



SECCION ARTICULOS ORIGINALES
REVISTA DEL CENTRO DE ESTUDIOS EN SALUD
2003 VOL 1 N° 4: 5 -12

**EFFECTO *in vitro* de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*
SOBRE EL CRECIMIENTO DE UN AISLADO DE *Helicobacter pylori***
Andrea Montes C.¹, Ayda Santacruz B.¹, Jessie Safudo D.¹, Álvaro Pazos M.²

Recibido Mayo 28 - 03.

Enviado para evaluación Junio 18 - 03

Aceptado Agosto 29 - 03

RESUMEN

En el Departamento de Nariño se presenta una alta incidencia de cáncer gástrico asociado a la infección por *Helicobacter pylori*. Las políticas de salubridad propuestas por las entidades oficiales encargadas del control de ésta enfermedad no muestran resultados alentadores, pues la respuesta del microorganismo a la acción de la alternativa quimioterapéutica es multiresistente y en este sentido, la infección asociada a enfermedades gastrointestinales siguen en aumento, reflejándose en el incremento de la tasa de incidencia en nuestro Departamento. Ante esta realidad, este trabajo evaluó el efecto *in vitro* de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* sobre el crecimiento de un aislado de *Helicobacter pylori*, con 257 biopsias de pacientes que presentaban síndrome ulcerooso, obtenidas por endoscopia del tracto digestivo superior. Las enfermedades más frecuentes encontradas por endoscopia con prueba de ureasa positiva fueron: Gastritis crónica superficial, Gastritis crónica atrófica y no atrófica. Los fragmentos de tejidos se llevaron a cultivo en agar Columbia con sangre desfibrinada de cordero al 8%, obteniéndose 61 aislados positivos para *H. pylori* representado en un 23.73% de éxitos sobre el total de intentos. Los aislados se identificaron con pruebas bioquímicas de ureasa, oxidasa, catalasa y la identificación de su morfología por tinción de Gram. Igualmente el resultado de dichos aislados se comparó con el diagnóstico histológico, dando un porcentaje de correlación del 63.46%. Finalmente se realizaron pruebas de antagonismo *in vitro* con *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*, bacteria ácido láctica Gram positiva aislada del tracto gastrointestinal humano cuyo crecimiento y desarrollo se logró en un medio base Melaza con leche en polvo el cual inhibió el crecimiento del patógeno de mejor manera en la dilución 10^{-2} con una densidad celular de 98×10^5 bacterias lácticas /ml, así lo demostró la prueba de significancia de Tukey con un 95% de confiabilidad y 5% de error. Los estudios llevaron a concluir que *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* ejerce capacidad antagónica *in vitro* sobre los aislados de *Helicobacter pylori*, sugiriendo la posibilidad de su uso como probiótico en el control y prevención de la infección por *Helicobacter pylori* asociada a enfermedades gastrointestinales.

PALABRAS CLAVES: *Helicobacter pylori*, Cáncer gástrico, *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*

INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas han sido utilizadas en control y prevención de enfermedades gastrointestinales⁽¹⁾. Hoy en día, son bien conocidos los beneficios en la salud que se derivan de la utilización de alimentos fermentados por bacterias ácido lácticas, entre ellos: - Control de las infecciones entéricas. - Inmunopotenciadores en malnutrición. - Favorecimiento de la utilización de lactosa - Acción inhibitoria de algunos tipos de tumores intestinales y urinarios. - Acción hipocolesterolemica. Nuestra actividad investigativa se enfoca en encontrar cierto tipo de bacte-

rias lácticas para ser usadas como probióticos vehiculados en alimentos fermentados. Se consideran varias las sustancias que producen las bacterias lácticas inductoras de capacidad antagónica contra bacterias saprófitas y patógenas, como el peróxido de hidrógeno, diacetil, bacteriocinas, ácido láctico, reuterina entre otros. Además, la inhibición del crecimiento esta sujeta a la competencia de nutrientes y espacio entre los microorganismos⁽²⁾.

¹. Biólogos con énfasis en Microbiología, Universidad de Nariño. e-mail: armcs@universia.net.co; pili0677@yahoo.com; adenka@universia.net.co

². MSc. Microbiología, Profesor asistente, Departamento de Biología, Universidad de Nariño. e-mail: biologia@udenar.edu.co

Helicobacter pylori es una bacteria enteropatógena Gram negativa de forma bacilar pleomorfica que se aísla a partir de la mucosa gástrica humana; coloniza la mucosa del estómago de al menos la mitad de la población mundial. La mayoría de los individuos infectados son asintomáticos, sin embargo, en un número importante de ellos, la infección por *Helicobacter pylori* está asociada al desarrollo de gastritis, atrofia glandular gástrica y duodenal y adenocarcinoma gástrico, patologías éstas con alta prevalencia en la zona Andina en el Departamento de Nariño⁽³⁾.

Considerando los aspectos anteriores, el presente trabajo evaluó el efecto *in vitro* de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* sobre la bacteria enteropatógena Gram negativa *Helicobacter pylori in vitro*. Para lograr dicho objetivo se trabajó con *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*, bacteria ácido láctica, cuyo aislado se obtuvo del tracto gastrointestinal humano en el estudio "Bacterias lácticas bacteriocinogénicas y su efecto sobre bacterias patógenas"⁽⁴⁾ y con un aislado de *Helicobacter pylori* obtenido de biopsias de mucosa gástrica en el presente estudio. Se desarrolló un medio base de melaza con leche en polvo para realizar las fermentaciones *in batch*. Finalmente se realizaron ensayos de inhibición *in vitro* para verificar el efecto antagónico de la bacteria ácido láctica sobre *Helicobacter pylori*.

El fermento láctico inhibió el crecimiento del patógeno de mejor manera en la dilución 10^{-2} con una densidad celular de 98×10^5 bact/ml respecto al sustrato puro y a las diluciones 10^{-1} y 10^{-3} , así lo demostró la prueba de significancia de Tukey. Se pudo concluir finalmente que la bacteria láctica es capaz de inhibir el crecimiento de *Helicobacter pylori*, por tanto se proponen estudios encaminados a probar el efecto probiótico *in vivo*.

MATERIALES Y METODOS

La ejecución de este trabajo se realizó en tres fases:

1. En el laboratorio No. 4 de Microbiología de la Universidad de Nariño, se realizó el aislamiento, purificación, preservación y activación de la bacteria enteropatógena de fragmentos de biopsias obtenidos de pacientes que acudieron a consulta por síndrome ulceroso a las instituciones: Clínica de los Seguros Sociales, Fundación Valle de Atriz, Consultorio Convida y Cruz Roja, obteniéndose un total de 257 muestras. De cada muestra se recibieron tres fragmentos: el primero se depositó en un tubo eppendorf que contenía Test de Urea, para detectar inicialmente la presencia de *H. pylori* el segundo frag-

mento en un tubo nunc con 1 ml de tioglicolato para conservación en nitrógeno líquido y el tercer fragmento en un tubo eppendorf con solución salina fisiológica para su posterior siembra.

Para el aislamiento se partió del tercer fragmento el cual se maceró en mortero estéril con 200 μ l de solución salina fisiológica. El macerado se sembró en agar Columbia (Oxoid) suplementado con sangre desfibrinada de cordero al 8% y suplemento Dent, se incubaron a 37° C en cámara microaerofílica con sobres Campypack (BBL) de 48 a 72 horas; al cabo de este tiempo se realizaron pruebas de identificación como Test de Urea, oxidasa (Oxoid), catalasa y Tinción de Gram. Las evaluaciones tendieron a detectar morfología compatible con *H. pylori* tanto macroscópica y microscópicamente. Los resultados de los cultivos se compararon con el diagnóstico histológico realizado por el laboratorio particular "Patólogos Asociados"⁽⁵⁾.

Para la purificación de *H. pylori* se tomaron colonias y se sembraron en agar sangre desfibrinada al 8% sin suplemento y en tubos tapa rosca con 10 ml de caldo tioglicolato y/o a caldo brusella. Se incubó a 37° C de 24 a 48 horas en las condiciones anteriormente mencionadas. Hay que tener en cuenta que los tubos no se tapan completamente para que adquieran la atmósfera microaerofílica dentro de la jarra y su evaluación se realiza por turbidez del medio en la parte media superior del tubo.

El proceso de conservación parte de un aislado purificado de *H. pylori*, se tomaron colonias con escobillón estéril que se transfirieron a tubos nunc con caldo tioglicolato y glicerol al 20% se homogenizó y se llevaron a nitrógeno líquido a -196° C.

La activación se lleva a cabo partir de un preservado criogénico, inmediatamente con una lanceta u hoja de bisturí se raspó una fracción del contenido del tubo realizándolo en el menor tiempo posible para evitar el descongelamiento de la muestra y por que sirve para futuras activaciones. La fracción se depositó en una caja petri con agar sangre desfibrinada de cordero al 8% sin suplemento; se hizo un rayado con escobillón estéril por el método de siembra en masa. Este mismo escobillón se utilizó para transferir las bacterias restantes a tubos tapa rosca con 10 ml de caldo tioglicolato y/o caldo brusella se incubó a 37° C en las condiciones antes mencionadas.

2. Se activó y conservó *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* partiendo de un preservado criogénico proveniente de un periodo de almacenamiento de -196° C en

nitrógeno líquido o a -20°C , se tomó la totalidad del tubo y se inoculó directamente en un erlenmeyer que contiene 40 ml de caldo MRS en cámara de flujo laminar tipo II y se llevó a un periodo de incubación de 20 a 24 horas a 37°C . Se evaluó crecimiento por turbidez del caldo MRS y se repicó 4 ml a otros 40 ml de caldo MRS y se incubó en las mismas condiciones iniciales garantizando así que la cepa está totalmente activa.

Después del tiempo de incubación se repicó en cajas con agar MRS y agar MRS modificado con azul de anilina, incubándose a 37°C por 24 - 48 horas para confirmar morfología compatible con bacterias lácticas.

El proceso de conservación parte de un cultivo stock reciente que se realizó en tubos inclinados con agar MRS glucosa 5 g/l inoculado con asa recta en profundidad, se incubó a 37°C de 20 a 24 horas, transcurrido este tiempo se replicó a cajas con agar MRS y se incubó durante 48 horas. Posteriormente se inocularon asadas a un erlenmeyer con 40 ml de caldo MRS glucosa 5 g/l se incubó a 37°C por 20 horas y finalmente se adicionó glicerol al 25%, se homogeniza y se transfieren a tubos nunc con 1 ml para su conservación en nevera a -20°C o en nitrógeno líquido a -196°C .

Para realizar los procesos de fermentación se utilizó un inóculo con una población inicial de 11×10^7 bact/ml en dos tipos de sustrato melaza con leche en polvo para su desarrollo y crecimiento, estableciendo así su cinética de crecimiento y teniendo en cuenta parámetros como la producción de proteínas, formación de biomasa, consumo de azúcares y evaluación de pH, tomando como control el medio comercial MRS (Merck).

3. Finalmente se realizaron ensayos de antagonismo *in vitro* mediante una variante del método de Tagg, J.R. et al⁽⁵⁾, ésta detecta la inhibición del crecimiento de la cepa indicadora *Helicobacter pylori*, causada por la cepa examinada *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*. Las zonas claras o halos de inhibición indicaron actividad antibacteriana.

Para la evaluación de la capacidad inhibitoria se aplicó un

Cuadro 2. Número de aislamientos de *Helicobacter pylori*.

| Institución | No de muestras | Aislamientos |
|--------------------------|----------------|--------------|
| ISS | 43 | 19 |
| Fundación Valle de Atriz | 27 | 9 |
| C. Convida | 87 | 27 |
| Cruz Roja | 100 | 6 |
| TOTAL | 257 | 61 |

diseño irrestrictamente al azar de una sola vía y un solo factor, con un total de 96 unidades experimentales de las cuales se tomaron 16 réplicas por cada dilución. Los datos se sometieron a un análisis de varianza y prueba de significancia de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

AISLAMIENTO DE *Helicobacter pylori*

Se obtuvieron un total de 257 biopsias de pacientes de uno u otro sexo y adultos de diferentes edades. Además se obtuvo el diagnóstico histológico realizado por un laboratorio particular "Patólogos Asociados"[®]. (Cuadro 1).

Cuadro 1. Número de muestras de biopsias obtenidas de 1999 - 2001

| Institución | 1999 | 2000 | 2001 |
|--------------------------|-----------|-----------|------------|
| ISS | 43 | | |
| Fundación Valle de Atriz | 27 | | |
| C Convida | | 77 | |
| Cruz Roja | | 10 | 100 |
| TOTAL | 70 | 87 | 100 |

La investigación se efectuó con pacientes que acudieron a realizarse endoscopia superior por sospecha de enfermedad ulcerosa. La endoscopia se realizó por un médico especialista y con un equipo gastroduodenoscopia Olympus[®].

Inicialmente se determinó la presencia de *Helicobacter pylori* en biopsia con test de úrea, donde de los 87 pacientes del año 2000, 61 tuvieron la prueba positiva para un 70.11% y un 21.89%, un test de úrea negativa. De los 100 pacientes del año 2001, únicamente 61% fue positivo para la prueba con un 61% y un 39% resultó negativo para el test de úrea.

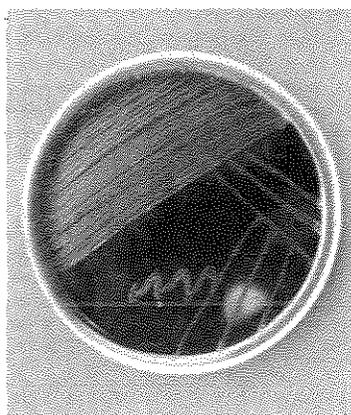
Las enfermedades más frecuentes encontradas por endoscopia con prueba de ureasa positiva fueron: Gastritis crónica superficial, Gastritis crónica atrófica y no

atrófica.

Los aislamientos fueron confirmados por morfología macroscópica y microscópica⁽⁶⁾.

En el medio agar Columbia (Oxoid), con sangre de cordero desfibrinada al 8% se observaron colonias translúcidas en forma de gotas de rocío de 1 a 2 mm de diámetro. (Figura 1)

Figura 1. Morfología macroscópica de *Helicobacter pylori*



Con tinción de Gram se observaron bacilos curvados, pleomórficos Gram negativos. (Figura 2.)

Figura 2. Microfotografía de *Helicobacter pylori*



Las pruebas bioquímicas de identificación para *Helicobacter pylori* dieron como resultado el test de urea positivo, prueba de oxidasa positiva y prueba de catalasa positiva. De las 257 muestras se cultivaron y se obtuvieron 61 aislados positivos para *Helicobacter pylori* con un 23.73%.

En el Instituto de los Seguros Sociales se logró el mayor número de aislados con respecto a la muestra, que corresponde a un 44.2% y el menor de 6% registrado en la Cruz Roja Colombiana. Esta variación puede atribuirse a las diferencias en las condiciones del cultivo, a la contaminación ó a los falsos negativos, a la probabilidad de tomar la biopsia en una zona de mucosa no colonizada ó con bacterias de reducida variabilidad, por la lidocaina utilizada habitualmente en la endoscopia y por el tratamiento con antibióticos⁽⁷⁾. (Cuadro 3.)

Cuadro 3. Porcentaje de aislamientos de *Helicobacter pylori*

| Institución | No. de muestra | Aislamientos | Porcentaje |
|--------------------------|----------------|--------------|---------------|
| ISS | 43 | 19 | 44.2% |
| Fundación Valle de Atriz | 27 | 9 | 33.3% |
| C. Convida | 87 | 27 | 31.1% |
| Cruz Roja | 100 | 6 | 6% |
| TOTAL | 257 | 61 | 23.73% |

El resultado del cultivo se comparó con el diagnóstico histológico de la biopsia, de donde de 52 de las muestras analizadas, 33 mostraron correlación positiva con el resultado del cultivo, con un porcentaje de correlación del 63.46% y un 36.54% una correlación negativa, probablemente debida a la tinción convencional utilizada, ya que la hematoxilina eosina no puede ser fiable si sólo existen pocas bacterias. Además el diagnóstico histológico depende enormemente de la experiencia del observador y de

su destreza, así como de la calidad de la biopsia, el tamaño y la orientación de los especímenes, también son esenciales para su diagnóstico correcto y a las condiciones de laboratorio antes mencionadas.⁽⁸⁾

Analizando los datos por institución se observó que en Convida hay un mayor porcentaje de correlación entre el cultivo y el resultado del diagnóstico histológico con un 73.07%. (Cuadro 4.)

Cuadro 4. Porcentaje de correlación de aislados con diagnóstico histológico por institución.

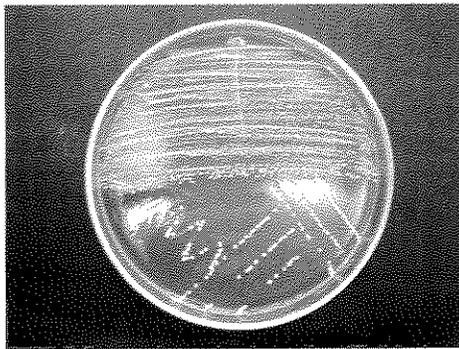
| Institución | Aislados | Diagnóstico histológico | Correlación Con aislado | % de Correlación |
|--------------------------|-----------|-------------------------|-------------------------|------------------|
| ISS | 19 | 13 | 9 | 69.23% |
| Fundación valle de Atriz | 9 | 9 | 4 | 44.4% |
| C. Convida | 27 | 26 | 19 | 73.07% |
| Cruz Roja | 6 | 4 | 1 | 25% |
| TOTAL | 61 | 52 | 33 | 63.46% |

ACTIVACION Y CONSERVACIÓN DE *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*

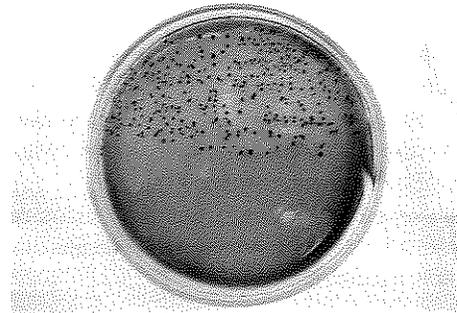
La cepa de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* fue aislado y conservado a partir del trabajo “bacterias Lácticas bacteriocinogénicas y su efecto sobre bacterias patógenas asociadas a alimentos”⁽⁹⁾. Esta cepa se activó completa-

mente a las 24 horas en caldo MRS comercial (Merck) estéril. Se realizó su cultivo en Agar MRS y Agar MRS modificado con azul de Anilina para constatar su morfología tanto macroscópica como microscópica, en el medio MRS comercial y MRS modificado con azul de anilina (Merck) se observaron colonias convexas, brillantes y cremosas. (Figura 3.)

Figura 3. Morfología macroscópica de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*.



Izquierda cultivo en agar MRS comercial.



Derecha, cultivo en agar MRS modificado con azul de anilina

Con tinción de Gram se reportaron bacilos cortos Gram positivos.

Para el proceso de fermentación se escogió el Medio Melaza con leche en polvo utilizado previamente en el trabajo “Protección Intestinal Contra patógenos específicos a través de sustratos fermentados con *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*”⁽¹⁰⁾. Este medio presenta buenas condiciones para el desarrollo y metabolismo de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*.

Se realizó fermentación en Matraz con *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* en medio melaza con leche en polvo con el fin de evaluar su cinética de crecimiento.

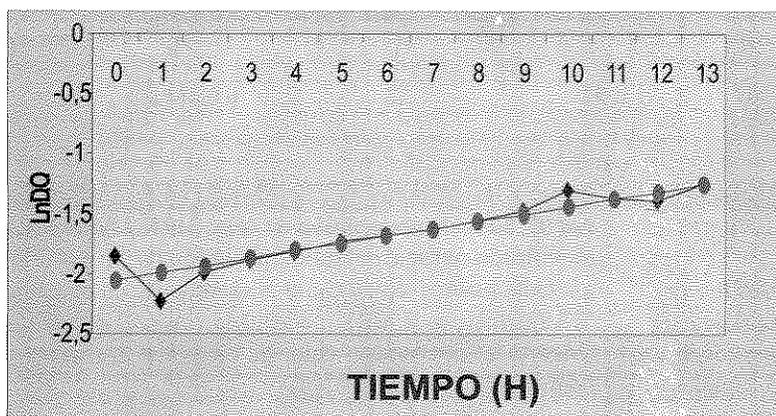
El crecimiento y el comportamiento metabólico de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* en el medio Melaza con leche en polvo es estable durante la fase exponencial a partir de las 2 horas (T_2) hasta las 12 horas (T_{12}). Aunque después hay una alteración de comportamiento por la toma de nutrientes y la secreción de produc-

tos metabólicos como el ácido láctico.

La velocidad de crecimiento permanece constante durante esta fase con un valor de 0.06 h^{-1} . El tiempo de

duplicaciones es de 10.83 horas lo que indica que *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* presenta un crecimiento lento. (Gráfica 1)

Gráfica 1. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* en medio melaza con leche en polvo.



Ln (Logaritmo natural), D.O. (Densidad óptica).

Al evaluar la biomasa y la producción de proteína de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* en el medio Melaza con leche en polvo, se observó un incremento uniforme desde el comienzo de la fermentación hasta las 10 horas (T_{10}) determinándose así el tiempo de cosecha con una biomasa de 93×10^{10} UFC/ml y una producción de biomasa de 49.98 g/l. Posteriormente se presenta una disminución de dichos parámetros.

El decrecimiento que se presenta en la última fase y a las 24 horas (T_{24}) podría deberse al consumo de azúcares y al descenso del PH (4.85) debido a la producción de ácido láctico por parte de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* lo que inhibe su crecimiento.

Se estableció como un medio de comparación el medio MRS comercial (Merck) como referencia para constatar que el medio Melaza con leche en polvo constituye una mejor fuente de carbohidratos y nitrógeno lo cual favorece al crecimiento de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*.

El medio MRS comercial (Merck) presenta su punto más alto en la formación de biomasa a las 10 horas con una

concentración de 7×10^{10} UFC/ml, resultando mucho menor en cuanto a la formación de biomasa del medio Melaza con leche en polvo siendo este el más óptimo para el desarrollo y el metabolismo de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*.

ENSAYO DE INHIBICIÓN ANTAGÓNICA *in vitro*

Según los resultados obtenidos, *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* en el sustrato de Melaza con leche en polvo es capaz de inhibir el crecimiento de *Helicobacter pylori* en condiciones de laboratorio. (Figura 4). Evidenciado por la formación de halos o zonas claras alrededor del micropocillo que contiene la bacteria láctica, se debe probablemente a los diferentes mecanismos o propiedades que presentan las bacterias ácido lácticas entre ellas *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*, como es la producción de ácido láctico que puede inhibir el crecimiento de *Helicobacter pylori* *in vitro*, como también la producción de bacteriocinas que ejercen una acción bactericida o bacteriostática contra bacterias patógenas, además estos microorganismos son capaces de afectar el crecimiento celular.

Figura 4. Inhibición de *Helicobacter pylori* (Parte superior) por *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* (Parte inferior). Método de los micropocillos

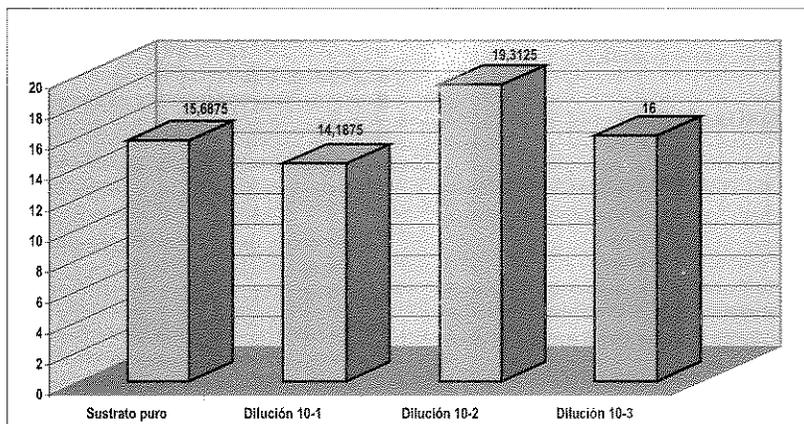


El análisis de varianza muestra que el efecto antagónico de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* sobre el crecimiento de *Helicobacter pylori* es del 95% de confiabilidad con un margen de error del 5%.

Debido a que se presentan diferencias significativas entre el diámetro y las diluciones del sustrato, se realizó la prueba de Tukey con la cual se determinó que la dilución 10^{-2} con una densidad celular de 98×10^5 bact/ml, es la mejor para inhibir el crecimiento de *Helicobacter pylori*

con respecto al sustrato puro y las diluciones 10^{-1} y 10^{-3} (Gráfica 2). Posiblemente se debe a que en el sustrato puro y en dilución 10^{-1} se encuentra un mayor número de bacterias lácticas de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*, que podrían estar en forma aglomerada en el medio obstaculizando en parte, los procesos metabólicos por la falta de sustrato necesario, disminuyendo así probablemente, la cantidad de bacteriocinas y de ácido láctico requerido para realizar la acción inhibitoria sobre el patógeno, en cambio que en la dilución 10^{-3} hay menor cantidad de bacterias

Gráfica 2. Promedios de halos de inhibición antagónica de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* sobre el de *Helicobacter pylori* (crecimiento Prueba de Tukey).



CONCLUSIONES

Lactobacillus casei subsp rhamnosus es capaz de inhibir el crecimiento de *Helicobacter pylori* con un 95% de confiabilidad y un error del 5%, presentando diferencias estadísticamente significativas demostradas con la prueba de Tukey. Por lo tanto se sugiere utilizarlo como probiótico para prevenir o disminuir la alta incidencia de enfermedades asociadas a *Helicobacter pylori*.

Mediante los ensayos de antagonismo *in vitro*, la concentración de la bacteria láctica es inversamente proporcional a la capacidad inhibitoria sobre el patógeno, por lo cual se determinó que la dilución 10^{-2} con densidad celular de 98×10^5 bact/ml, formó halos de inhibición con un diámetro promedio de 19.31 mm con respecto al sustrato puro y a las diluciones 10^{-1} y 10^{-3} .

De las 257 biopsias de mucosa gástrica humana se obtuvieron un total de 61 aislados correspondiente a un 23.73%. Algunos de ellos fueron preservados para futuras activaciones. De dichos aislados el 63.46% presentaron correlación positiva con el estudio histológico. De acuerdo al sitio de toma de la muestra de tejido de mucosa gástrica, Convida presentó un mayor porcentaje de correlación entre el diagnóstico por cultivo y el diagnóstico por estudio histológico, 73.07% de correlación

De acuerdo a la cinética de crecimiento, la mayor formación de biomasa fue de 93×10^{10} UFC/ml y la mayor producción de proteínas de 49.98 g/l, se obtuvo a las 11 horas (T_{10}) determinando así el tiempo de cosecha. Se puede concluir que el medio Melaza con leche en polvo es un medio que favorece el mejor crecimiento y desarrollo de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* que el medio MRS comercial utilizado como control.

El medio Melaza con leche en polvo fermentado con *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*. puede, en un futuro, ser considerado como un producto probiótico gracias a su aporte de nitrógeno, carbohidratos y proteínas.

RECOMENDACIONES

Realizar investigaciones que demuestren *In vivo* la actividad de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* como probiótico.

La lectura de biopsia por histopatología mediante la utilización del método de tinción de Giemsa y otras tinciones que tienen una excelente sensibilidad y especificidad para *Helicobacter pylori*, versus la de hematoxilina eosina.

Para asegurar el resultado positivo, verdadero en la validación de cualquier método utilizado para detectar la infección por *Helicobacter pylori*, se recomienda compararse con al menos otros dos métodos como el test de aliento, pruebas serológicas, etc., aceptándose la positividad absoluta cuando coinciden estos métodos.

Para obtener un mayor número de aislados se recomienda hacer el cultivo e incubación de *Helicobacter pylori* en el mismo sitio de la toma de la muestra.

En la activación de *Helicobacter pylori* se requiere estrictas condiciones de asepsia y el menor tiempo posible entre la extracción de la muestra de crioconservación en nitrógeno líquido y la siembra, evitando el descongelamiento brusco de la muestra, y por ende, disminuyendo el shock térmico.

El medio Melaza con leche en polvo, se recomienda para el desarrollo, crecimiento y metabolismo de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* por los resultados obtenidos en esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. RENNER, E. Culture Dairy Products in human nutrition, IDF Bulletin 255. 1991.
2. BARNEY, C.E. Bacterias lácticas bacteriocinogénicas. Efecto sobre bacterias patógenas asociadas a alimentos. M.Sc. Tesis Universidad del Valle. Departamento de Microbiología. Cali, Colombia. 1996.
3. CORREA, P. Is gastric carcinoma an infections disease? N Eng. J. Med 325. 1991. p. 1170-1.
4. RENNER, E. Culture Dairy Products in human nutrition, IDF Bulletin 255. 1991.
5. TAGG, J.R., DAJANI, AsS., WANNAMAKER, L.W. Bacteriocins of Gram positive bacteria. Bacteriology Review. 40. 1976. p. 722-756.
6. HIRSCHL, A.M. Microbiología de *Helicobacter pylori*. Aspectos generales, diagnóstico y resistencia. Infección por *Helicobacter pylori* en lesiones gastroduodenales. Prous Science, S.A. Barcelona, España. 1998. p. 17-19, 22-28.
7. GOODWIN, C.S., Armstrong JA. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori*. Eur J Clin Microbiol Infect dis. 9. 1990. p. 1-3.
8. HIRSCHL, A.M. Microbiología de *Helicobacter pylori*. Aspectos generales, diagnóstico y resistencia. Infección por *Helicobacter pylori* en lesiones gastroduodenales. Prous Science, S.A. Barcelona, España. 1998. p. 17-19, 22-28.
9. BARNEY, C.E. Bacterias lácticas bacteriocinogénicas. Efecto sobre bacterias patógenas asociadas a alimentos. M.Sc. Tesis Universidad del Valle. Departamento de Microbiología. Cali, Colombia. 1996.
10. PAZOS, M. Álvaro Jairo. Protección intestinal contra patógenos específicos a través de sustratos fermentados con *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*. Departamento de Microbiología. Universidad del Valle. 2000

