponible en la página web de la Secretaría de Economía]

NOM-091-SSA1-1994 Bienes y servicios. Leche pasteurizada de vaca. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Dirección General de Normas [Recurso disponible en la página web de la Secretaría de Economía] Última revisión: Febrero 21 de 1996

NOM-092-SSA1-1994 Bienes y servicios. Métodos para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa. Dirección General de Normas [Recurso disponible en la página web de la Secretaría de Economía] Última revisión: 10 de noviembre de 1994

NOM-110-SSA1-1994 Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Dirección General de Normas [Recurso disponible en la página web de la Secretaría de Economía] Última revisión: 10 de mayo de 1995

PEREZ J. P. 1984. Bioquímica y Microbiología de la leche 1ª Ed. Edit. LIMUSA, S. A. México, pág. 24

PIERRE Y CORBETT 2004 Keeping the Gut Microflora at Bay 12 MARCH VOL 303 SCIENCE page 1624 – 1625 [En línea] www.sciencemag.org [Consulta: 21/04/2004, 3:06 p.m.]

QUINTANA P. L. 2000. Terapia nutricional de la diarrea aguda. Unidad de Gastroenterología y Nutrición Infantil. Hospital Materno-Infantil. Las Palmas. Canarias Pediátrica, Vol.24 - nº 1 - Enero-Abril,

READER´S DIGEST SELECCIONES 1984. Guia alfabética de padecimientos, sus causas, síntomas y tratamiento. Consejero Médico Familiar. México.

REBOLLOSO P. O. N., 2002. Primer Seminario Internacional de Alimentos (No. 7, 2002. Saltillo, Coahuila. México) Conferencia: Probióticos y Prebióticos. Facultad de Ciencias Químicas, U.A.C.

SAARELA M. Y COL. 2002 Gut bacteria and health foods - the European perspective, International Journal of Food Microbiology [en línea] *número* 78 pag. 99 - 117, Aceptada el 26 de Mayo

SALOFF C. J. - COSTE. 1995. *Diarrhea and fermented milks*. Danone World Newsletter N° 8 [En línea]
http://www.danonevitapole.com/nutri_views/newsletter/eng/news_8/tb1nw8.html
(2 sur 2) [Consulta: 13/03/02 16:05:43] April

SALOFF C. J. - COSTE C. J. 1997a. *Lactobacillus acidophilus* Danone World Newsletter N °13 [En línea]
http://www.danonevitapole.com/nutri_views/newsletter/esp/news_13/tb2nw13.html
(3 sur 3) [Consulta: 13/03/02 16:51:20] March

SALOFF C. J. - COSTE 1997b. *La microflora gastrointestinal y las leches fermentadas* Danone World Newsletter N °14 [En línea]

http://www.danonevitapole.com/nutri_views/newsletter/esp/news_14/ref.html (5 sur 5) [Consulta: 13/03/02 16:52:39] Mayo

SALOFF C. J. - COSTE 1997c. *Beneficios de las leches fermentadas y de los probióticos sobre la salud* Danone World Newsletter N ° 15 [En línea]

http://www.danonevitapole.com/nutri_views/newsletter/esp/news_15/ref.html (5 sur 15) [Consulta: 13/03/02 16:53:49] Julio

SÁNCHEZ A. H. F. 2002; Desarrollo y evolución refrescante fermentada elaborada a base de suero dulce de quesería, Tesis (nivel Licenciatura), Buenavista, Saltillo, Coahuila. México. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

SANDERS M. E. 1999. Probiotics. SCIENTIFIC STATUS SUMMARY I.F.T. VOL. 53, NO. 11 NOVEMBER

SIAP (2004) *Boletín de leche Servicio de Información y Estadística Alimentaria y Pesquera*. [En línea] <http://www.siap.sagarpa.gob.mx> [Consulta: 08/03/2004, 11:28 a.m.]

TUOHY K. M. 2003. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. Reviews Therapeutic Focus DDT Vol. 8, No. 15 August. [En línea] <http://www.drugdiscoverytoday.com> [Consulta: 13/03/2004, 11:34 a. m.]

URBINA E. C. 2004 (En: Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica III, 2004, Veracruz, Veracruz, México). Mesa redonda: "Alimentos Funcionales", Instituto Tecnológico de Veracruz, México.

WATTIAUX M. A., 2004. Esenciales Lecheras En su: Composición de la leche y valor nutricional. Instituto Babcock para la Investigación y Desarrollo Internacional de la Industria Lechera. Universidad de Wisconsin-Madison. Pag. 73 – 76

VIII ANEXOS

8.1. Material del monitoreo y muestreo

8.1.1. Folleto de presentación de la bebida probiótica

8.1.2 .Formato de entrevista

REGISTRO _____

DATOS GENERALES:

Nombre: _____

Sexo _____ F _____ M _____

Edad _____

Grado escolar _____

Grupo _____ Peso _____ Altura _____ Talla _____

CUESTIONARIO

INSTRUCCIONES: Lea cuidadosamente las preguntas y conteste correctamente subrayando, tachando ó respondiendo lo que se le pide según sea el caso.

1. ¿Tiene su niño problemas diarreicos?

a) Sí

b) No

2. ¿Cuánto tiempo tiene con problemas diarreicos?

a) Menos de 1 mes

b) Más de un mes,

¿Cuánto? _____

3. ¿Con qué frecuencia se presenta el problema?

Número de veces por semana _____

4. ¿Cuál es la principal molestia?

5. ¿Existe algún diagnóstico sobre el problema?

a) Si, ¿Cuál?

b) No _____ pase a la pregunta (8)

6. ¿Se está tratando con alguna clase de medicamento?

a) Si, ¿Cuál? _____ b) No

7. ¿Cuánto tiempo lleva con el tratamiento? _____

8. ¿Cuántos integrantes de la familia tienen el mismo problema?

9. Marca con una X en el recuadro de los productos que consume el niño e indica la cantidad aproximada de consumo por semana

Alimento	X	Frecuencia de consumo por semana
Productos Lácteos		
Leche pasteurizada	<input type="checkbox"/>	
Queso	<input type="checkbox"/>	
Yogurt	<input type="checkbox"/>	
Carnes		
Res	<input type="checkbox"/>	
Puerco	<input type="checkbox"/>	
Pollo	<input type="checkbox"/>	
Pescado, etc.	<input type="checkbox"/>	
Leguminosas		
Frijoles	<input type="checkbox"/>	
Habas	<input type="checkbox"/>	
Lentejas, etc.	<input type="checkbox"/>	
Cereales		
Pastas	<input type="checkbox"/>	
Arroz	<input type="checkbox"/>	
Avena, etc.	<input type="checkbox"/>	
Frutas		
Manzana	<input type="checkbox"/>	
Durazno	<input type="checkbox"/>	
Naranja	<input type="checkbox"/>	
Piña, etc.	<input type="checkbox"/>	
Verduras		
Calabacita	<input type="checkbox"/>	
Repollo	<input type="checkbox"/>	
Coliflor, etc.	<input type="checkbox"/>	

Si conoces a alguien que tenga un problema similar, hazles saber de este estudio para incluirlos en el proyecto.

¡MUCHAS GRACIAS POR TU PARTICIPACIÓN!

8.1.3. Cuadro con los resultados de la entrevista 8.1.2

No.	Alumnos	e	p	h	d	Total	
PRIMER GRADO						si	no
P1	Briones Zavala Nely Esmeralda	7	24	122.5	no		
P2	Flores Zavala Armando	7	22	123.5	si		
P3	García Ramírez Víctor Jesús	8	24	124.5	si		
P4	Licona Hernández Héctor Armando	6	21	116.5	si		
P5	Rodríguez López Rosalinda	7	19	125	no		
P6	Urrea Martínez Ezequiel	9	30	131	si		
P7	Vargas Rodríguez Francisco Manuel	7	20	127.5	si		
P8	Villa Padrón Rafael	6	20	118.5	si	6	2
SEGUNDO GRADO							
S1	Álvarez Ramirez Ari Alexis	7	24	122	si		
S2	Flores Zavala Nadia Yesenia	8	25	128.5	si		
S3	González Rodríguez María Guadalupe	9	25	129	no		
S4	Ángel Iván Romero Mejorado	8	31.5	129.5	si	3	1
TERCER GRADO							
T1	Alvarado García Mirna Patricia	9	25	134	no		
T2	Flores Rodríguez José Francisco	9	27	130	si		
T3	García Ramírez José Arturo	11	29	128	si		
T4	López López Saúl Osiel	9	29	133.5	si		
T5	Martínez Nuncio Carlos Alejandro	10	40	141	si		
T6	Martínez Nuncio Karen Guadalupe	8	22	127	si		
T7	Martínez Rodríguez Nancy Bidet	10	35	140.5	si		
T8	Martínez Rodríguez Yolanda	9	34	135	no		
T9	Rodríguez Betancourt Willy Antonio	9	40	141	no		
T10	Zavala Álvarez Juan Luis	9	30	135.5	si	7	3
CUARTO GRADO							
C1	Emely Isamar Alvarez Aguirre	11	41	130	si		
C2	Guadalupe Belem Carranza Rodríguez	9	33	139	no		
C3	José Alfonso Rodríguez Álvarez	10	40	137.5	si		
C4	Ruth Samanta Guillermo Corvera	9	28	140	si		
C5	Jorge Artemio Maldonado Saucedo	10	24	137	si		
C6	Iván Alejandro Ortiz Limón	11	49	150	si		
C7	Juanita Berenice Pérez Orzua	9	31	144.5	si		
C8	Josué Emmanuel Rodríguez López	10	32	132	si		
C9	Natali Alejandra Rodríguez Padrón	10	33	142.5	si		
C10	Yesenia Guadalupe Villa Acosta	10	44	136	si		
C11	Yudith Zúñiga Acuña	9	22	132	si	10	1

QUINTO GRADO							
Q1	Eduardo Missael López López	12	29.5	136	si		
Q2	Rubi Aglai Martínez Alvarado	11	25	139	si		
Q3	Alma Elizabeth Salas Álvarez	10	47	144.5	no		
Q4	José Isaac Urrea Martínez	11	43	147	no		
Q5	Mireya Villa Castillo	10	24	136	si		
Q6	Hector Daniel Zavala Escobedo	12	71	154	no	3	3
SEXTO GRADO							
Sx1	Martha Cecilia Acuña Álvarez	13	42	156	si		
Sx2	María de los Ángeles Betancurt Vill	12	36	150	si		
Sx3	Nora Berenice Carranza Rodríguez	12	60.5	158	si		
Sx4	Leonardo Villa Acosta	11	44	143	si		
Sx5	Miguel Ángel Villa Padrón	12	50	163	si		
Sx6	Yamileth de Jesús Zavala Saucedo	12	37	157	si	6	0
45						35	10
						77.78%	22.22%

8.1.4 Niños seleccionados para el estudio

N o	Tratamiento AB1			Tratamiento OM1			Tratamiento Testigo		
	Alumno	Clave *	Edad	Alumno	Clave *	Edad	Alumno	Clave *	Edad
1	Armando Flores Zavala	P2	7	Fco. Manuel Vargas Rodríguez	P7	7	Rafael Villa Padrón	P8	6
2	Rosalinda Rodríguez López	P5	7	Ari Alexis Álvares Ramírez	S1	7	Nely Esmeralda Briones Zavala	P1	7
3	Victor Jesús García Ramírez	P3	8	Karina Gpe. Martínez Nuncio	T6	9	Yolanda Martínez Rodríguez	T8	9
4	Nadia Yesenia Flores Zavala	S2	8	José Fco. Flores Rodríguez	T2	9	Yesenia Gpe Villa Acosta	C10	10
5	Ezequiel Urrea Martínez	P6	9	Juan Luis Zavala Álvarez	T10	9	Alma Elizabeth Salas Álvarez	Q3	10
6	Mirna Patricia Alvarado García	T1	9	José Alfonso Domínguez Álvarez	C3	10	Leonardo Villa Acosta	Sx6	11
7	Carlos Alejandro Martínez Nuncio	T5	10	Josué Emmanuel Rodríguez López	C8	10	Héctor Daniel Zavala Escobedo	Q6	12
8	Nancy Aidet Martínez Rodríguez	T7	10	Iván Alejandro Ortíz Limón	C6	11			
9	José Arturo García Ramírez	T3	11	Rubí Aglaí Martínez Alvarado	Q2	11			
10	Emely Isamar Álvarez Aguirre	C1	11	Ma. de los Ángeles Betancurt Villa	Sx2	12			
11	Eduardo Missael López López	Q1	12	Miguel Ángel Villa Padrón	Sx5	12			
12	Yamileth de Jesús Zavala Saucedo	Sx6	12		P7	7			

* Corresponde al grado y número de lista: P (primero), S (segundo), T (tercero), C (cuarto), Q (quinto), Sx (sexto).

8.2 Análisis de Varianza

8.2.1 Cálculo para la prueba de Kruskal – Wallis

La asignación de rangos se definió con los siguientes criterios de acuerdo a las relevancias encontradas en los resultados de los análisis microbiológicos descritas en el cuadro 27.

CUESTIÓN	CLAVE de RANGO	CRITERIO
¿Hay cambio después del tratamiento?	1	Sí, pero sigue conservándose en normal
	2	Sí, hubo cambio positivo
	3	Sí, pero fue negativo o potencialmente riesgoso
	4	Sí, pero se conserva negativo o potencialmente riesgoso
	5	No, sigue permaneciendo normal
	6	No, pero sigue permaneciendo negativo o potencialmente riesgoso

Asignación de rangos de los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos

No.	AB1		Cr.	OM1		Cr.	TESTIGO		Cr.
	C1	C2		C1	C2		C1	C2	
1	E. coli / Enterobacter sp	E. coli / Enterobacter sp	5	E. coli / Enterobacter sp	Klebsiella oxitoca	3	E. coli	E. coli	5
2	E. coli / Enterobacter sp	E. coli / Enterobacter sp	5	E. coli	E. coli	5	E. coli / E. fergusonii	E. coli / Enterobacter sp	1
3	E. coli / Enterobacter sp	E. coli	1	E. coli / Kluyvera ascorbata	Enterobacter sp / Kluyvera ascorbata	4	E. coli	E. coli	5
4	E. coli	E. coli	5	E. coli	E. coli	5	E. coli	Klebsiella sp / E. coli	3
5	E. coli / Enterobacter agglomerans	E. coli / Enterobacter agglomerans	5	E. fergusonii	E. coli	1	E. coli / Enterobacter sp	E. coli / Enterobacter sp	5
6	Citrobacter freundii	E. coli	1	E. coli / Enterobacter cloacae	Pseudomona aeruginosa	3	E. coli / Enterobacter sp	E. coli / Enterobacter sp	5
7	E. coli	E. coli	5	E. coli / Enterobacter sp	E. coli	1	Klebsiella pneumoniae	Klebsiella pneumoniae	5
8	E. coli	E. coli	5	E. coli	E. coli / Serratia marcescens	3	Cr. = Criterio		
9	Klebsiella pneumoniae	Klebsiella pneumoniae	5	Citrobacter freundii	E. coli	1			
10	E. coli	E. coli	5	E. coli	E. coli	5			
11	E. coli / Serratia fonticola	E. coli	2	E. coli	E. coli	5			
12	E. coli / E. fergusonii	E. coli / Enterobacter sp	1						

Valorización de los rangos asignados

RANGO	FRECUENCIA	CÁLCULO	VALOR
1	7	(7+8+9+10+11+12+13)/7	10
2	1	2/1	2
3	4	(3+4+5+6)/4	4.5
4	1	1/1	1
5	17	(14+15+16+...+30)/17	1.5

Suma de Rangos

No. n _j	R _j = AB1		R _j = OM1		R _j = TESTIGO	
	Criterio	Rango	Criterio	Rango	Criterio	Rango
1	5	22	3	4.5	5	22
2	5	22	5	22	1	10
3	1	10	4	1	5	22
4	5	22	5	22	3	4.5
5	5	22	1	10	5	22
6	1	10	3	4.5	5	22
7	5	22	1	10	5	22
8	5	22	3	4.5	ΣR _j = 124.5	
9	5	22	1	10		
10	5	22	5	22	ΣR _j = 132.5	
11	2	2	5	22		
12	1	10	ΣR _j = 132.5		ΣR _j = 208	
ΣR _j = 208						

Efecto de las ligas $T = t^3 - t$

t	4	7	17
T	60	336	4896

Nivel de significancia de $\alpha = 0.05$

$$H = \frac{\frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k \frac{R_j^2}{n_j} - 3(N+1)}{1 - \frac{\sum T}{N^3 - N}}$$

$$H = \frac{\frac{12}{30(30+1)} \left[\frac{208^2}{12} + \frac{132.5^2}{11} + \frac{124.5^2}{7} \right] - 3(30+1)}{1 - \frac{5,292}{26,970}} = \frac{2.68615517}{.80378198} = 3.341895237^{NS}$$

Por lo tanto, NO se rechaza la Hipótesis nula. A un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ (7.82) y $gL = 3$; por lo que las k muestras proceden de la misma población con respecto a la proporción de casos en las diferentes categorías. Por lo tanto la H_0 a los niveles de significancia fijados indica que no hay diferencia significativa entre los tratamientos

8.3. Prueba de X^2 del cuadro de SUMA DE RANGOS se obtuvo:

Frecuencias observadas (O)

TRATAMIENTO \ CRITERIOS	1	2	3	4	5	REPETICIONES
AB1 T ₁	3	1	0	0	8	12
OM1 T ₂	3	0	3	1	4	11
Testigo T ₃	1	0	1	0	5	7
Totales	7	1	4	1	17	30

Frecuencias esperadas (E)

TRATAMIENTO \ CRITERIOS	1	2	3	4	5	REPETICIONES
AB1 T ₁	2.8	0.4	1.8	0.4	6.8	12
OM1 T ₂	2.56	0.36	1.46	0.36	6.23	11
Testigo T ₃	1.63	0.23	0.93	0.23	3.96	7
Totales	7	1	4	1	17	30

Cálculo:

$$X^2 = \left[\frac{(3-2.8)^2}{2.8} + \frac{(1-0.4)^2}{0.4} + \frac{(8-6.8)^2}{6.8} + \frac{(3-2.56)^2}{2.56} + \frac{(3-1.46)^2}{1.46} + \frac{(1-0.36)^2}{0.36} + \right.$$

$$\left. \frac{(4-6.23)^2}{6.23} + \frac{(1-1.63)^2}{1.63} + \frac{(1-0.93)^2}{0.93} + \frac{(5-3.96)^2}{3.96} = 5.283952121^{NS}$$

$$v = gL = (3-1)(5-1) = 8$$

Por lo tanto H_0 no se rechaza a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ (15.51) y las clasificaciones son independientes.

8.4. Intervalos de confianza para la proporción poblacional

Fórmula

$$P \pm Z_c \sqrt{\frac{pq}{N}} \quad \text{donde: } p=25/30= 0.833$$

$$q= 1- p = 0.1667$$

Nivel de Confianza de 95 %

$$\sqrt{\frac{pq}{N}} = \sqrt{\frac{0.1388611}{30}} = 0.068034574$$

$$0.833 \pm (1.96)(0.068034574) = 0.6999 - 0.9666$$

Intervalo de confianza 69 % - 96 %

8.5 Técnica para la fabricación de queso Panela

1. Se emplea leche con acidez de 0.15 – 0.17 %
2. Pasteurizar a 72 ° C por 1 min.
3. Enfriar a temperatura de coagulación (35 – 40 ° C)
4. Adicionar por cada 100 lts de leche:
 - 35 ml (CaCl₂) al 50 %
 - 35 ml de cuajo
5. Permitir la coagulación por 30 min.
6. Corte de cuajado con liras horizontal y vertical (limpias).
7. Primer reposo, 5 min.
8. Primera agitación lenta, 10 min.
9. Segundo reposo, 5 min.
10. Segunda agitación, 10 min.
11. Reposo de 5 min.
12. Desuerado total por separación.
13. Salado 0.3 – 0.5 % del total de la leche.
14. Moldeado en moldes cilíndricos cubiertos con manta de cielo.
15. Prensado medio (15 kg/kg queso) 12 – 24 horas.
16. Desmoldado y recorte de bordes.
17. Conservación por refrigeración.
18. Rendimiento 10 – 12 %

8.6 Técnica para la obtención de una bebida fermentada a base de suero dulce proveniente de la fabricación de queso.

1. Se emplea suero dulce
2. Se pasteuriza a $94^{\circ}\text{C}/1\text{min}$
3. Se enfría a temperatura de incubación (40°C)
4. Se inocula un 4 % de cultivo iniciador previamente activado con un 62 – 67 % de acidez total
5. Se incuba durante 16 hrs a una temperatura de $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta llegar de 62 – 67 ° Dornic
6. Se enfría a una temperatura de entre 8 – 10 ° C
7. Se le agrega 1 % de cualquier sabor de fruta y 15 % de azúcar de mesa y se disuelve completamente
8. Conservar en refrigeración

TABLA A. Valores de H para tres muestras, significativas a los niveles 10, 5 y 1 por 100

Tamaño de las muestras			Nivel		
N_1	N_2	N_3	.10	.05	.01
2	2	2	4.57		
3	2	1	4.29		
3	2	2	4.50	4.71	
3	3	1	4.57	5.14	
3	3	2	4.56	5.36	
3	3	3	4.62	5.60	
4	2	1	4.50		
4	2	2	4.46	5.33	
4	3	1	4.06	5.21	
4	3	2	4.51	5.44	6.30
4	3	3	4.70	5.73	6.75
4	4	1	4.17	4.79	6.67
4	4	2	4.55	5.45	6.87
4	4	3	4.55	5.60	7.14
4	4	4	4.65	5.69	7.54
5	2	1	4.20	5.00	
5	2	2	4.37	5.16	6.53
5	3	1	4.02	4.96	
5	3	2	4.49	5.25	6.82
5	3	3	4.53	5.44	6.98
5	4	1	3.99	4.99	6.84
5	4	2	4.52	5.27	7.12
5	4	3	4.55	5.63	7.40
5	4	4	4.62	5.62	7.74
5	5	1	4.11	5.13	6.84
5	5	2	4.51	5.25	7.27
5	5	3	4.55	5.63	7.54
5	5	4	4.52	5.64	7.79
5	5	5	4.56	5.66	7.98

Fuente: Downie N. M. y Heath R. W., 1973

TABLA B. Valores críticos de la “Ji – cuadrada”

gl	Probabilidad conforme a H_0 de que $\chi^2 \geq$ chi cuadrada													
	.99	.98	.95	.90	.80	.70	.50	.30	.20	.10	.05	.02	.01	.001
1	.00016	.00063	.0039	.016	.64	.15	.46	1.07	1.64	2.71	3.84	5.41	6.64	10.83
2	.02	.04	.10	.21	.45	.71	1.39	2.41	3.22	4.60	5.99	7.82	9.21	13.82
3	.12	.18	.35	.58	1.00	1.42	2.37	3.66	4.64	6.25	7.82	9.84	11.34	16.27
4	.30	.43	.71	1.06	1.65	2.20	3.36	4.88	5.99	7.78	9.49	11.67	13.28	18.46
5	.55	.75	1.14	1.61	2.34	3.00	4.35	6.06	7.29	9.24	11.07	13.39	15.05	20.52
6	.87	1.13	1.64	2.20	3.07	3.83	5.35	7.23	8.56	10.64	12.59	15.03	16.81	22.46
7	1.24	1.56	2.17	2.83	3.82	4.67	6.35	8.38	9.80	12.02	14.07	16.62	18.48	24.32
8	1.65	2.03	2.73	3.49	4.59	5.53	7.34	9.52	11.03	13.36	15.51	18.17	20.09	26.12
9	2.09	2.53	3.32	4.17	5.38	6.39	8.34	10.66	12.24	14.68	16.92	19.68	21.67	27.88
10	2.56	3.06	3.94	4.86	6.18	7.27	9.34	11.78	13.44	15.99	18.31	21.16	23.21	29.59
11	3.05	3.61	5.58	5.58	6.99	8.15	10.34	12.90	14.63	17.28	19.68	22.62	24.72	31.26
12	3.57	4.18	5.23	6.30	7.81	9.03	11.34	14.01	15.81	18.55	21.03	24.05	26.22	32.91
13	4.11	4.76	5.89	7.04	8.63	9.93	12.34	15.12	16.98	19.81	22.32	25.47	27.69	34.53
14	4.66	5.37	6.57	7.79	9.47	10.82	13.34	16.22	18.15	21.06	23.68	26.87	29.14	36.12
15	5.23	5.98	7.26	8.55	10.31	11.72	14.34	17.32	19.31	22.31	25.00	28.26	30.58	37.70
16	5.81	6.61	7.96	9.31	11.15	12.62	15.34	18.42	20.46	23.54	26.30	29.63	32.00	39.29
17	6.41	7.26	8.67	10.08	12.00	13.53	16.34	19.51	21.62	24.77	27.59	31.00	33.41	40.75
18	7.02	7.91	9.39	10.86	12.86	14.44	17.34	20.60	22.76	25.99	28.87	32.34	34.80	42.31
19	7.63	8.54	10.12	11.65	13.72	15.35	18.34	21.69	23.90	27.20	30.14	33.69	36.19	43.82
20	8.26	9.24	0.85	12.44	14.58	16.27	19.34	22.78	25.04	28.41	31.41	35.02	37.57	45.32
21	8.90	9.92	11.59	13.24	15.44	17.18	20.34	23.86	26.17	29.62	32.77	36.34	38.93	46.80
22	9.54	10.60	12.34	14.04	16.31	18.10	21.24	24.94	27.30	30.81	33.92	37.66	40.29	48.27
23	10.20	11.29	13.09	14.85	17.19	19.02	22.34	26.02	28.43	32.01	35.17	38.99	41.64	49.73
24	10.86	11.99	13.85	15.66	18.06	19.94	23.34	27.10	29.55	33.20	36.42	40.27	42.98	51.18
25	11.52	12.70	14.61	16.47	18.94	20.87	24.34	28.17	30.68	34.38	37.65	41.57	44.31	52.62
26	12.20	13.41	15.38	17.29	19.82	21.79	25.34	29.25	31.80	35.56	38.88	42.86	45.64	54.05
27	12.88	14.12	16.15	18.11	20.70	22.72	26.34	30.32	32.91	36.74	40.11	44.14	46.96	55.48
28	13.56	14.85	16.93	18.94	21.59	23.65	27.34	31.39	34.03	37.92	41.34	45.42	48.28	56.89
29	14.26	15.57	17.71	19.77	22.48	24.58	28.34	32.46	35.14	39.09	42.56	46.69	49.59	58.30
30	14.95	16.31	18.49	20.60	23.36	25.51	29.34	33.53	36.25	40.26	43.77	47.96	50.89	59.70

Fuente: Downie N. M. y Heath R. W., 1973